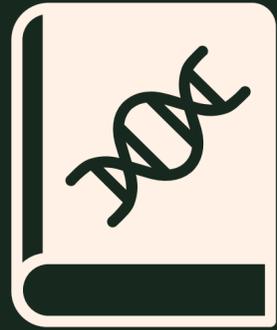




RNAs não codificantes na Regulação Gênica em Células do Sistema Imune

Dra. Juliane C R Fernandes



Pós-Doutoranda

Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto – USP

Doutora em Ciências

Faculdade de Medicina – USP

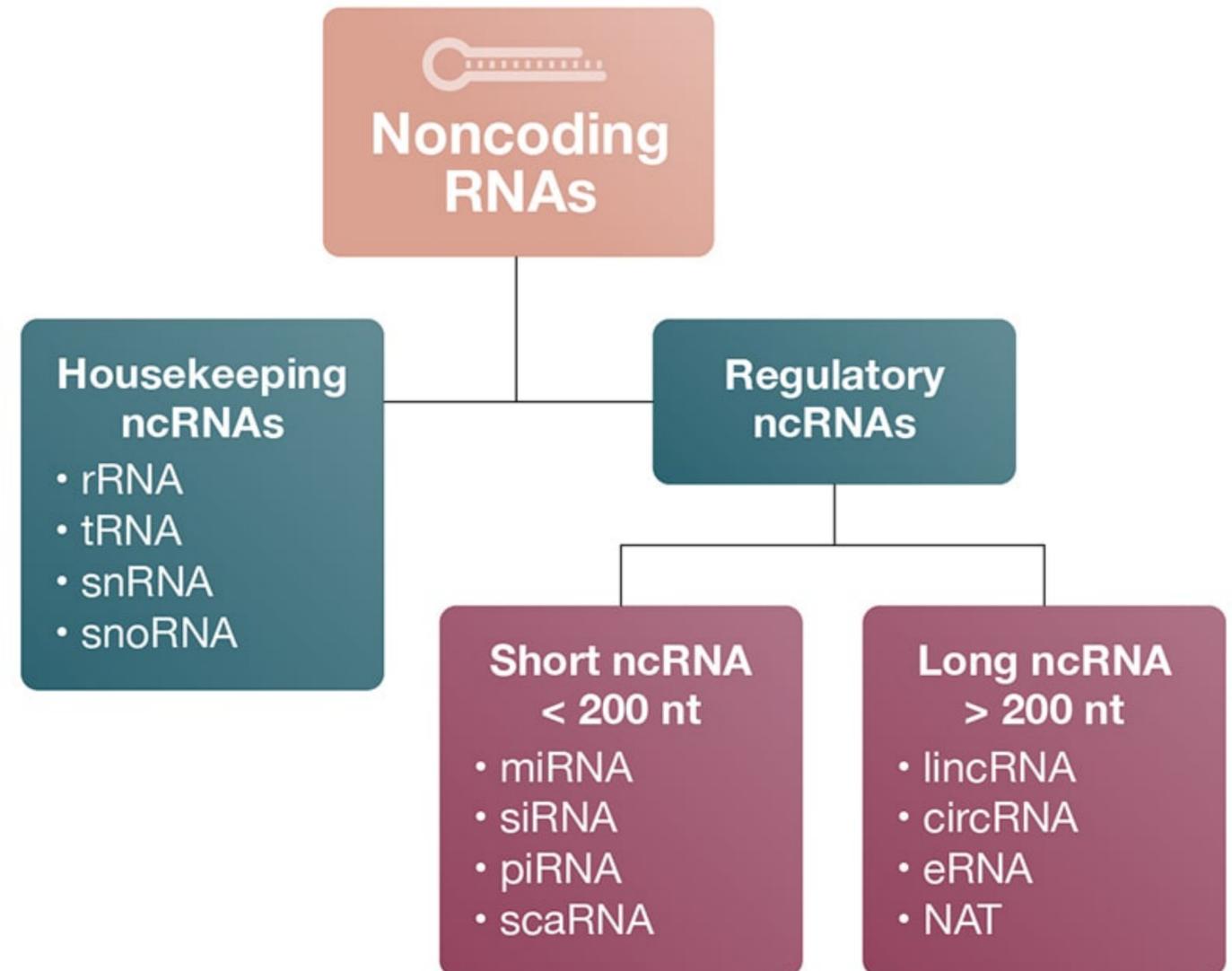
Sanduíche: Universidad CEU San Pablo

Bacharela em Ciências Biomédicas

Instituto de Ciências Biomédicas – USP

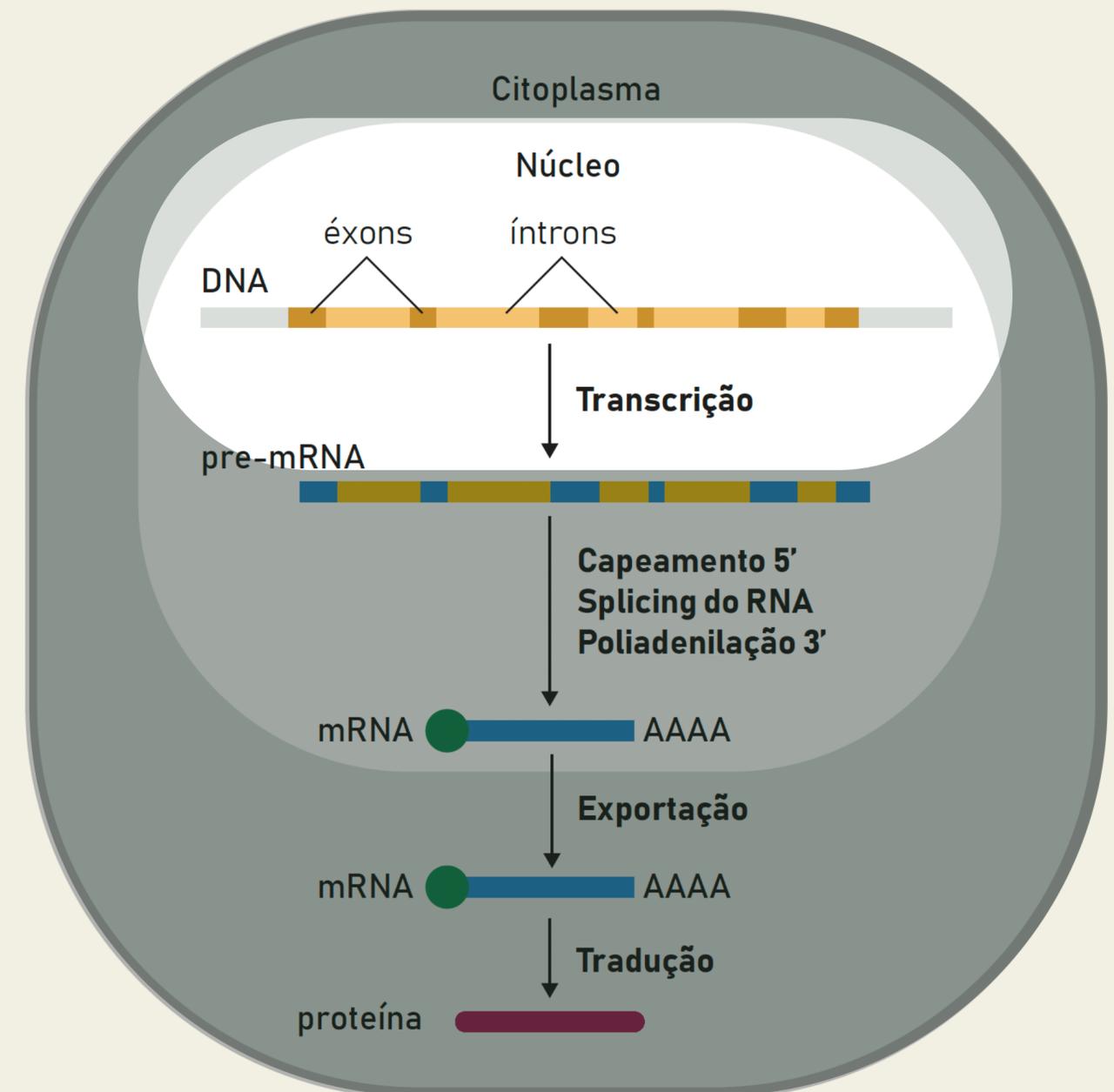
Tipos de RNAs não codificantes

- **RNAs “housekeeping”:** maquinaria de transcrição/tradução
- **RNAs regulatórios:** pequenos ncRNAs e ncRNAs longos



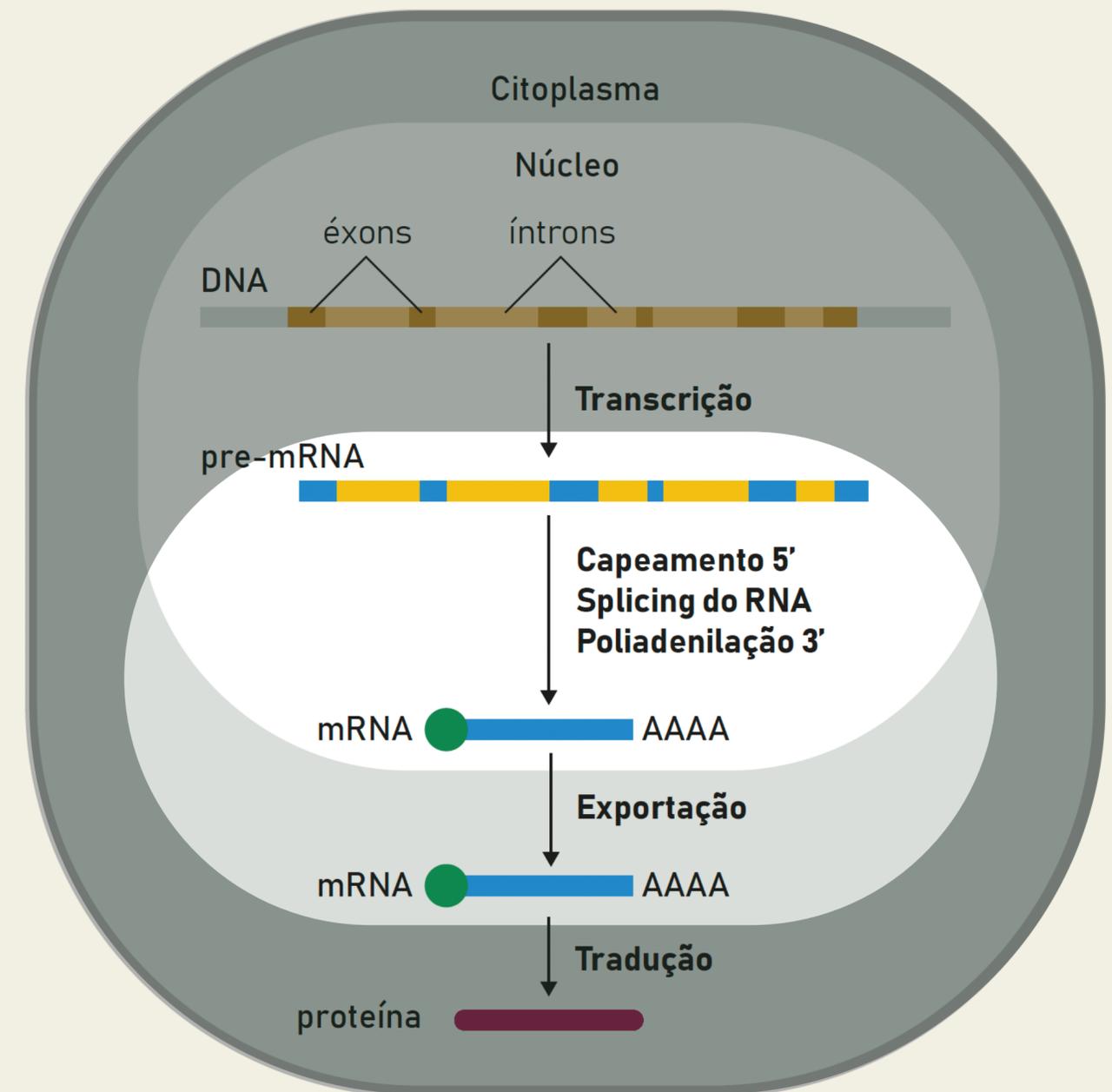
Nível de regulação: transcricional

- **Estrutura da cromatina:** acessibilidade a fatores de transcrição e RNA polimerase



