



Desenho e validação de RNAs-guia visando a terapia gênica de uma síndrome do espectro autista pela metodologia CRISPR/Cas9

Nome da Aluna: Barbara Mateos Perez Bianco de Araújo

Nome do Orientador: Prof. Dr. Fabio Papes

A Síndrome de Pitt-Hopkins é uma doença genética rara do espectro autista causada por mutações no gene *TCF4* e caracterizada por atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual severa e face característica, que inclui olhos profundos, nariz com ponte nasal larga e narinas antevertidas, lábio superior em forma de arco e lábio inferior saliente e grosso. É causada por mutações no gene *TCF4*, que codifica um fator de transcrição envolvido na regulação da proliferação e diferenciação de várias linhagens celulares e cuja expressão é particularmente alta durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A doença é originada pela presença de apenas metade da dose normal de *TCF4*, sugerindo a possibilidade de utilização de terapias correccionais para restaurar a função do gene através do aumento da expressão do alelo *TCF4* normal. Nosso grupo de pesquisa pretende utilizar uma técnica baseada no sistema CRISPR/Cas9 para promover essa superexpressão.

O objetivo central deste projeto é desenhar e validar RNAs-guia para o promotor do gene *TCF4* para corrigir a expressão do gene pela terapia gênica. Os RNAs-guia validados no presente projeto serão futuramente utilizados para corrigir a expressão do gene em estratégias de terapia gênica. Para alcançar tal objetivo, as seguintes metas específicas serão perseguidas:

1. Recuperar a sequência do promotor do gene *TCF4*;
2. Desenhar RNAs-guia para o promotor do gene utilizando métodos de bioinformática;
3. Clonar oligonucleotídeos correspondentes aos RNAs-guia no vetor plasmidial pSpCas9;
4. Realizar checagem dos vetores plasmidiais por PCR e sequenciamento de DNA;
5. Transfectar os vetores produzidos em células HEK293 em cultura, seguido de amplificação da região-alvo por PCR e sequenciamento; e
6. Determinar se os sgRNAs *TCF4* têm de fato como alvo as regiões esperadas.

Os métodos para a realização de nosso projeto são apresentados na figura 1 na ordem em que foram empregados.

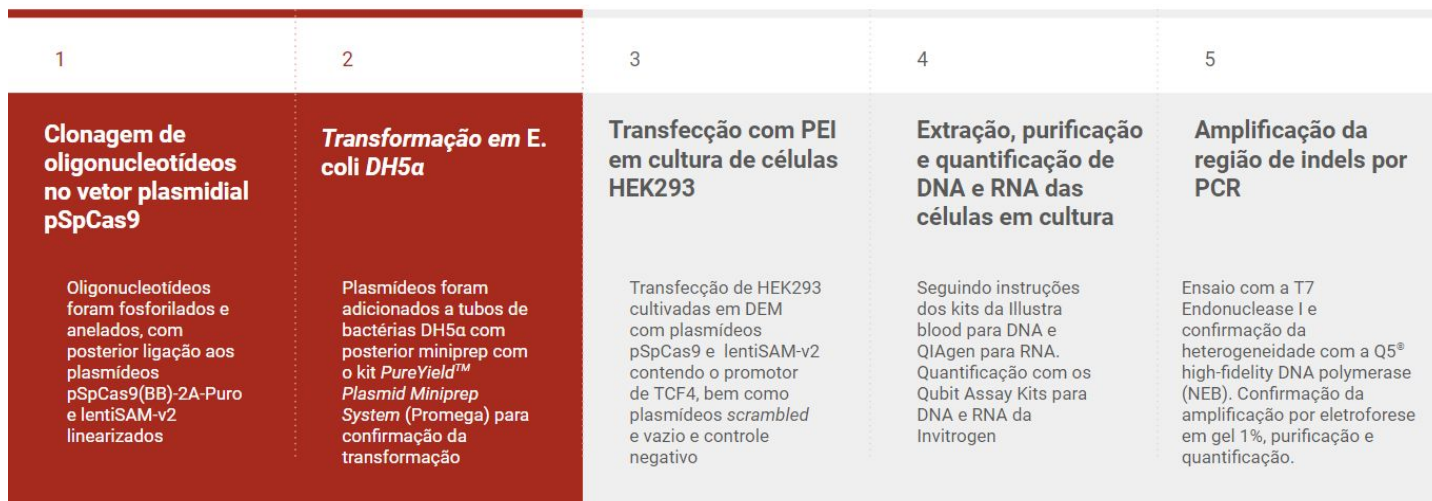


Fig. 1: Resumo cronológico dos métodos utilizados durante a realização do projeto.

Primeiramente, nós obtivemos uma região de 200 pares de base com o sítio de transcrição da isoforma TCF4-B do gene no éxon 3b. Depois, selecionamos as 3 sequências-guia *sense* e 2 *antisense* mais específicas para esse éxon. RNAs *scrambled* também foram desenhados nesta etapa (Fig. 2).

	Guide sequence	Complementary sequence	Guide # (score)
3b			
Sense	CTTTATAAGCCCGCAGTTCC	GGAAGTGGGGCTTATAAAG	01 (86)
	CCGCAGTTCCCGGATGTGAA	TTCACATCCGGGAAGTGGG	03 (84)
	GTCGACCAGCACCGCCATCT	AGATGGCGGTGCTGGTCCGAC	04 (82)
Antisense	GGTAAACAGAGCGCCTAGAG	CTCTAGGCGCTCTGTTTACC	02 (85)
	CATTACATCCGGGAAGTGC	GCAGTTCCCGGATGTGAATG	06 (80)
Scrambled	AAATGTGAGATCAGAGTAAT	ATTACTCTGATCTCACATTTc	

Fig. 2: Sequências-guia *sense* (azul) e *antisense* (laranja) de maior score selecionadas para o éxon 3b e o RNA-guia controle (*scrambled*) em cinza.

