



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Produção *in silico* de uma plataforma de edição gênica em bovinos

In silico design of a gene editing platform in bovine

Victor Gabriel de Faria Pastre* e Flavia Regina Oliveira de Barros†

RESUMO

O CRISPR-Cas9 é a ferramenta de edição genômica mais utilizada atualmente para modificações em células animais. A entrega para as células do material genético essencial para o uso da ferramenta segue sendo a prática mais laboriosa desta técnica, uma vez que se necessitam longas sequências de DNA. A expressão endógena da enzima Cas9 em animais geneticamente modificados é uma alternativa capaz de reduzir o material necessário para aplicação da ferramenta. Assim, este trabalho objetivou a seleção e manipulação *in silico* de sequências de DNA para estabelecimento de uma plataforma de edição gênica em células bovinas geneticamente modificadas baseada no sistema CRISPR-Cas9. O design da plataforma foi construído baseado na literatura, considerando potenciais efeitos prejudiciais às células bovinas. Os elementos necessários foram definidos e os plasmídeos contendo-os foram obtidos através de doações de laboratórios de pesquisa, sendo clonados e armazenados em linhagens específicas de *E. coli*. As sequências genômicas e mapas dos plasmídeos foram obtidas nos bancos de dados GenBank e AddGene. A análise dessas sequências foi realizada utilizando os softwares de biologia molecular SnapGene e Serial Cloner, definindo os primers necessários para construção do vetor molecular e do fragmento para recombinação homóloga da plataforma de edição gênica.

Palavras-chave: Engenharia genética, CRISPR-Cas9, edição gênica.

ABSTRACT

CRISPR-Cas9 is currently the most widely used genomic editing tool to modify animal cells. The delivery of the essential genetic material for the use of the tool to the cells continues to be the most laborious practice of this technique since long DNA sequences are required. The endogenous expression of the Cas9 enzyme in genetically modified animals is an alternative capable of reducing the material needed for this tool. Thus, this work aimed the *in silico* selection and manipulation of DNA sequences to establish a gene editing platform in genetically modified bovine cells based on the CRISPR-Cas9 system. The platform design was built based on the literature, considering potential harmful effects on bovine cells. The necessary elements were defined and the plasmids containing them were obtained through donation from research laboratories, being cloned and stored in specific *E. coli* strains. Genomic sequences and plasmid maps were obtained from GenBank and AddGene databases. The analysis of these sequences was performed using the molecular biology softwares SnapGene and SerialCloner, defining the necessary primers to build the molecular vector and the homologous recombination fragment of the proposed gene editing platform.

Keywords: Genetic engineering, CRISPR-Cas9, gene editing.

1 INTRODUÇÃO

O sistema de edição genética denominado CRISPR-Cas tem sua origem em um mecanismo de algumas bactérias para combater a infecções por fagos. As bactérias armazenam sequências virais específicas em seu

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; victorpastre@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; flaviabarros@utfpr.edu.br



próprio genoma, separando-as com repetições palindrômicas, sendo que tais sequências podem ser utilizadas posteriormente para a defesa da célula contra um vírus que já a tenha infectado. Esse conjunto de dados na forma de material genético atua como uma espécie de memória imunológica (REDMAN et al., 2016).

Ao ser infectado por um vírus, a bactéria que possui o sistema CRISPR-*Cas* passa a expressar uma enzima nuclease denominada *Cas* (do inglês *CRISPR associated*) e transcrever as sequências virais armazenadas juntamente com uma sequência molde, formando uma molécula de RNA denominada RNA-guia (gRNA). A enzima em conjunto com o gRNA forma um complexo ribonucleoproteico capaz de reconhecer por homologia unicamente a sequência viral que deu origem ao gRNA e realizar a clivagem da molécula de DNA onde tal sequência se encontra. Desse modo, o sistema é capaz de promover a inativação do vírus levando a bactéria a sobreviver a infecções de determinada espécie ou variante viral (ADLI, 2018).

A CRISPR-*Cas9* é baseada nesse mecanismo, sendo a versão mais utilizada da ferramenta. Através dela é possível realizar clivagens especificamente guiadas, através das quais é possível promover edições genômicas precisas em nível molecular, sendo a principal ferramenta da biologia molecular atualmente. A versatilidade do sistema se dá pela capacidade de alteração do alvo da clivagem através da simples troca da sequência do gRNA (ZHANG; WEN; GUO, 2014).