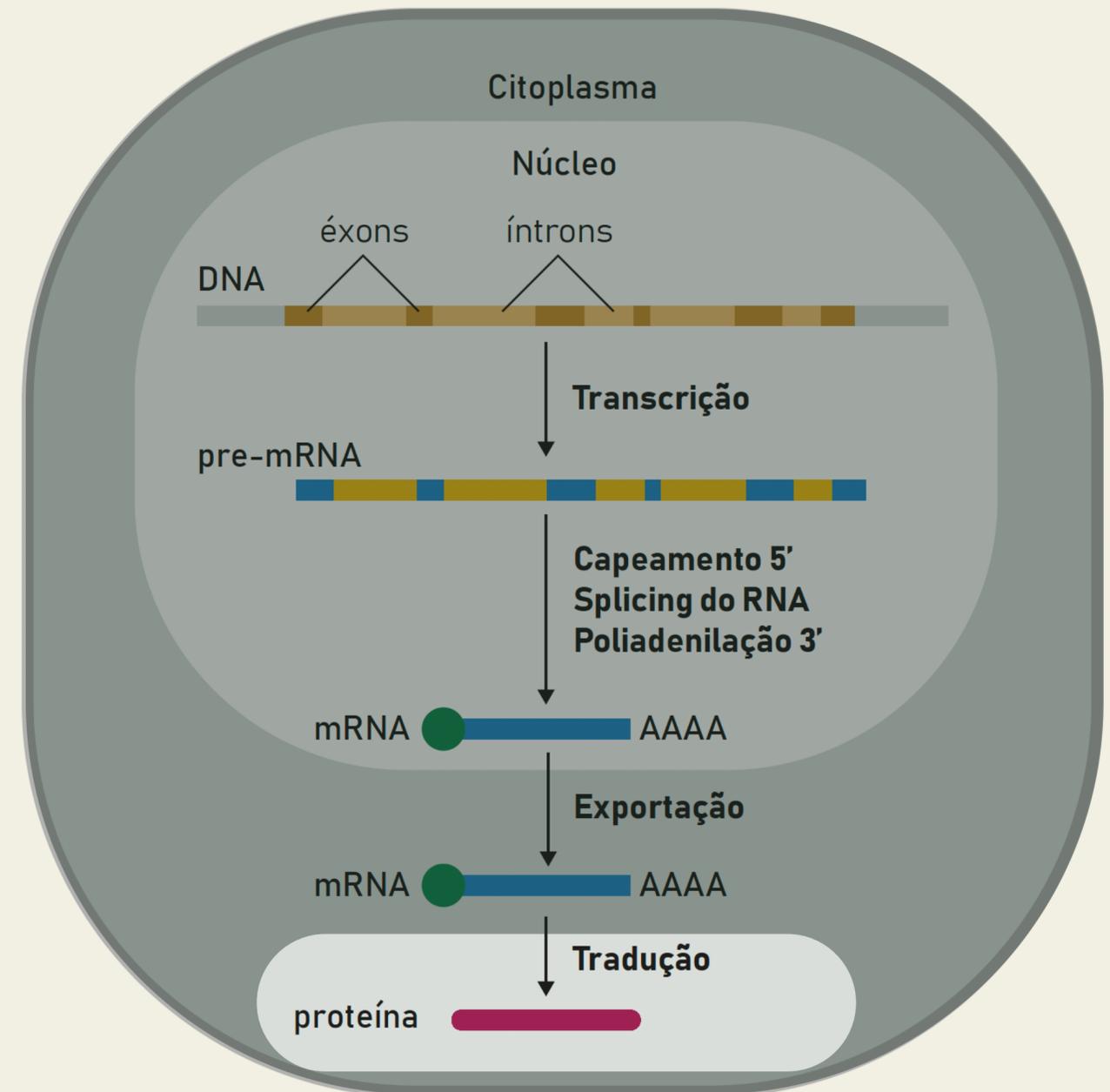
Nível de regulação: pós-transcricional

- **Processamento do mRNA:** splicing, capeamento, poliadenilação
- **Estabilidade do mRNA:** meia vida

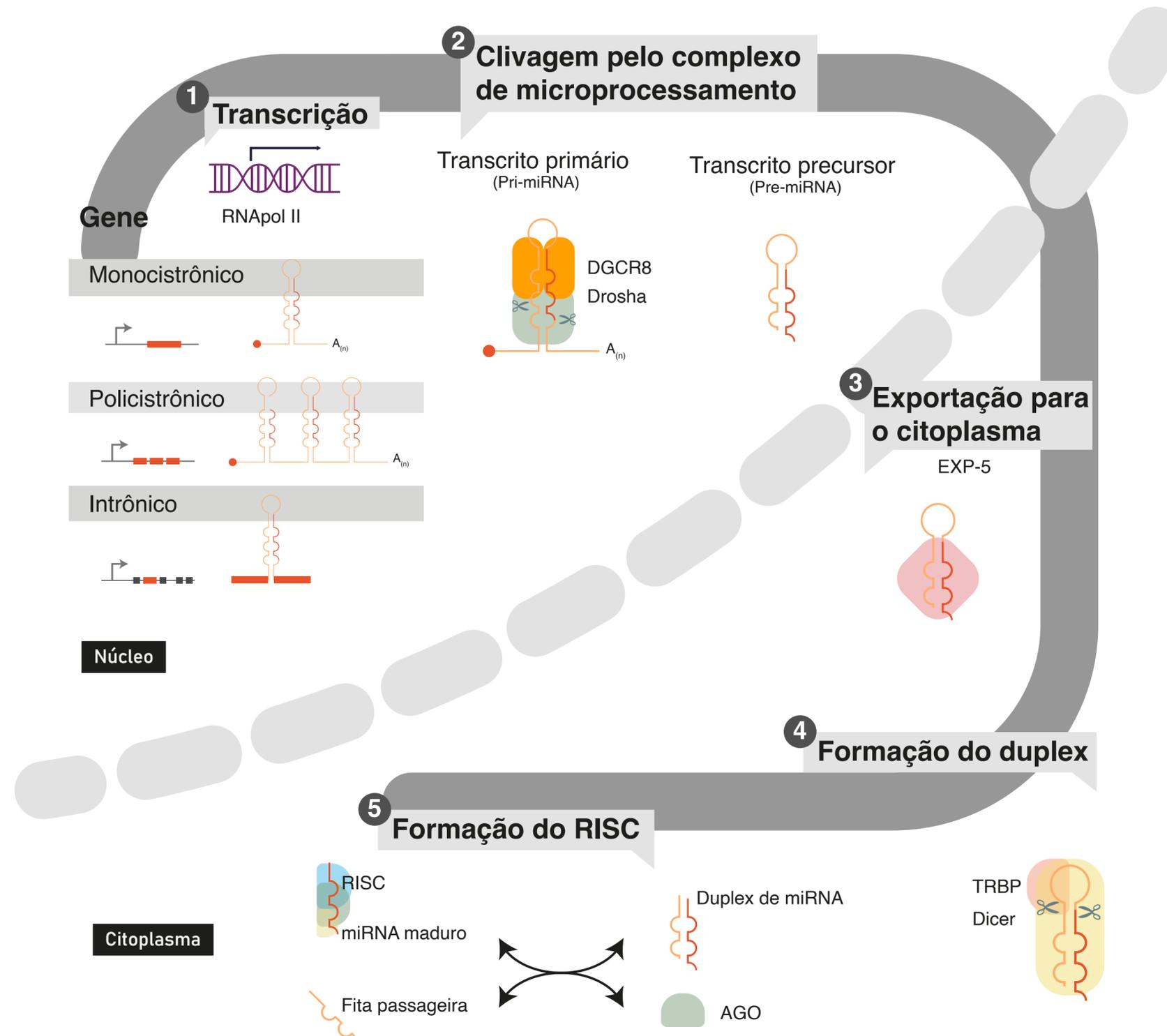


Nível de regulação: traducional ou pós-traducional

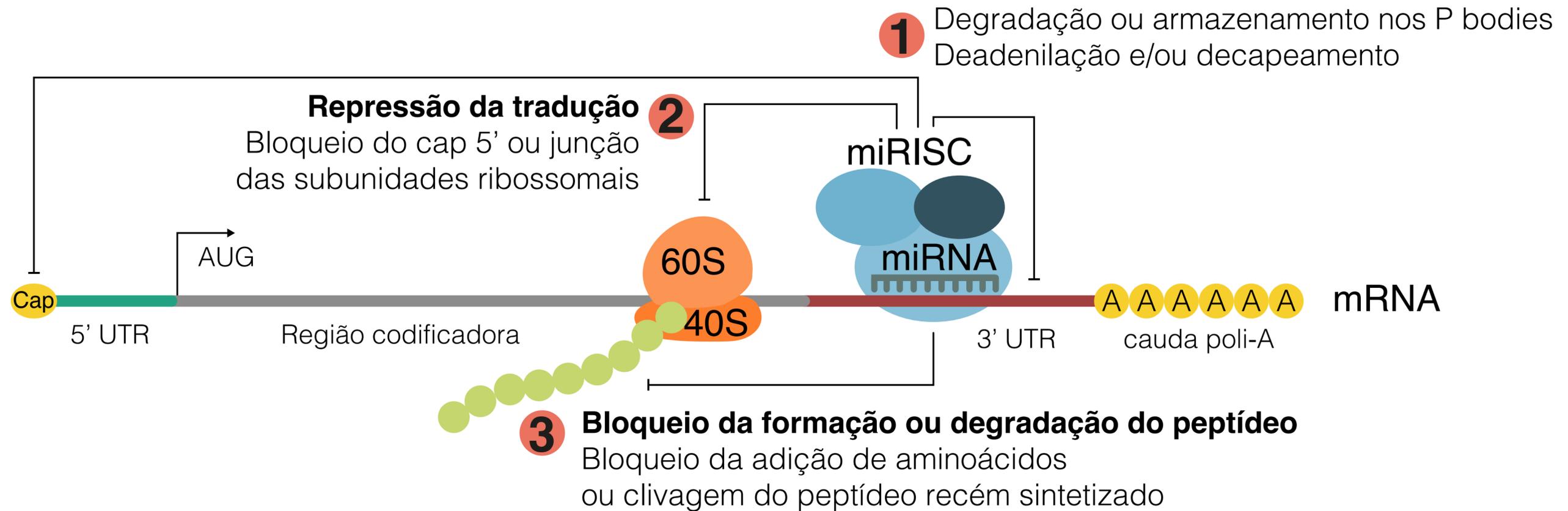
- **Tradução:** recrutamento de polissomos e formação do pe
- **Atividade:** função da proteína ou atividade enzimática



