

## Análises dos domínios genômicos de localização de genes dos RNAs não codificantes Y RNA e sbRNA.

Katharina Tanaka<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nivaldo Natalino Banho Junior<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Daniel Caligari<sup>2</sup> (Co-orientador), Flávio Augusto Vicente Seixas<sup>3</sup> (Co-orientador), Maria Aparecida Fernandez<sup>1</sup> (Orientador), e-mail: ra119891@uem.br

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, PBC/UEM; <sup>3</sup>Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, campus de Umurama, Umuarama, PR.

### Ciências Biológicas/Bioquímica/Biologia Molecular

**Palavras-chave:** Y e sbRNA, Y RNA-like, bioinformática

#### Resumo

Os Y RNAs são um grupo de moléculas pertencentes aos RNAs não codificantes (*non-coding* RNAs; ncRNAs), sendo descritos como essenciais para a iniciação da replicação do DNA cromossômico em vertebrados. Os *stem-bulge* RNAs, sbRNAs, são genes homólogos aos Y RNAs e ambas as moléculas apresentam estrutura secundária em *haste-loop*, com motivos de ligações para diversas proteínas, e uma sequência essencial para o processo de replicação do DNA. Os sbRNAs foram descritos inicialmente em nematoides, *in silico* em *Anopheles gambiae* e, *in silico* e *in vivo*, em *Bombyx mori* e *Drosophila melanogaster*. Em *D. melanogaster* dois sbRNAs, Dm1 e Dm2, foram certificados experimentalmente e determinado que somente o Dm1 é essencial na iniciação da replicação do DNA humano *in vitro*. Os Y RNAs de humanos, hY1, hY3, hY4 e hY5, são localizados em um único domínio gênico no cromossomo 7, assim como os genes descritos em outros vertebrados. Entretanto, chY1, 3, 4 e 5 de hamster Chinês, não estão alocados no mesmo domínio, mas em 3 cromossomos diferentes. O mesmo resultado descrevemos para os sbRNAs de insetos que analisamos. Os resultados referentes à identidade do alinhamento de chYRNAs a hY genes, máxima identidade (100%) foi detectada ao hY5, 90% e 84% respectivamente, aos chY1 e chY4 e a menor identidade, 74%, para o chYRNA3. Em relação aos sbRNAs em insetos, as maiores identidades foram observadas entre o Dm1 de *D. melanogaster* e *BmsbRNA* de *B. mori* (56%) e este último com o sbRNA de *C. elegans*, gene CeN72, com 52%.

#### Introdução

Os Y RNAs foram inicialmente detectados como ribonucleoproteínas, encontrados associados às proteínas Ro60 e La (Hendrick et al., 1981). Para humanos, foram descritos quatro genes de Y RNAs, hY1, hY3, hY4, hY5, constituídos de 80 a 112 nucleotídeos e transcritos a partir pela RNA polimerase III (revisão em Kowalski e

Krude, 2015). Desde a descoberta deste grupo de ncRNAs, são analisadas as principais funções nas células e a relação com as suas estruturas. Neste contexto, segundo descrito em Kowalski e Krude (2015), os hY RNAs podem atuar licenciando o início da replicação do DNA cromossômico. Entre os vertebrados, foram descritos para *Cricetulus griseus* (hamster Chinês) quatro genes homólogos, chY1, chY3, chY4 e chY5 (Lima Neto et al., 2016). Diferentemente de humanos, somente a expressão dos genes ChY1 e ChY3 foram detectadas em células em cultura GMA32 de *C. griseus* (Lima Neto et al., 2016). Apesar desses dois únicos genes expressos, foi descrito que todos os genes chY, quando experimentalmente expressos, são essenciais para o licenciamento do início da replicação em DNA humano *in vitro*, substituindo os hY RNAs (Lima Neto et al., 2016). Baseado nas principais funções já descritas dos Y RNAs, e os principais domínios destas moléculas, a estrutura de um *Loop Domain* é sempre presente e com grande variação em sua sequência. Na estrutura molecular do Y RNA, o *Lower Stem Domain* é o local de ligação da proteína Ro60 e está envolvido a respostas ligadas ao estresse celular e com o controle da estabilidade e degradação do RNA. Por fim, tem-se um sítio de ligação uma cauda 3'poly (U), local onde ocorre a ligação da proteína La, fundamental para a terminação da transcrição a partir da RNA polimerase III. Os genes dos Y RNAs são conservados em tetrápodes, sendo encontrados em clusters únicos, cujos genes são flanqueados em genes homólogos em inúmeras espécies. Genes homólogos aos Y RNAs, os *stem-bulge* RNAs, sbRNAs, foram primariamente descritos para nematoides (revisão em Kowalski e Krude, 2015). Em insetos, sbRNAs foram descritos *in silico*, em *Anopheles gambiae*, *in vitro* em *Bombyx mori*, *BmsbRNA* (Duarte Junior et al., 2015) e por análise funcional *in vitro* em *D. melanogaster*, genes Dm1 e Dm2 (Duarte Junior et al., 2019). Nessa área de pesquisa, o objetivo deste projeto é a análise de sequências e localização dos Y e sbRNAs. A identidade dessas sequências contribuirá no conhecimento de regiões onde genes homólogos a esses ncRNAs poderão ser detectados em diferentes genomas.