A ferramenta tem sido aplicada em pesquisas sobre funções de genes, correção de doenças genéticas, melhoramento animal e vegetal, inativação de vírus e desenvolvimento de organismos geneticamente modificados através da realização de *knock-in* de sequências, *knock-out*, silenciamento e ativação de genes, utilizando, para isso, os mecanismos celulares de reparo às moléculas de DNA das próprias células (BARRANGOU; DOUDNA, 2016).

Dentre as maiores dificuldades na aplicação da CRISPR-*Cas9* destaca-se a introdução dos vetores moleculares necessários para a expressão dos elementos que compõe o sistema. Esse fato se deve a enzima *Cas9* ser originada por uma longa sequência de nucleotídeos, além das sequências para o gRNA e, em casos de estudos de inserção de sequências no genoma de um organismo, o fragmento molde para recombinação homóloga (LINO et al., 2018).

Uma possível forma de contornar a dificuldade de entrega do maquinário para aplicação da CRISPR-*Cas9* é através do estabelecimento de linhagens celulares que possuam e expressem o gene que origina a enzima *Cas9* em seu próprio genoma (RIEBLINGER et al., 2021). Dessa forma, é necessário apenas a entrega do material genético do gRNA para a realização das clivagens desejadas, reduzindo consideravelmente o tamanho das sequências que se necessita introduzir nas células a serem modificadas.

Assim sendo, este trabalho objetivou a seleção e manipulação *in silico* de sequências de DNA para estabelecimento de uma plataforma de edição gênica em células bovinas geneticamente modificadas baseada na utilização do sistema CRISPR-*Cas9* para inserção permanente do gene da enzima *Cas9* no genoma bovino com expressão regulada por um promotor induzível.

2 MÉTODO

2.1 *Knock-in* no genoma bovino

A plataforma de edição gênica baseia-se na expressão endógena induzível da nuclease *Cas9* pelas células modificadas, sendo necessário que a sequência codificante dessa enzima seja inserida permanentemente no genoma bovino, em uma posição que não afete nenhum processo metabólico das células. Para isso, será utilizado o próprio sistema CRISPR-*Cas9*, o qual, uma vez dentro da célula, deve promover a clivagem da fita dupla de DNA na posição onde o gene da *Cas9* será introduzido.



A definição da posição exata foi realizada baseada na literatura e considerando potenciais efeitos prejudiciais da interrupção da sequência de DNA nativa à célula hospedeira, como a presença de genes e reguladores de expressão no local, além de possíveis sequências *off-target* que podem gerar mutações indesejadas.

O plasmídeo pX330 spCas9-mSA (Addgene #113096) foi definido como o vetor molecular para a entrega do material genético para produção da enzima *Cas9* que deve clivar o genoma bovino e do gRNA selecionado. Através da identificação da posição adequada no genoma bovino e da forma de inserção da sequência-alvo no vetor molecular foi realizado o design do gRNA.

2.2 Elementos do sistema de edição gênica

Os elementos genéticos necessários para a construção do sistema de edição gênica foram estabelecidos considerando as sequências fundamentais para a garantia da expressão induzível de uma forma funcional da nuclease *Cas9* e, também, o tamanho do fragmento final que deverá ser inserido no genoma bovino. Para tal, foi selecionada a sequência do gene da *Cas9* da espécie *Streptococcus pyogenes*, presente no próprio vetor molecular pX330, e as sequências do sistema de ativação de expressão gênica em resposta à tetraciclina, sendo elas: uma sequência definida como elemento de resposta a tetraciclina (TRE), tratando-se de 7 repetições de uma mesma combinação de bases, e uma proteína transativadora que, na presença da tetraciclina, forma um complexo com o antibiótico capaz de reconhecer o TRE e estimular a transcrição de genes que se encontram após ele, estando presentes nos plasmídeos pB-TET (AddGene #20909) e pB-rtTA (AddGene #126034, respectivamente).

Os plasmídeos contendo tais sequências foram doados pelos professores Dr. Marcelo Demarchi Goissis, da Universidade de São Paulo, e pelo professor Dr. Bin Gu, da *Michigan State University*.