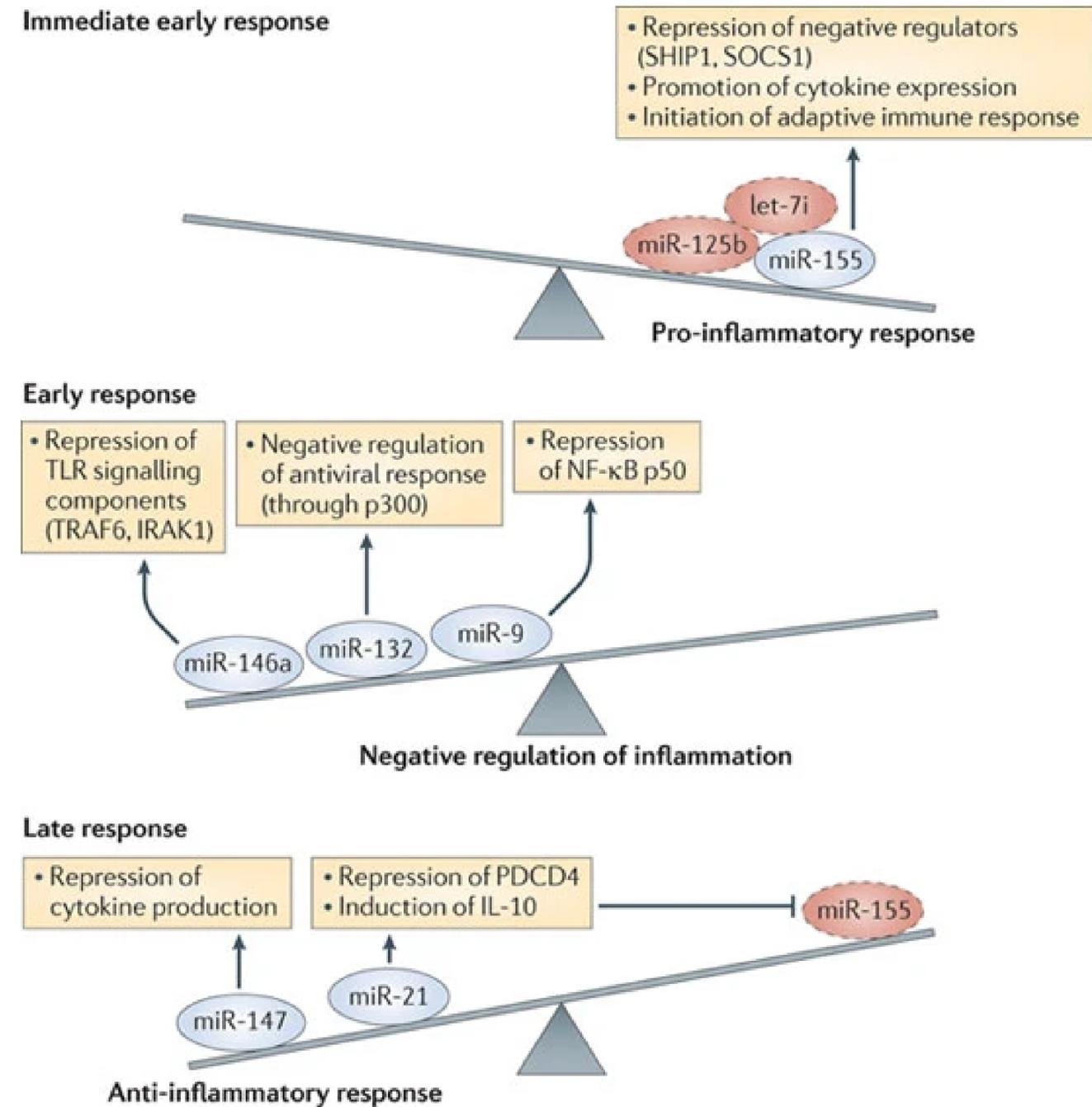
Biogênese de microRNAs



Função de microRNAs

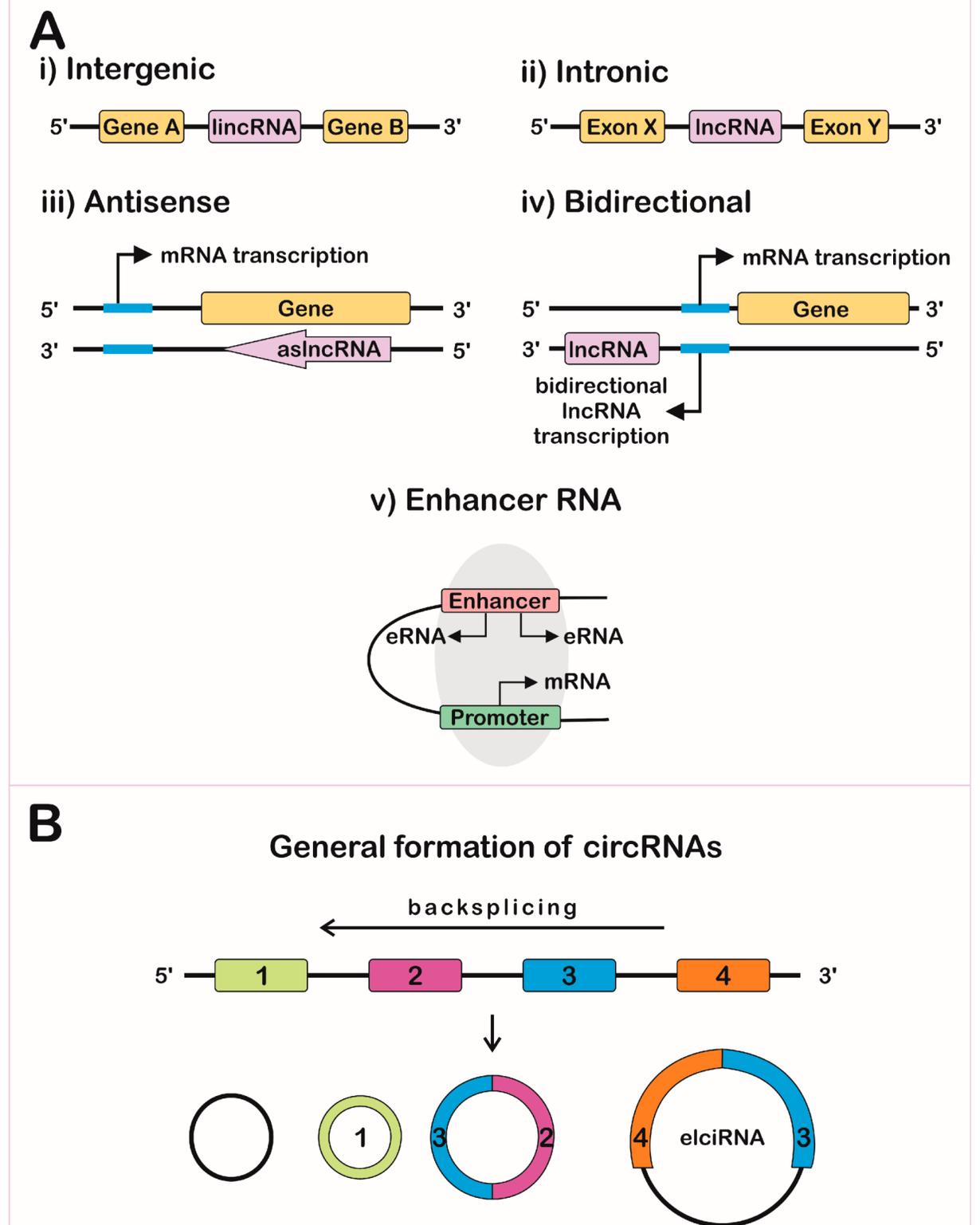


microRNAs na resposta imune



Tipos de lncRNAs

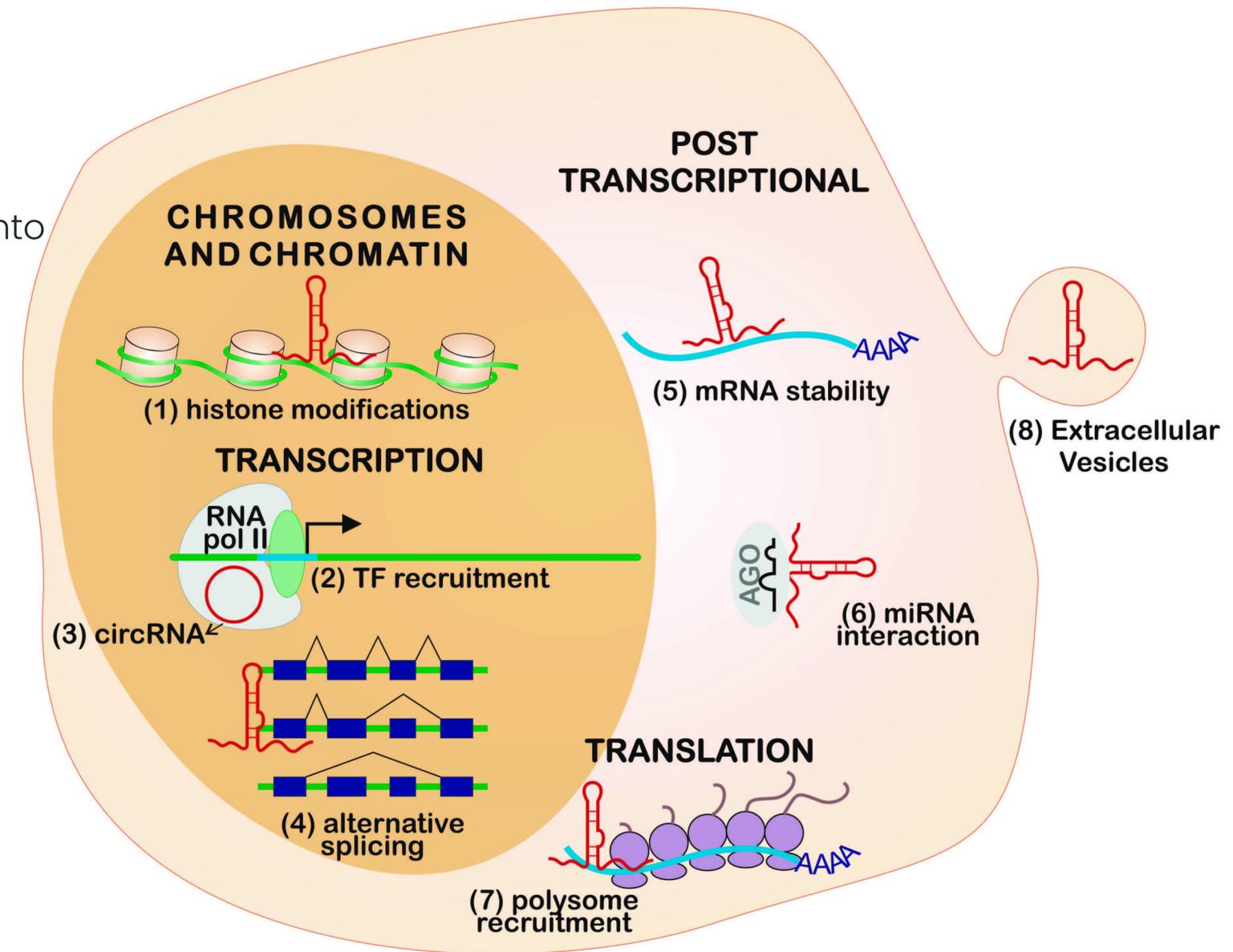
- **Intergênico:** Codificado por gene com promotor próprio.
- **Intrônico (lincRNA):** Localizado em região intrônica de um gene que codifica proteínas, pode ou não ter promotor próprio.
- **Antisenso (aslncRNA, NATs):** é transcrito na fita oposta genes que codificam proteínas e apresentam sobreposição de sequência.
- **Bidirecional:** São transcritos simultaneamente a genes que codificam proteínas
- **Enhancer:** lncRNAs sintetizados de regiões de enhancer
- **circRNAs:** RNAs circulares podem ser formados em um mecanismo de splicing.



Níveis de regulação da expressão gênica por lncRNAs

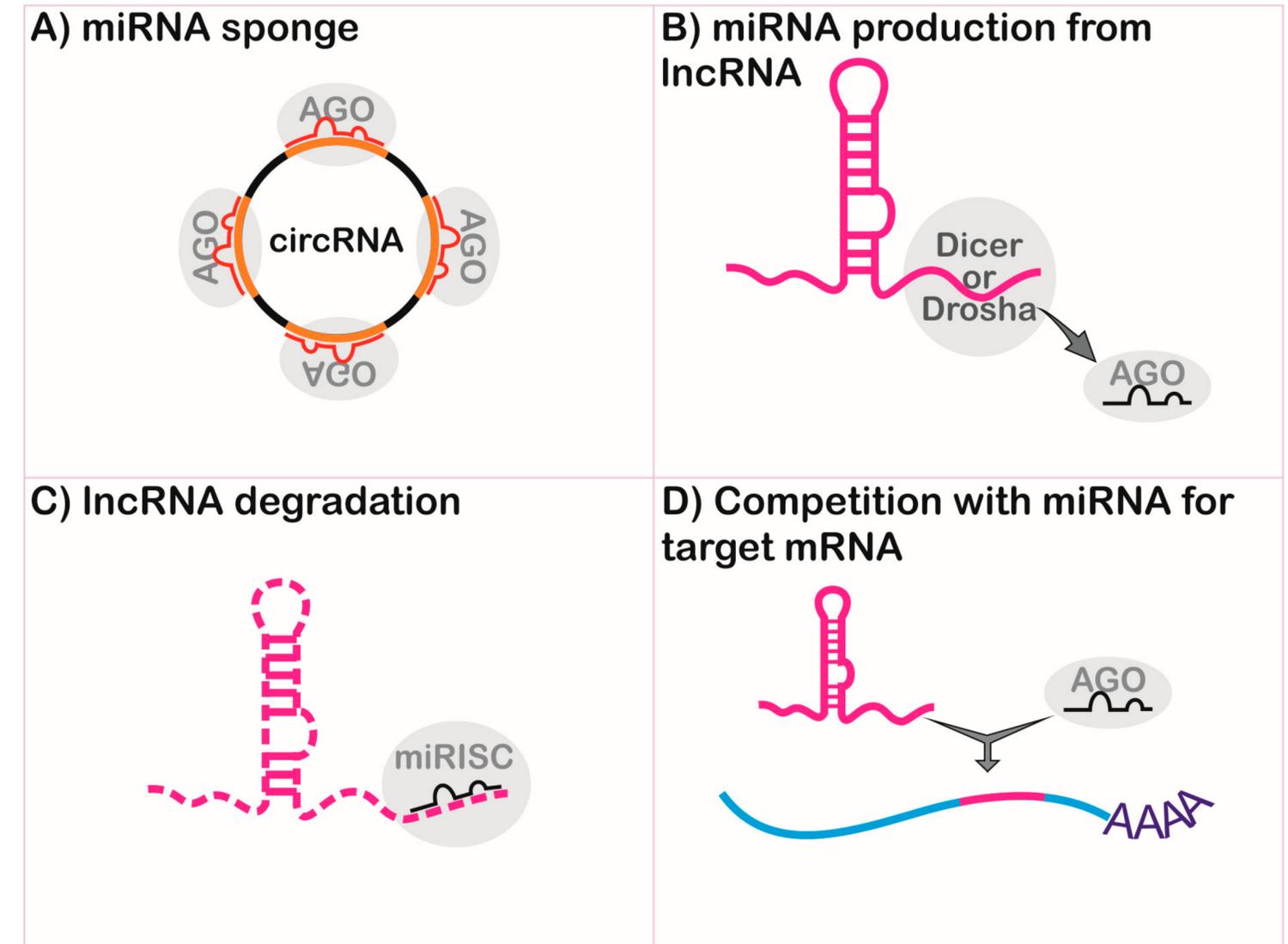
- **Transcricional:** Modificação de histonas e cromatina e recrutamento de fatores de transcrição
- **Pós-transcricional:** Splicing alternativo, estabilidade de mRNAs, interação com miRNAs
- **Traducional:** Recrutamento de polissomos