## Materiais e Métodos

A sequência do hY de humanos (Y1, NR\_004391.1; Y3, NR\_004392.1; Y4, NR\_004393.1; Y5, NR\_1571.2; e RNA-like de *A. gambiae* e outros YRNAs de vertebrados foram obtidos por citação em Duarte Junior et al. (2019). Da mesma forma, as sequências dos sbRNAs de nematóides foram citados em Kowalski e Krude et al. (2015). Os sbRNAs de *B. mori* e *D. melanogaster* estão descritos em Duarte Junior et al., 2015; 2019. As sequências foram armazenadas em formato ".fasta", e foram alinhadas utilizando o *software* de alinhamento local múltiplo clustalW, em seus parâmetros *default* (disponível no link <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

Foram detectadas as sequências no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com o algoritmo blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando as sequências dos Y e sbRNAs como *input* com os parâmetros *default*. Os resultados foram analisados,

procurando o *match* nos dados genômicos depositados para as espécies em questão.

## Resultados e Discussão

A partir da busca no banco de dados *NCBI* com o software *BLAST*, obteve-se as sequências dos genes de interesse e sua localização cromossômica. Genes *chY*s de *C. griseus*: alocados com 100% de identidade em diferentes cromossomos em fragmentos descritos no banco de dados biológicos referentes ao genoma desse mamífero. O *chY1* (JX559781.1), de 110 nucleotídeos, foi detectado em segmento do cromossomo 8 da linhagem 17A/GY (NC\_048601.1), localizado na fita codificadora, posição 99.418.147 – 99.418.256. Já para o gene *chY3* (JX976178.1), 102 nucleotídeos, observou-se sua localização genômica no mesmo cromossomo descrito para o *chY1*, mas presente na fita complementar, posição 99.423.129 – 99.423.028. O gene *chY4* (JX976179.1), 91 nucleotídeos, alinhou-se com um fragmento do cromossomo 2 da linhagem 17A/GY (RAZU02000003.1), alocado na fita complementar, posição 244.659.634 – 244.659.544. A sequência do gene *chY5* está alocado no fragmento do cromossomo 1 da linhagem 17A/GY (RAZU02000001.1), localizado na fita codificadora, posição 228.255.169 – 228.255.252. Sequências de quatro diferentes genes putativos de YRNA-like para *A. gambiae*, foram detectadas com 100% de identidade, nos respectivos cromossomos: *AgY1* no Chr 3R de 85 nucleotídeos foi detectado na linhagem PEST (AAAB001008984.1) na posição 2675243 – 2675159 da fita complementar 3' – 5'. O gene *AgY2* no chr3L de 94 nucleotídeos foi detectado na linhagem PEST (AAAB01008849.1) na posição 2.853.760 – 2.853.853 da fita codificadora, 5'-3'. No cromossomo 2R foram identificados dois genes. *Ag3* chr2L, de 132 nucleotídeos, foi detectado também na linhagem PEST (AAAB01008960.1), na posição 2.858.812-2.858.943 na fita codificadora. O gene *Ag4* no chr2L, de 119 nucleotídeos, foi detectado no mesmo segmento genômico, mas na fita complementar, posição 1.378.983-1.378.865. O gene *stem-bulge* sbRNA de *B. mori* (MN654364.1), de 57 nucleotídeos) foi detectado com 100% de identidade, na fita codificadora (posição 15.748 – 15.804) no cromossomo 4 (AP009009). Genes sbRNA em *D. melanogaster* foram identificados com 100% identidade em diferentes cromossomos: gene *Dm1* (MN654365.1) de 85 nucleotídeos, foi localizado no cromossomo X (AE014298.5), presente na fita complementar, ou seja, sentido 3' - 5' (posição 16.633.208 - 16.633.124). O gene *Dm2* (MN661249.1), de 89 nucleotídeos, foi detectado alocado no cromossomo 3L (AE014296.5), presente na fita codificadora (posição 12.435.720 – 12.435.808). Os resultados de todos os alinhamentos foram realizados, mas com o espaço no resumo não é possível colocar as figuras, por isso são descritos os dados obtidos. Os resultados referentes à identidade do alinhamento de *chYRNAs* de hamster Chinês foram significativas em relação aos *hYRNAs* de humanos. Os *chYRNAs* 5 e 1 apresentam 100%, e 90%, respectivamente. Em relação aos *chYRNA4* foi detectado 84% e a menor identidade foi de 74% para o *chYRNA3*. Na matriz de identidade dos sbRNAs alinhados, é observado uma identidade muito reduzida. Os únicos acima de 50% é