2.3 Fragmento molde para recombinação homóloga

A partir dos elementos genéticos selecionados e utilizando o software SnapGene, foi montado um fragmento de DNA contendo toda a informação correspondente a codificação da *Cas9* e ao sistema de ativação de transcrição por tetraciclina. Às extremidades desse fragmento foram adicionadas sequências denominadas braços de homologia (BH), correspondentes as regiões imediatamente anterior e posterior ao exato local da clivagem no genoma bovino onde deverá ser introduzida a sequência do sistema de edição gênica, garantindo o reconhecimento desse fragmento pelo mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga da própria célula, o qual o utilizará como molde para correção da sequência nativa.

2.4 Design de primers

Definidos o vetor molecular, sequência-alvo no genoma bovino, plasmídeos contendo os elementos do sistema de edição gênica e os BH, foi realizado o design dos primers para amplificação e adaptação das sequências desejadas para a criação da plataforma. Foi utilizada a ferramenta online PrimerBLAST do NCBI e os softwares de biologia molecular SnapGene e Serial Cloner para manipulação das sequências e construção dos primers. Utilizando os primers desenhados é possível gerar o fragmento molde para recombinação homóloga partindo das sequências escolhidas necessárias para a plataforma presentes nos plasmídeos e no genoma bovino.



3 RESULTADOS

3.1 *Knock-in* no genoma bovino

A região-alvo para a inserção da sequência contendo o sistema de edição gênica foi selecionada utilizando os resultados obtidos por Gao et al., 2017. Nesse estudo, os autores realizaram a inserção de uma sequência longa de DNA no genoma bovino e os animais geneticamente modificados gerados apresentavam elevada expressão do inserido, além de não apresentarem nenhum tipo de perturbação fisiológica causada pela inserção. A partir dos diferentes gRNA utilizados no artigo, o mais adequado foi selecionado, considerando efeitos *off-target* e eficiência de clivagem.

O gRNA selecionado corresponde a uma região intergênica localizada no cromossomo 25 da espécie *Bos taurus taurus* entre os genes da β -actina (ACTB) e da proteína aglutinadora da β -actina (FSCN1). A sequência do gRNA definido foi desenhada adicionando os sítios de restrição da enzima nuclease BbsI às suas extremidades, de modo a permitir sua integração no local adequado direcionado para introdução da sequência do gRNA no plasmídeo pX330. Assim, a inserção do vetor molecular contendo o gRNA nas células bovinas é capaz de promover a quebra da fita dupla na posição desejada.

A partir da definição do alvo específico da clivagem, também foram definidos os braços de homologia que devem constar no fragmento molde de modo que a células possam realizar a recombinação homóloga. Essas sequências correspondem a 857 pares de base (pb) anterior a posição da clivagem e 756 pb posterior a ela, tendo sido inseridas sequências adaptadoras em suas extremidades para ligação dos braços de homologia ao restante dos elementos genéticos do sistema.

3.2 Elementos do sistema de edição gênica

A sequência codificante da enzima *Cas9* ligada a uma sequência de uma proteína verde fluorescente (EGFP) sob controle do promotor de expressão CMV foi obtida do próprio plasmídeo pX330 utilizado como vetor molecular, havendo apenas a necessidade da inserção de sequências adaptadoras para posterior ligação da sequência do gene com o restante dos elementos do sistema de modo a formar o fragmento molde para recombinação homóloga.

O mecanismo de ativação de expressão por tetraciclina se baseia na utilização de uma proteína transativadora que apresenta afinidade pela molécula do antibiótico, complexando-se na sua presença, o que causa modificações estruturais que levam a proteína a reconhecer e se ligar a uma sequência específica. Essa sequência também faz parte do mecanismo desse sistema, sendo que, ao ser reconhecida pelo transativador, promove o estímulo à expressão do gene que se encontrar após essa sequência reguladora (T. DAS; TENENBAUM; BERKHOUT, 2016). As duas sequências que compõe o sistema encontravam-se em plasmídeos separados e para a montagem do fragmento molde foram obtidas a partir de cada um, apenas sendo adicionados os sítios de restrição que possibilitam a sua ligação aos outros elementos gênicos do sistema.

3.3 Design de primers

Os primers desenhados para amplificação de cada elemento do sistema de edição gênica, bem como, para produção do gRNA e amplificação da região do genoma bovino que forma os braços de homologia estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 – Exemplo de quadro.