*Vesículas extracelulares



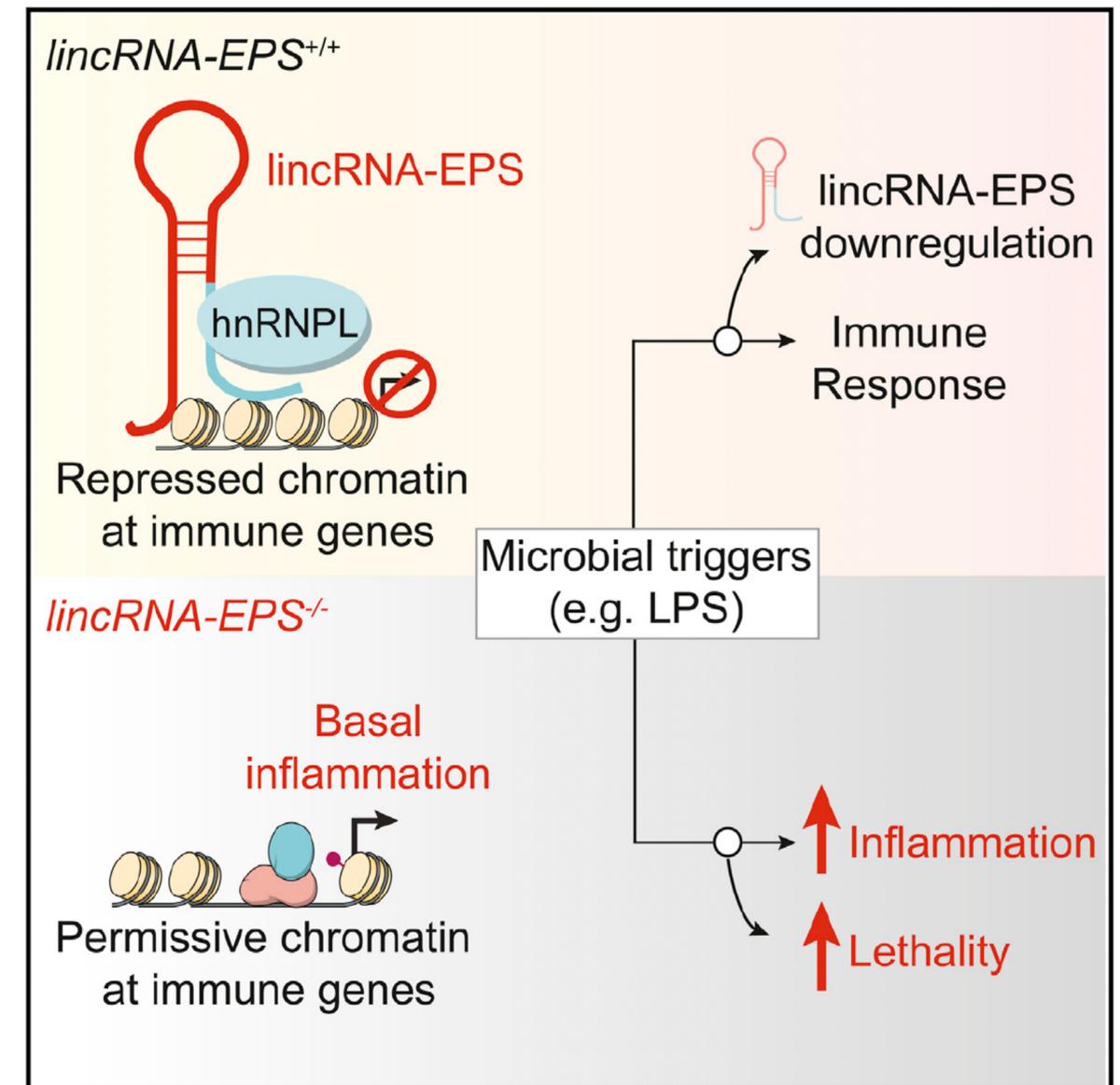
Interação lncRNA-miRNA

- **Esponja de miRNAs:** lncRNAs podem atuar como esponjas de miRNAs ao apresentarem múltiplas regiões de pareamento a um miRNA, impedindo que estes estejam livres para o reconhecimento de mRNAs-alvo.
- **Precursos de miRNAs:** lncRNAs podem ser precursos de miRNAs, também chamados de miR-Host Gene, e podem ter função própria, independente do miRNA.
- **lncRNA como alvos de miRNAs:** miRNAs podem ter como alvo lncRNAs e levá-lo à degradação de maneira dependente de RISC.
- **Competição pelo sítio no 3'UTR:** miRNAs e lncRNAs podem ter sítios-alvo próximos e alterar a afinidade ou possibilidade de reconhecimento da região do mRNA-alvo.



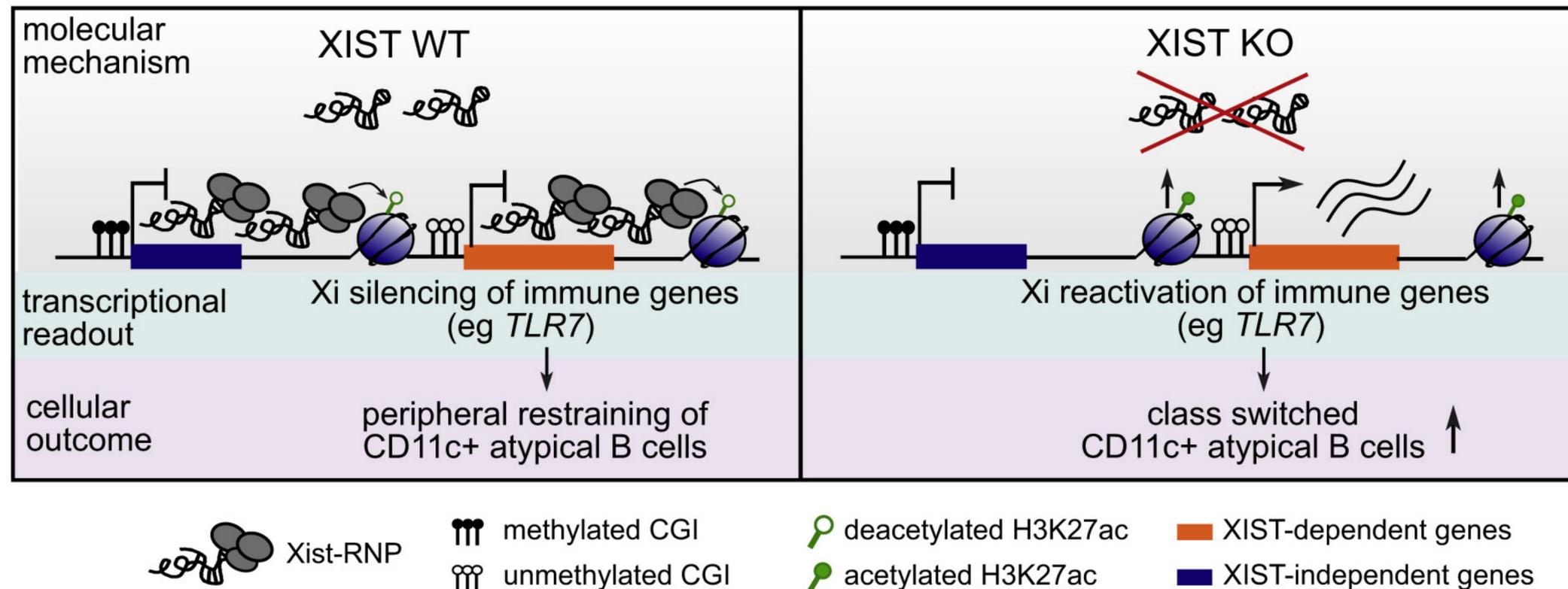
Nível transcricional

- Animais nocautes para o **lincRNA-EPS** apresentam aumento da inflamação basal e da letalidade por desafio com endotoxina. Mecanicamente, o lincRNA controla a abertura da cromatina e a transcrição de genes relacionados à resposta imune.



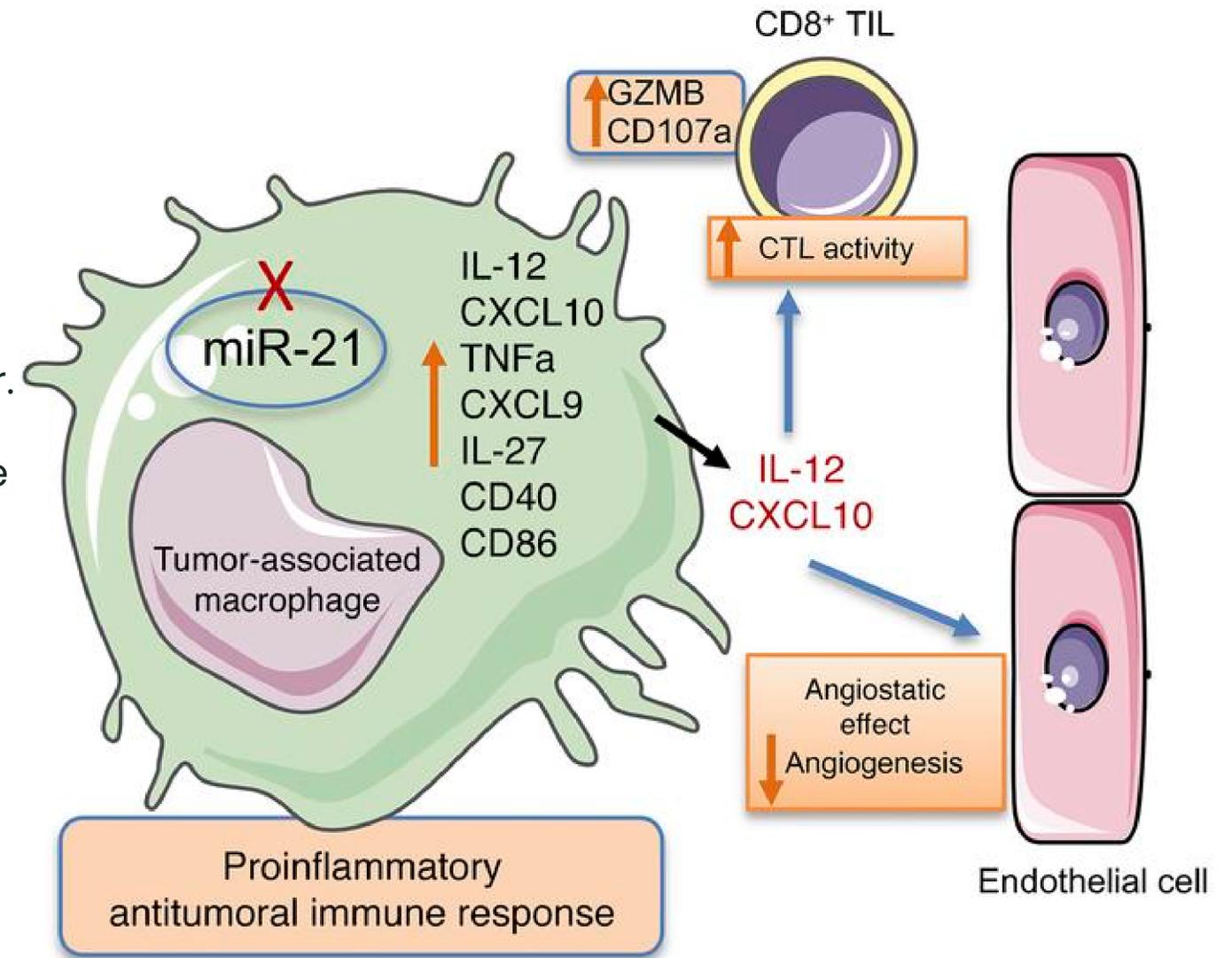
Nível transcricional

- **LncRNA XIST** é envolvido na inativação do cromossomo X de indivíduos XX. Em adultos, XIST medeia a inativação de genes do sistema imune localizados no cromossomo X, como TLR7. Pacientes de COVID-19 têm uma desregulação desse lncRNA promovendo células B de memória atípicas CD11c+.