o descrito em *B. mori* (*BmsbRNA*) de valor 56% em relação ao sbRNA comprovado como homólogo ao Y RNAs humano em funcionalidade, o sbRNA Dm1 de *D. melanogaster* (Duarte Junior et al., 2019). Outra identidade de 52% foi detectada entre os genes de *C. elegans* CeN72 e o *BmsbRNA* de *B. mori*.

### Conclusões

Os resultados obtidos apresentam uma variabilidade de localização dos genes analisados de chYRNAs, assim como entre os sbRNAs de insetos, não caracterizando a existência de clusters como descritos para hYRNAs de humanos e outros organismos previamente analisados. A identidade é forte e significativa para os genes de chYRNAs em relação aos hYRNAs de humanos, caracterizando a funcionalidade homóloga que desempenham. Entretanto, a identidade entre os sbRNAs de insetos e um gene em *C. elegans*, se apresentou muito reduzida e pode caracterizar que somente o *BmsbRNA* de *B. mori* e Dm1 de *D. melanogaster*, podem apresentar moléculas com funcionalidade associada a verdadeiros sbRNAs.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro, aos meus co-orientadores, Daniel Caligari e Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas e à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Fernandez, por toda orientação e auxílio na realização do trabalho.

### Referências

Duarte Junior, F. F; Bueno, P. S. A. B; Pedersen, S. L; Rando, F. S; Pattaro Junior, J. R; Caligari, D; Ramos, A. C; Polizelli, L. G; Lima, A. F. dos S; Lima Neto, Q. A; Krude, T; Seixas, F. A. V; Fernandez, M. A. Identification and characterization of stem-bulge RNAs in *Drosophila melanogaster*. *RNA Biology.*, 2019, 16, 3, 330–339.

Duarte Junior, F. F; Lima Neto, Q. A; Rando, F. S; Freitas, D. V. B; Pattaro Junior, J. R; Polizelli, L. G; Munhoz, R. E. F; Seixas, F. A. V; Fernandez, M. A. Identification and molecular structure analysis of a new noncoding RNA, a sbRNA homolog, in the silkworm *Bombyx mori* genome. *Mol. BioSyst.*, 2015, 11, 801-808.

Hendrick, J. P; Wolin, S. L; Rinke, J; Lerner, M. R; Steitz, J. A. Ro Small Cytoplasmic Ribonucleoproteins Are a Subclass of La Ribonucleoproteins: Further Characterization of the Ro and La Small Ribonucleoproteins from Uninfected Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology.*, 1981, 1 (12), 1138-1149.

Kowalski, M. P; Krude, T. Functional roles of non-coding Y RNAs. *Inter. J. of Biochem. & Cell Biol.*, 2015, 66, 20–29.

Lima Neto, Q. A; Duarte Junior, F. F; Bueno, P. S. A; Seixas, F. A. V; Kowalski, M. P; Kheir, E; Krude, T; Fernandez, M. A; Structural and functional analysis of four non-coding Y RNAs from Chinese hamster cells: identification, molecular dynamics

31º Encontro Anual de Iniciação Científica  
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de  
**2022**

simulations and DNA replication initiation assays. *BMC Molecular Biol.*, 2016, 17 (1), 1-9.