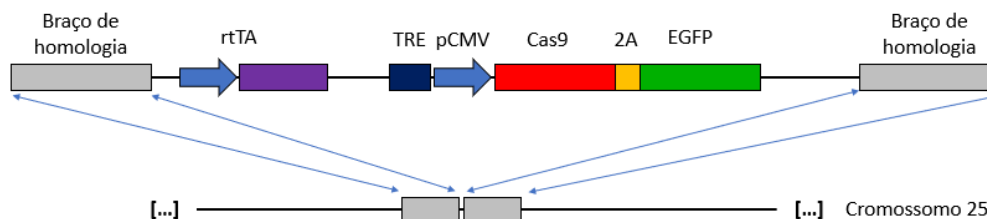
Elemento	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
Braço de homologia esquerdo	5' GACCCGAAGACTTGCTGTGA 3'	5' TGGAGGACCACTAGAAAGGG 3'
Braço de homologia direito	5' CATAGGGCACCTTTGTCCTG 3'	5' GCCTTTGGGCAAGAAAGCAA 3'
TRE	5' TGGCCGCACGTCTCCCTATCA 3'	5' GCCTGGGGTGCCTAATGCGG 3'
rtTA	5' TGAAAACGACGGCCAGT 3'	5' CAGAAAACAGCTATGAC 3'
Cas9 + EGFP	5' CGTTACATAACTTACGGTAA 3'	5' GGATCCAGACGCCGACAGC 3'
gRNA	5' CACCGACAAAGGTGCCCTATGTGG 3'	5' AAACCCACATAGGGCACCTTTGTC 3'

Fonte: Autoria própria (2021).

3.4 Fragmento molde para recombinação homóloga

O fragmento molde a ser entregue para as células visando a criação da plataforma de edição gênica, pode ser visto na figura 2.

Figura 2 – Fragmento contendo o sistema de edição gênica alinhado ao local de inserção no genoma



Fonte: Autores (2021)

Os diferentes elementos que compõe o sistema de edição gênica puderam ser unidos devido aos primers específicos desenvolvidos pelos autores que contavam com a adição de bases que formavam sítios de restrição da nucleases pré-definidas nas extremidades dos fragmentos que deveriam se unir. Uma vez inserida tal sequência no genoma bovino, o estímulo pelo uso do antibiótico tetraciclina pode regular de maneira precisa a expressão da enzima *Cas9*, sendo ativada quando necessária para a realização de modificações (LIU et al., 2016).

A expressão endógena permanente da *Cas9* já foi realizada em outras espécies mamíferas e não apresentou riscos ou alterações na saúde dos animais modificados, o que aponta a segurança do mecanismo proposto (PLATT et al., 2014; LIU et al., 2016). Assim, os elementos desenvolvidos nesse trabalho possibilitam a criação de uma linhagem de células bovinas com ampla aplicação em estudos que necessitem da realização de modificações no genoma da espécie.

4 CONCLUSÃO

A realização de modificações genéticas em bovinos utilizando a ferramenta CRISPR-*Cas9* é consideravelmente facilitada pela plataforma de edição gênica proposta, uma vez que com a expressão endógena da *Cas9*, a inserção direta ou de um molde de um gRNA já possibilita a clivagem direcionada específica. O controle da expressão por um mecanismo externo, como é o caso do sistema de ativação por



tetraciclina, garante a condição temporária da capacidade de realizar modificações da plataforma, podendo ser desativada, caso necessário.

A criação de uma linhagem de células geneticamente modificadas utilizando a estratégia proposta neste trabalho pode comprovar a eficiência do sistema proposto, sendo de elevada importância para trabalhos de biologia molecular que visam o estudo e modificação do genoma bovino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, Fundação Araucária e UTFPR por fornecer recursos para esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ADLI, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>>.
- BARRANGOU, R.; DOUDNA, J. A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 933–941, 2016.
- GAO, Y. et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.
- LINO, C. A. et al. Delivering crispr: A review of the challenges and approaches. **Drug Delivery**, v. 25, n. 1, p. 1234–1257, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>>.
- LIU, G. et al. Generation of porcine fibroblasts expressing the tetracycline-inducible Cas9 gene by somatic cell nuclear transfer. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 3, p. 2527–2533, 2016.
- PLATT, R. J. et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 440–455, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>>.
- REDMAN, M. et al. What is CRISPR/Cas9? **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 101, n. 4, p. 213–215, 2016.
- RIEBLINGER, B. et al. Cas9-expressing chickens and pigs as resources for genome editing in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 118, n. 10, 2021.
- T. DAS, A.; TENENBAUM, L.; BERKHOUT, B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. **Current Gene Therapy**, v. 16, n. 3, p. 156–167, 2016.
- ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, p. 40–46, 2014.