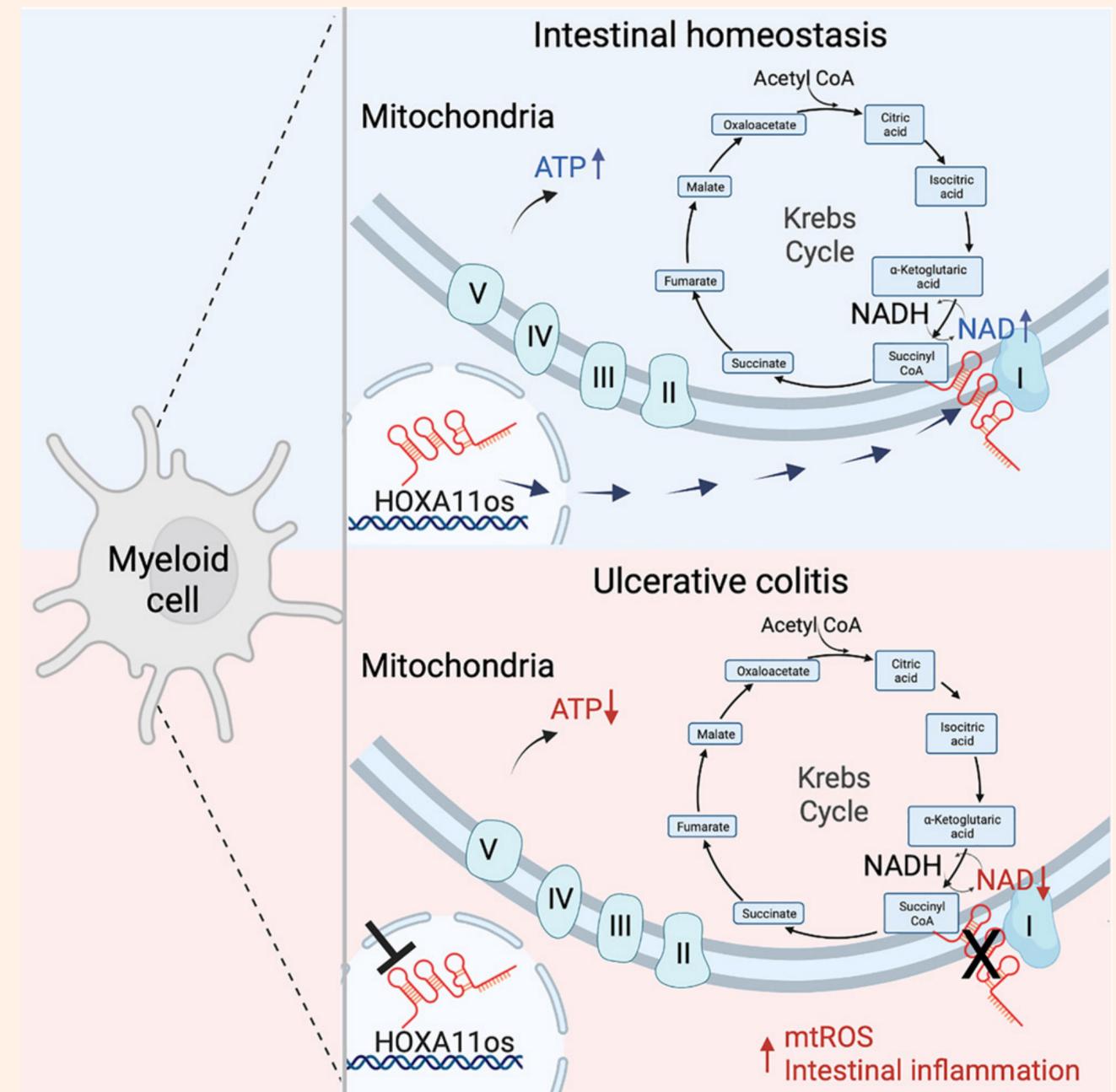
Nível pós-transcricional

- **miR-21** regula os níveis de mRNA de diversos genes relacionados a resposta imune em macrófagos associados a tumor. O bloqueio desse miRNA aumentou a resposta antitumoral dos macrófagos, com redução da angiogênese e aumento da atividade de células T citotóxicas.



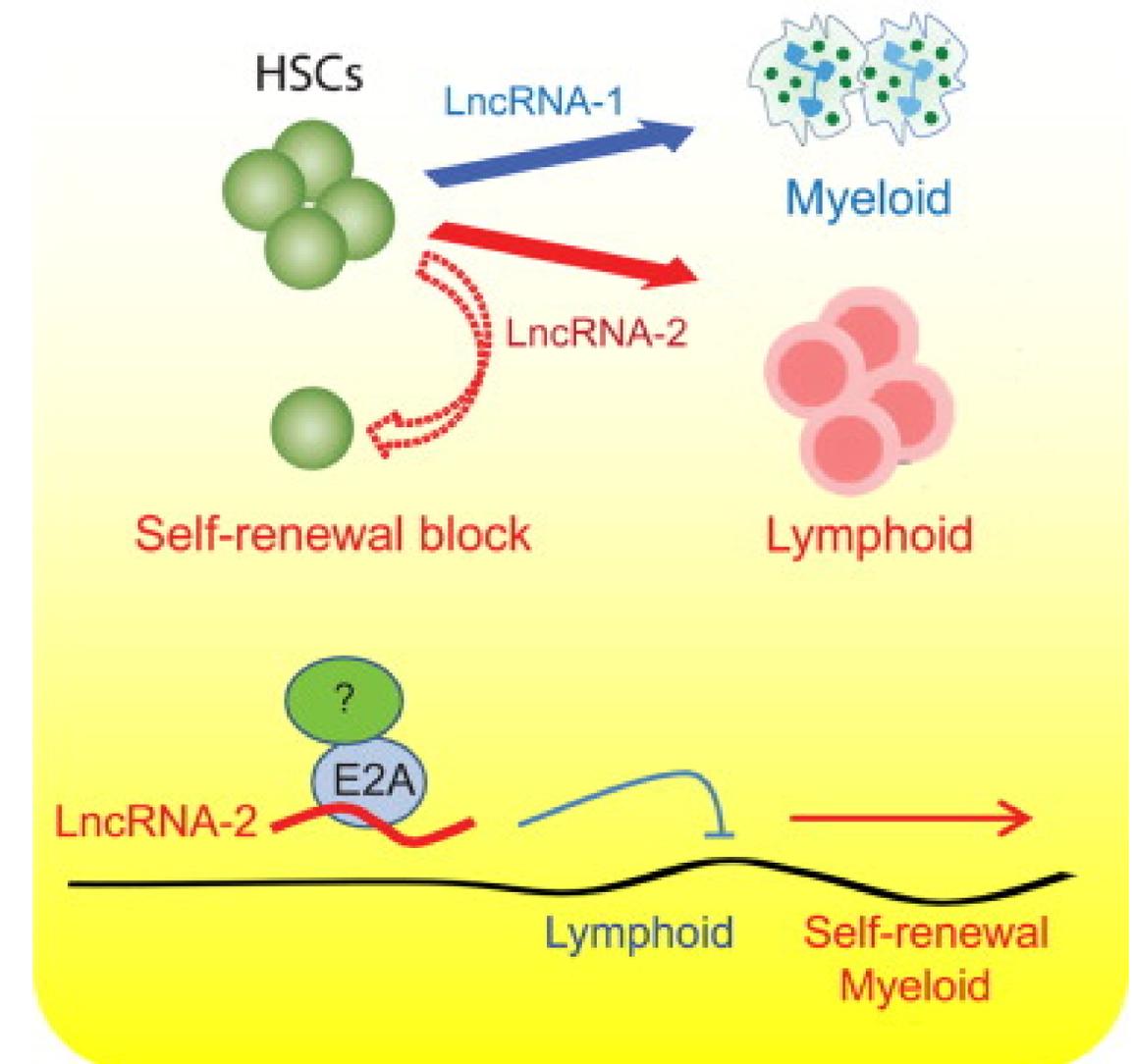
Nível pós-traducional

- **LncRNA HOXA11os** interage com o complexo I da CTE promovendo a homeostase do intestino. Animais nocaute para este lncRNA desenvolvem inflamação intestinal espontânea e são mais susceptíveis à colite ulcerativa.

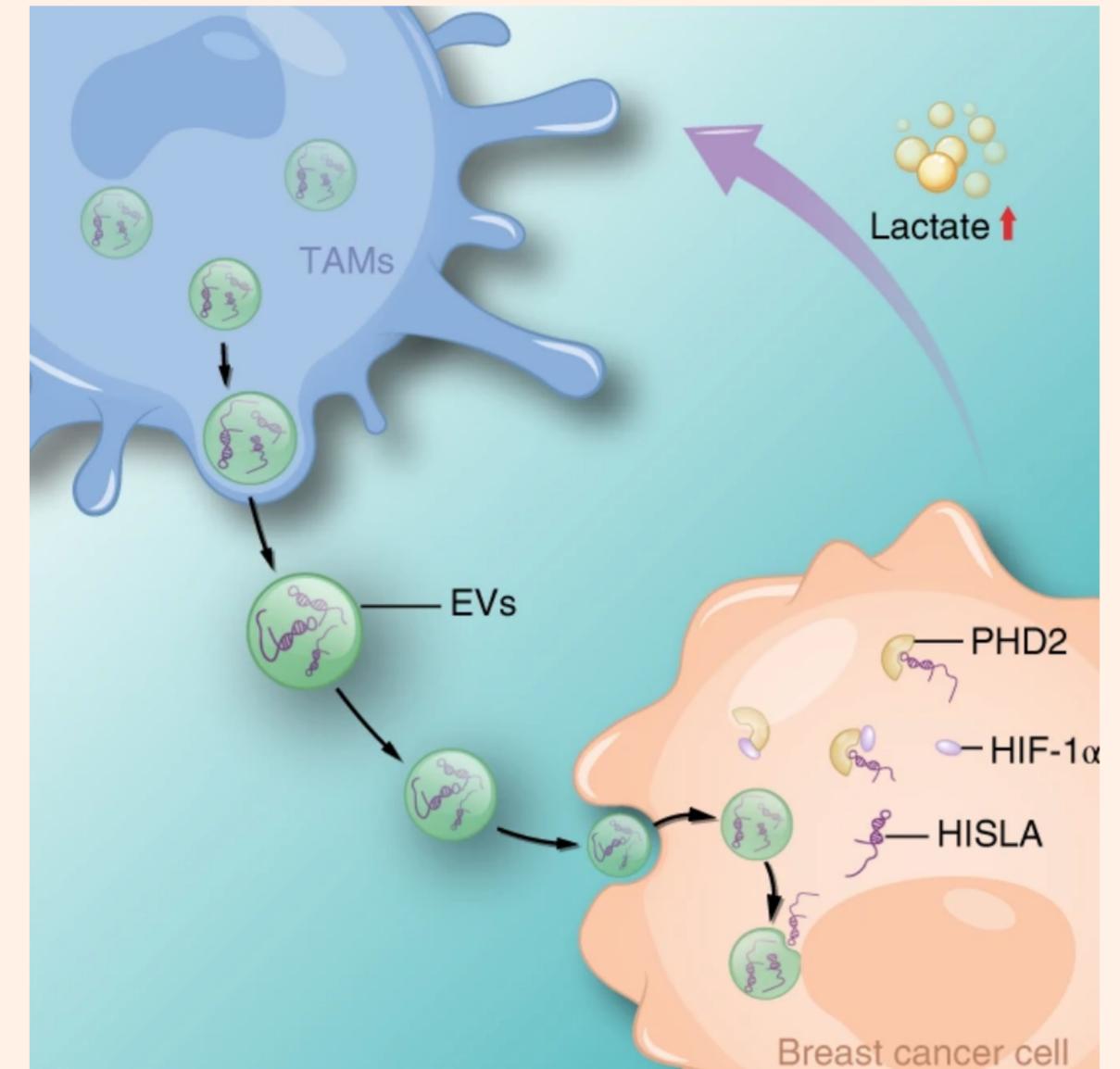


02 RNAs não codificantes na biogênese e diferenciação de células do sistema imune

- **Células tronco hematopoiéticas** lnc-HSC-1 leva à diferenciação de células da linhagem mieloide enquanto o lnc-HSC-2 está envolvido com a renovação das células tronco e diferenciação de células T por mecanismos transcricional por associação com o fator de transcrição E2A.

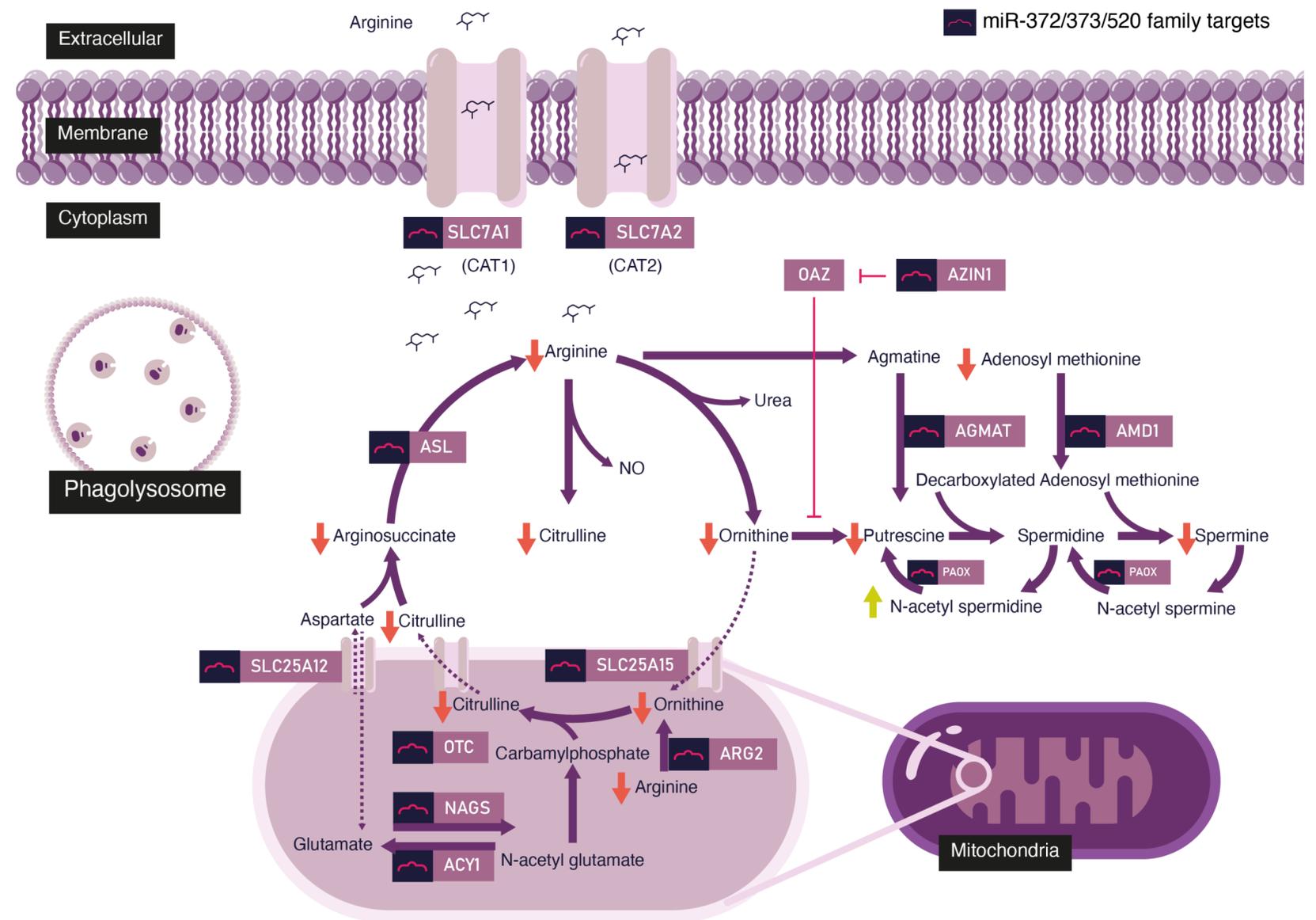


- **Macrófagos associados ao tumor (TAMs)** exportam o lncRNA HISLA em vesículas extracelulares, que por sua vez leva à estabilização de HIF-1 α em células de câncer de mama por impedir a hidroxilação de HIF por PHD2. A inibição desse processo aumenta a sensibilidade a quimioterápicos.

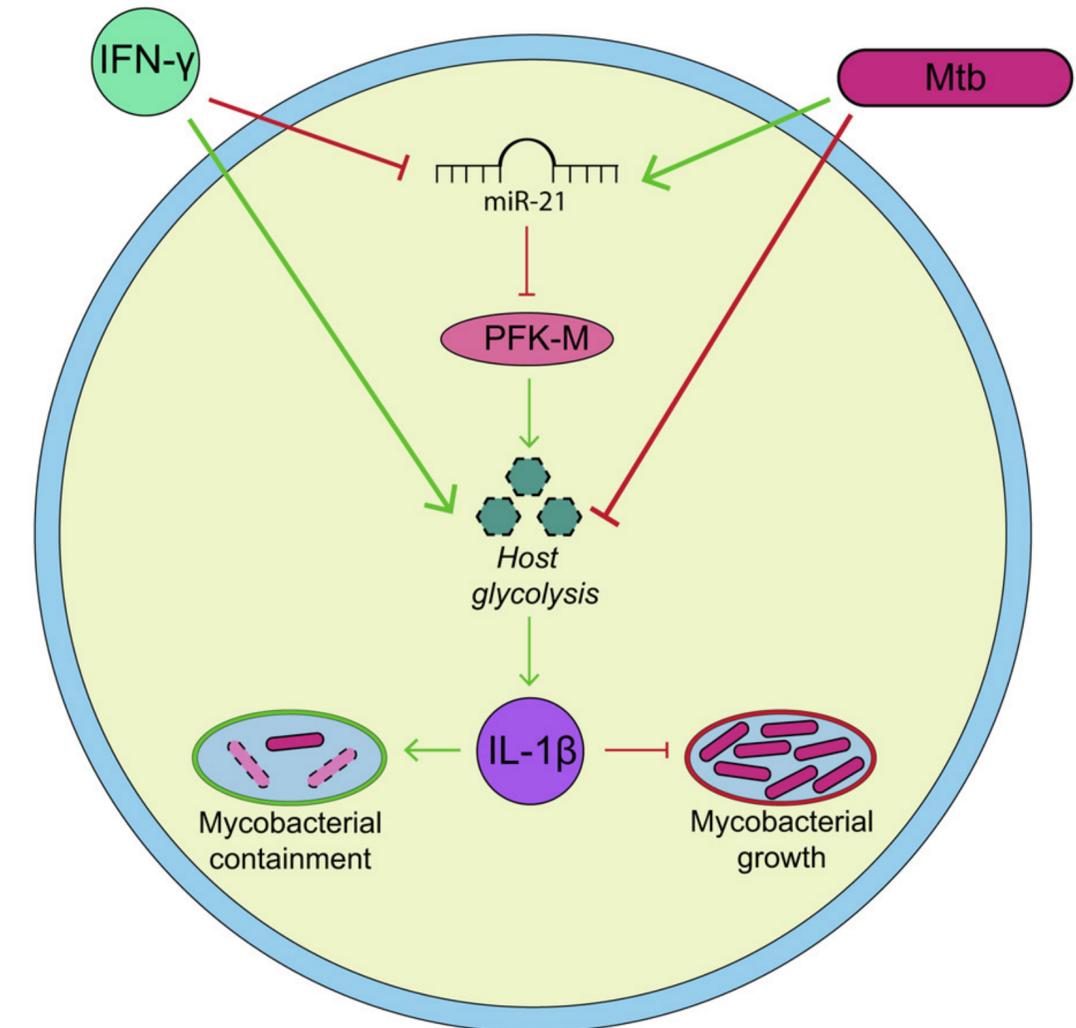


04 RNAs não codificantes em doenças infecciosas

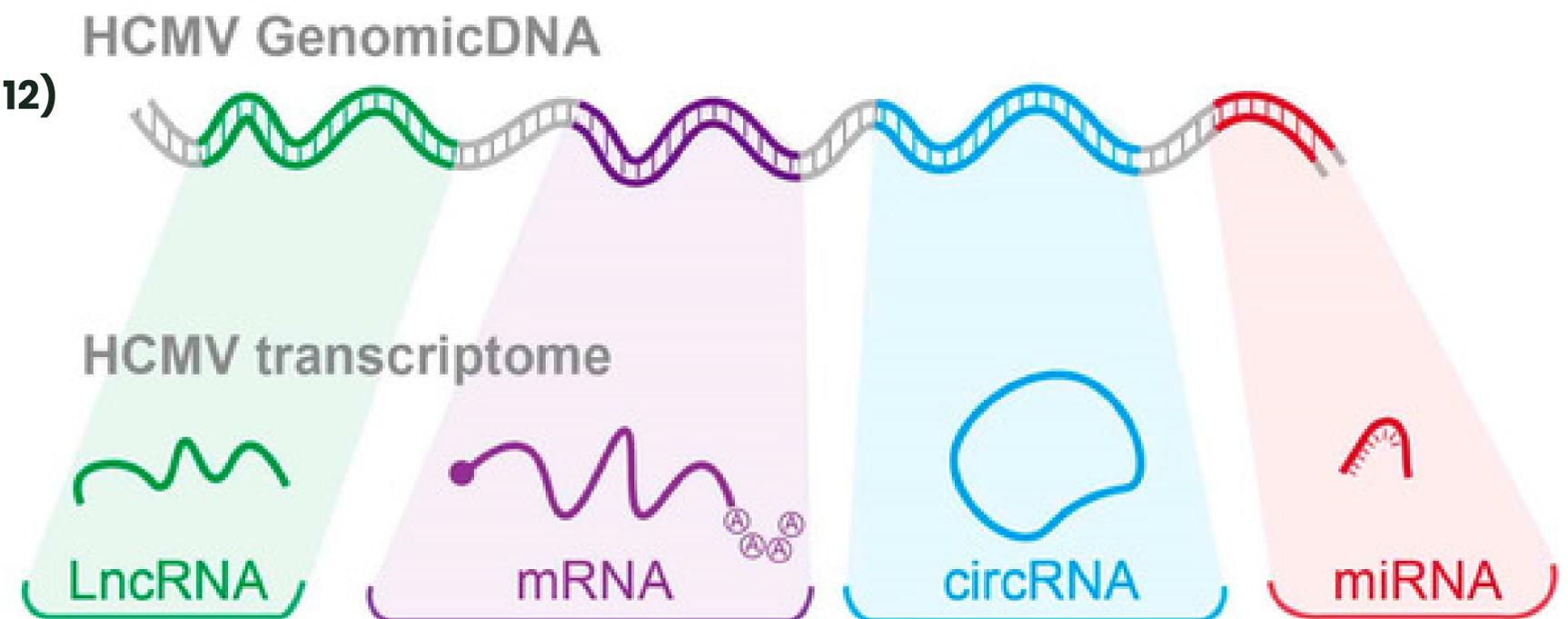
- **Família de microRNAs miR-372/373/520d** é induzida em macrófago durante a infecção por *Leishmania amazonensis* e promove a regulação de diversos alvos alterando o metabolismo de poliaminas em células infectadas e a susceptibilidade à infecção.



- ***Mycobacterium tuberculosis*** promove a expressão do miR-21 na célula hospedeira inibindo a glicólise via redução de PFK-M e a produção de IL-1 β , permitindo o crescimento bacteriano



- **MicroRNA codificado no genoma viral (hcmv-miR-UL112)** tem como alvo o mRNA do hospedeiro MICB essencial para a ativação de células NK e morte da célula infectada.

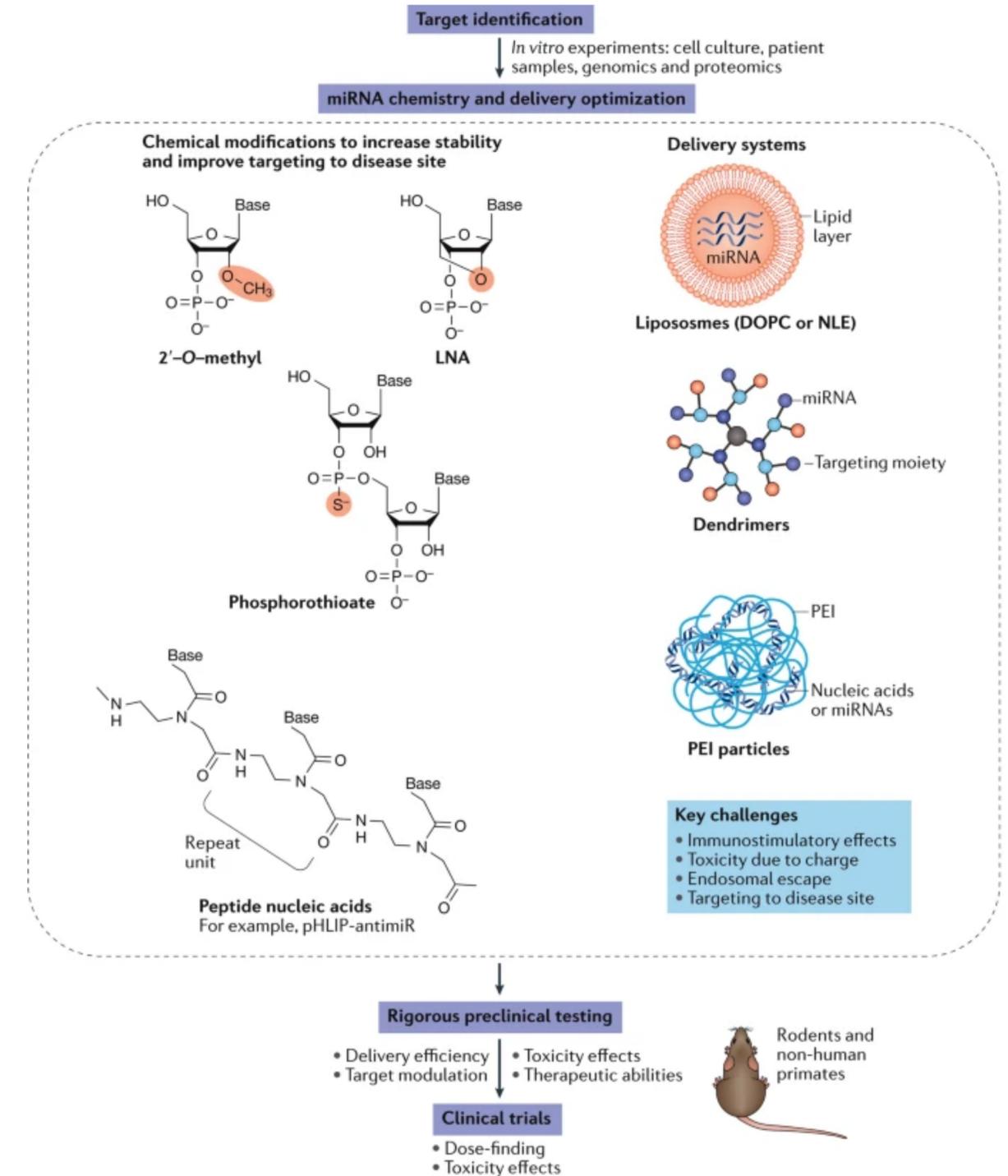


05 RNAs não codificantes no tratamento de doenças

Drug	MiRNA	Drug type	Delivery & combination	Phase	ClinicalTrials.gov Identifier	Cancer type
MRX34	miR-34a	Double-stranded mimic	Liposome nanoparticle	Phase 1 (Terminated)	NCT01829971	Liver cancer, SCLC, lymphoma, melanoma, renal cell carcinoma, NSCLC
			Liposome nanoparticle + Dexamethasone	Phase 1 (Withdrawn)	NCT02862145	Melanoma
TargomiR	miR-16	Double-stranded synthetic mimic	Bacterial minicell (EDVs)	Phase 1 (Completed)	NCT02369198	MPM, NSCLC
MRG-106 (Cobomarsen)	miR-155	LNA-based inhibitor	N/A	Phase 1 (Completed)	NCT02580552	CTCL, CLL, DLBCL, ATLL
				Phase 2 (Early termination)	NCT03713320	CTCL
INT-1B3	miR-193a-3p	Mimic (1B3)	Lipid nanoparticle (LNP)	Phase 1 (Recruiting)	NCT04675996	TNBC, NSCLC, melanoma, colon cancer, HCC
TTX-MC138	miR-10b	Inhibitor (Antisense oligo)	Dextran-coated iron oxide nanoparticles	Preclinical	N/A	Metastatic breast cancer, GBM, pancreatic cancer, SCLC, osteosarcoma
RGLS5579	miR-10b	Inhibitor (Antisense oligo)	Unknown	Preclinical	N/A	GBM

Desenvolvimento de terapias baseadas em miRNAs

- **Modificações químicas:** aumento de estabilidade.
- **Sistema de entrega:** local alvo da doença.



Ferramentas de predição de alvos de miRNAs

- Bases de dados:**

Bases de dados de alvos validados e preditos. Predição com base na sequência 3'UTR ou CDS. Diferentes algoritmos.

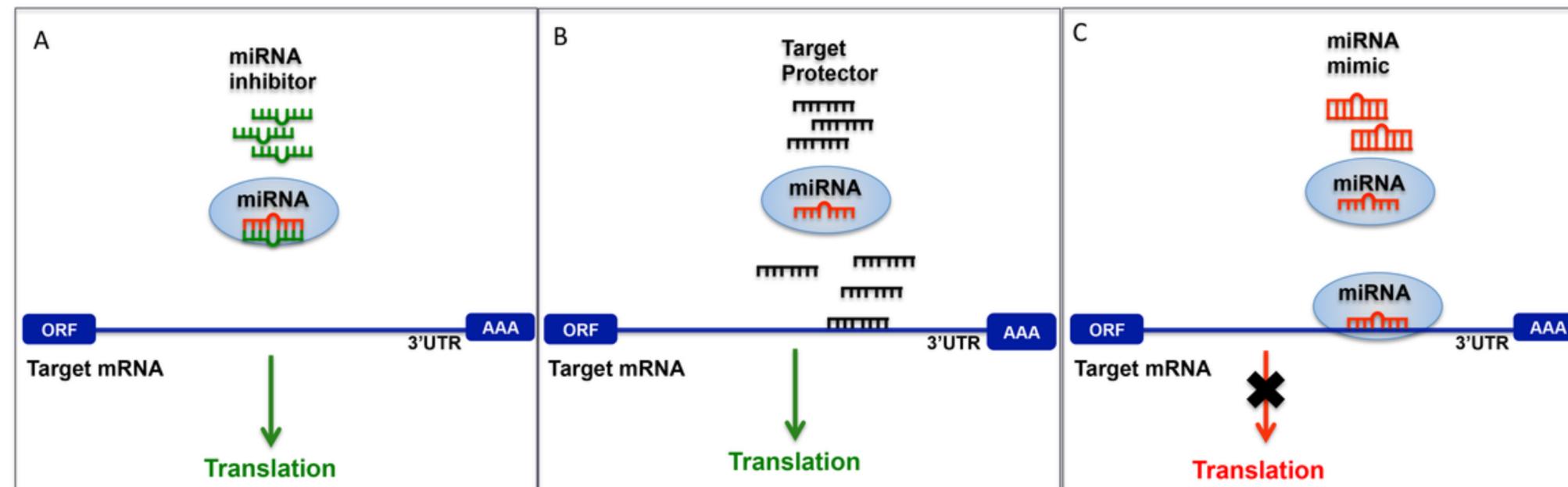
tool name	miRNA database	target prediction algorithm	text mining	tissue expression atlas	miRNA data/sequence analysis	organism
miRDB	•	•				human, rat, mouse, chicken and dog
TargetScan	•	•				human, rat, mouse, and many more
PicTar		•				vertebrate and fly
RNA-hybrid		•				human, fly, worm
miRIAD		•				human, rat, mouse, and many more
DIANA-mirPath		•				human, rat, mouse, and many more
miRTar.human		•				human
miRmap		•				human, rat, mouse, and many more
StarMir	•					human, mouse, worm
ComiRNet		•				human
VIRmiRNA	•	•				virus
miRBase	•					human, viruses, plants and many more
miRBase Tracker	•					human, viruses, plants and many more
FirePlex Discovery Engine	•		•			human, rat, mouse, and many more
miROrtho						human, mouse, fly
DIANA tools	•	•				human, rat, mouse, and many more
miRCancer			•			human
miRWalk	•	•				human, rat, mouse

<https://www.tamirna.com/micrnas-web-based-tools/>

Validação da interação 3'UTR-miRNA

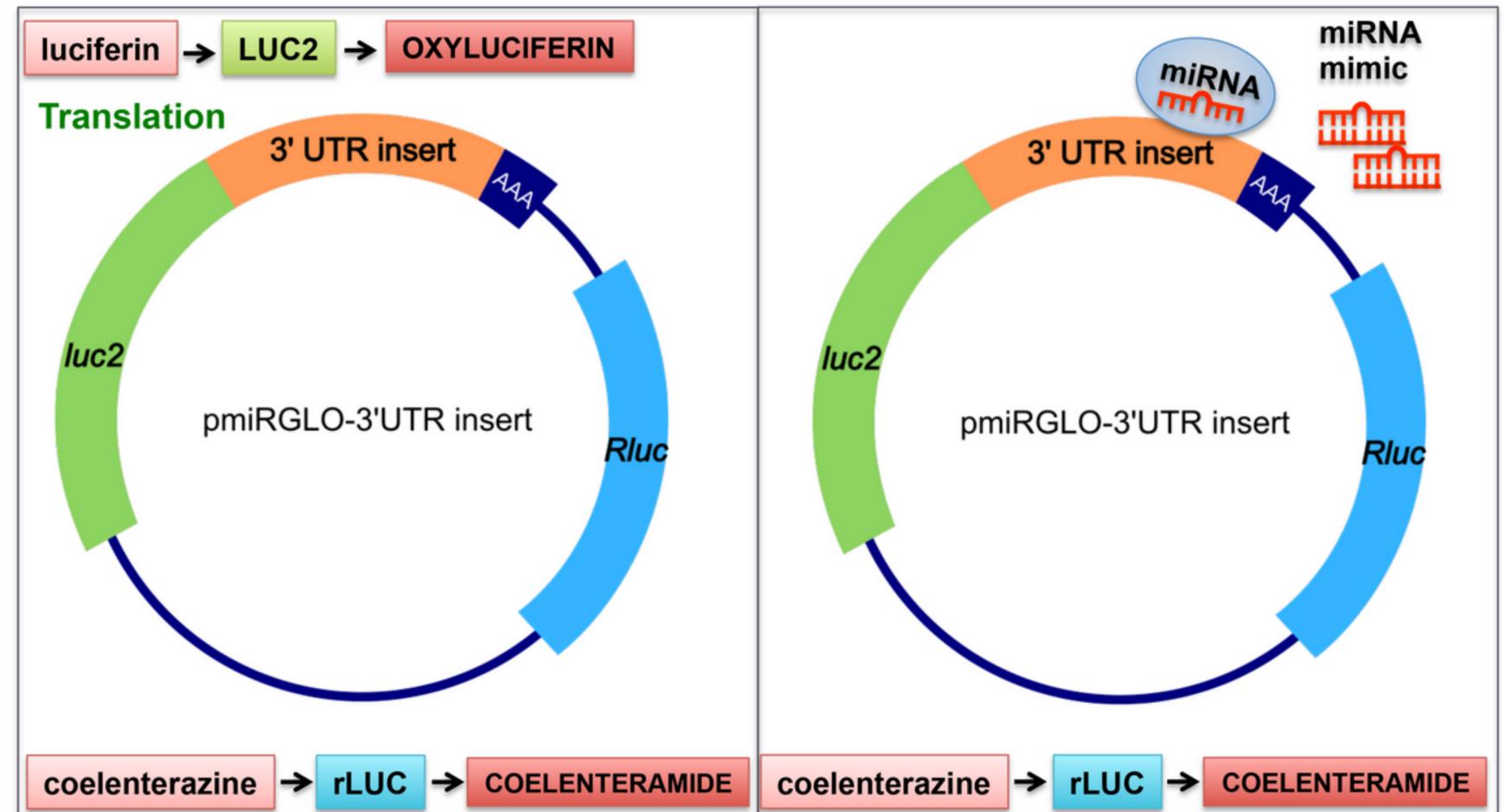
- **Inibidores de miRNAs:** Oligonucleotídeos complementares ao miRNA de interesse impedem a associação ao alvo.
- **Protetor de alvo de miRNAs:** Moléculas complementares ao alvo que não se associam ao RISC e impedem o reconhecimento da sequência complementar ao miRNA.
- **Mímicos de miRNAs:** Moléculas precursoras de miRNA dupla fita associam-se ao complexo RISC e amplificam a ação do miRNA .: Redução do alvo

Em todos os casos deve-se transfectar um oligonucleotídeo "scramble" (de sequência aleatória) como controle do ensaio



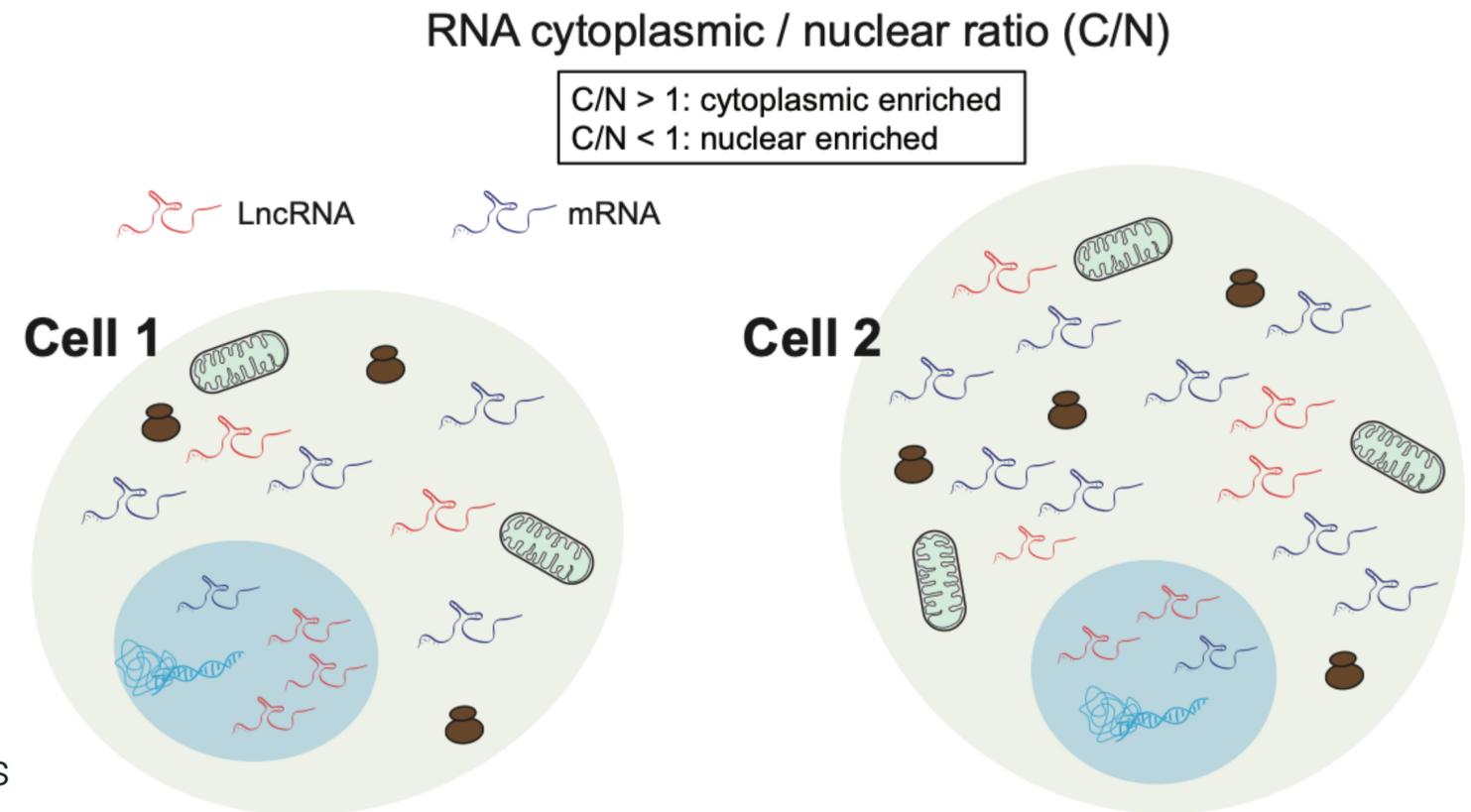
Validação da interação 3'UTR-miRNA

- **Luciferase controlada por 3'UTR:** Clonar 3'UTR do gene de interesse e controle com mutação na sequência seed. Transfectar mímicos do miRNA de interesse e analisar a luminescência resultante normalizando o dado pela luciferase expressa constitutivamente no vetor.



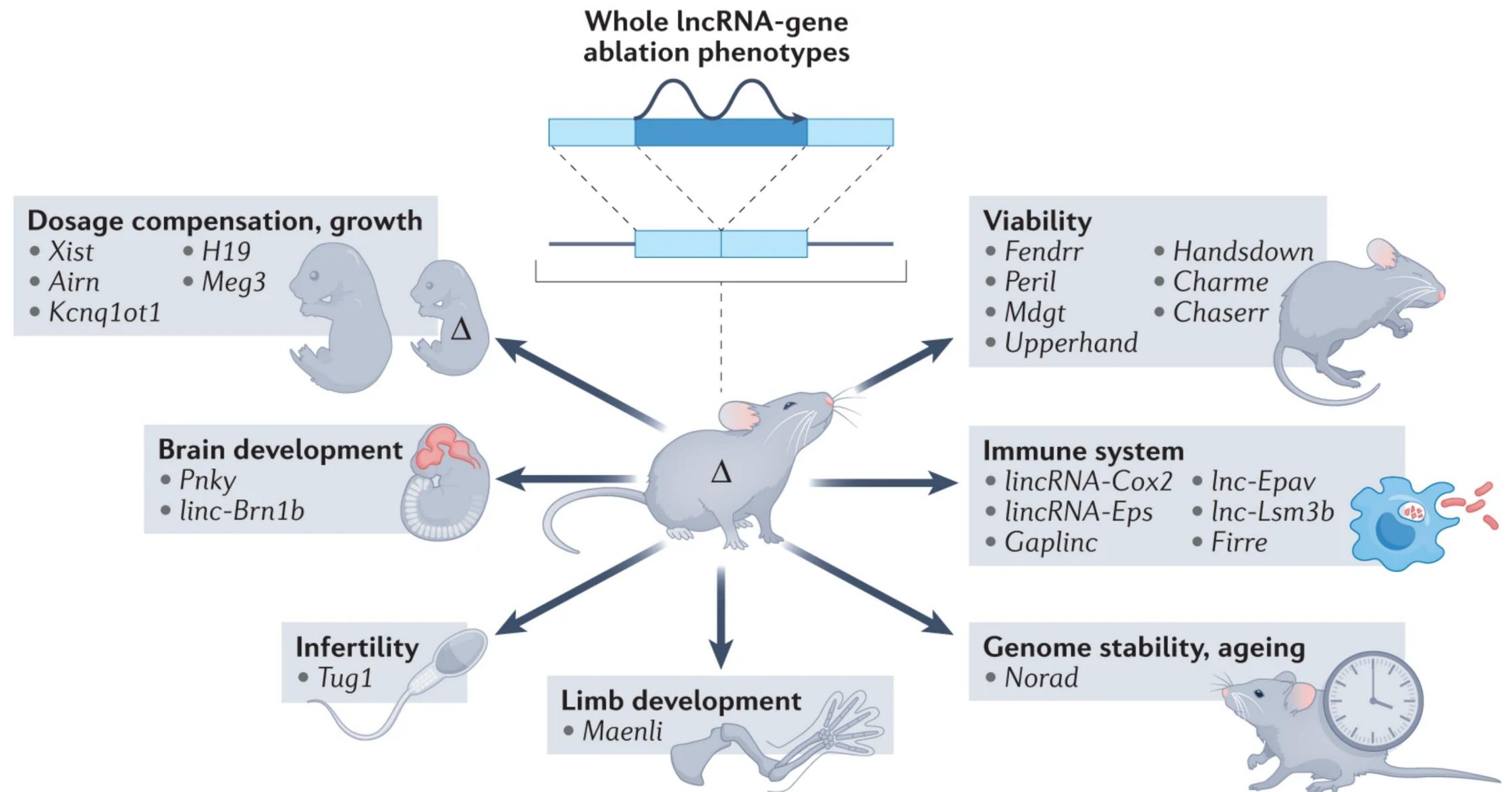
Localização subcelular de lncRNAs

- **Banco de dados:** lncRNA atlas baseado na concentração relativa em amostras isoladas de núcleo e citoplasma.
- **Fracionamento:** Organelas são fracionadas em gradientes e a quantidade do lncRNA é quantificada por qRT-PCR. Depende da disponibilidade de protocolos e da pureza dos isolados.
- **FISH (Fluorescent In Situ Hybridization):** Incubação com probes complementares ao RNA de interesse marcadas (fluorescentes).



- **Função:** lncRNAs atuam dependente de sua localização.
- **Abordagens metodológicas:** Utilizar RNAi funciona bem para interrogar a função de lncRNAs citoplasmáticos, mas não os nucleares. Plasmídeos de superexpressão geralmente falham em manter a localização nuclear de lncRNAs.

Função in vivo

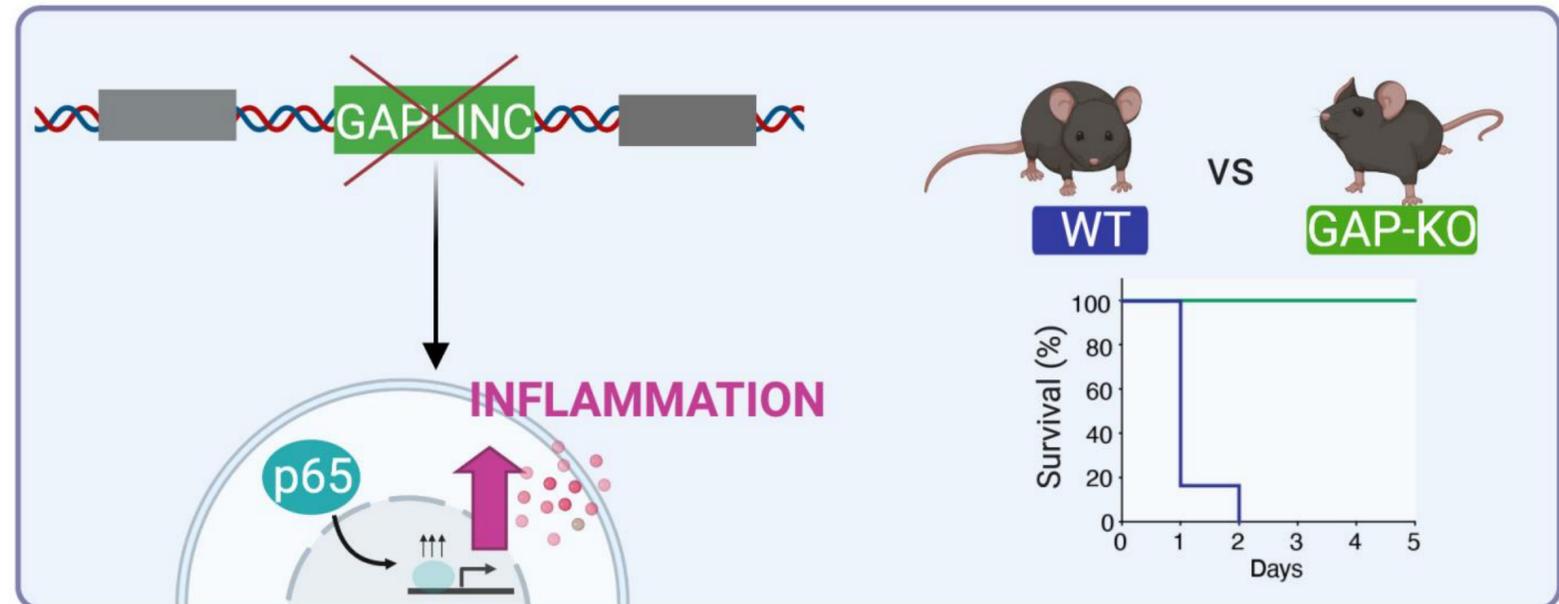
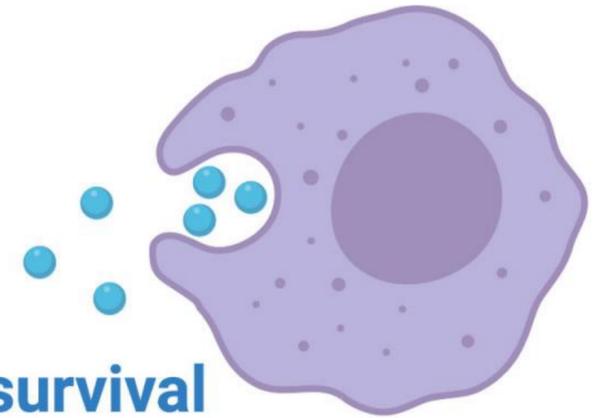


Função in vivo

- **Modelos nocautes:** Modelos animais nocautes de lncRNA ou miRNA são úteis para interrogar sua função em doenças inflamatórias in vivo. Porém, muitos RNAs não codificantes são essenciais no desenvolvimento. Ainda, miRNAs geralmente apresentam funções redundantes e a deleção pode não apresentar efeitos fenotípicos claros.

GAPLINC

GAPLINC depletion leads to increased inflammation and survival



Juliane Cristina Ribeiro Fernandes

juliane.cristina.fernandes@usp.br