Nós clonamos essas sequências-guia em um vetor para expressão dos RNAs e verificamos a presença de *indels* com o sistema CRISPR canônico para confirmar que os sgRNA que portam sequências-guia para o promotor da isoforma TCF4-B são eficientes em guiar a Cas9 ao local desejado. Depois, transformamos bactérias DH5α com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (Fig. 3). As bactérias foram selecionadas por ampicilina para confirmar o procedimento e posteriormente fizemos miniprep. Obtivemos uma concentração de DNA final de 600ng/ml.

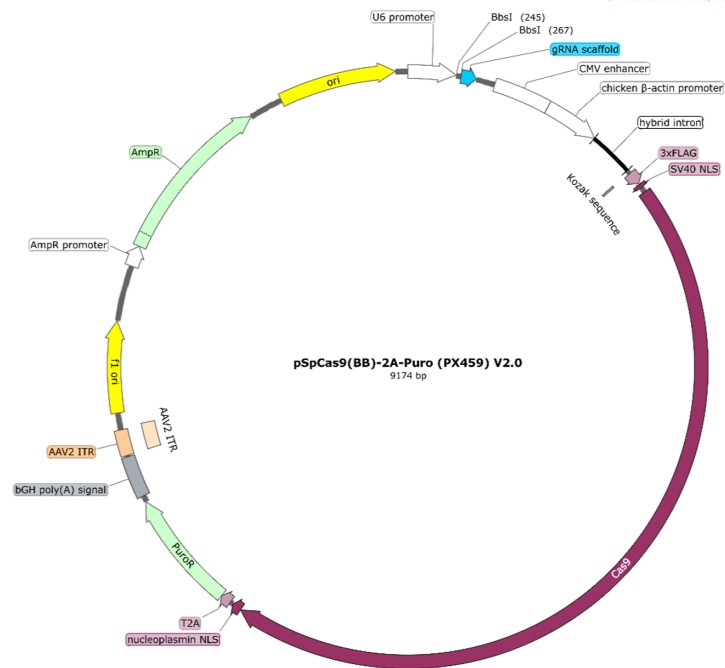


Fig. 3: Plasmídeo com sítio de corte BbsI. A região de corte desta enzima forma um overhang 3' no qual os oligos devem parear (gtgg e gttt). Além disso, o promotor U6 ao lado necessita que o transcrito inicie com uma guanina (g). Nossos oligos foram desenhados de modo a satisfazerem estas condições, com as sequências-guia sendo iniciadas por caccg (Fig. 1).

Digerimos e linearizamos os plasmídeos e confirmamos o resultado em gel de agarose 0,6% (fig. 4). Cada par de oligos foi fosforilado, anelado e inserido nesses plasmídeos. A solução foi incubada a temperatura ambiente junto de um controle da reação no qual não foram adicionados oligos fosforilados e anelados. Por fim, os vetores plasmidiais foram transformados em bactérias competentes DH5α. Um controle da ligação constituído por bactérias transformadas com o plasmídeo controle da etapa anterior também foi inoculado em LB ágar com ampicilina e constatou-se que não ocorreu o crescimento destas bactérias transformadas, conforme o esperado.

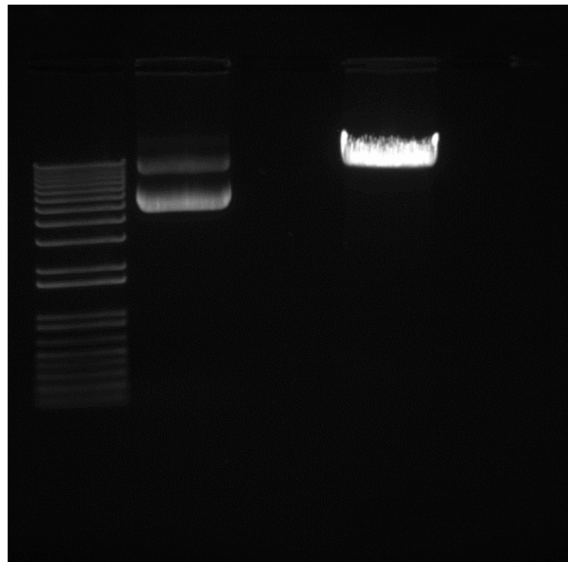


Fig. 4: Plasmídeos digeridos com sucesso segundo o sítio de corte da enzima BbsI. A linearização decorrente da digestão forma a banda única à direita. As duas bandas à esquerda representam o controle, não submetido à BbsI.

A verificação da montagem dos vetores foi feita por meio de sequenciamento Sanger, utilizando como par de primers para cada um dos oligonucleotídeos das fitas reversas dos sgRNA em conjunto com o primer hU6-F. A sequência foi obtida do eletroferograma de cada clone. O alinhamento destas sequências com o plasmídeo pSpCas9(BB)-2APuro demonstrou discrepâncias em apenas um clone (fig. 5). Assim, excluímos ele da análise e selecionamos um clone de cada RNA-guia para criação de culturas permanentes por transformação das bactérias DH5α e midiprep. As concentrações finais obtidas constam na tabela 1.

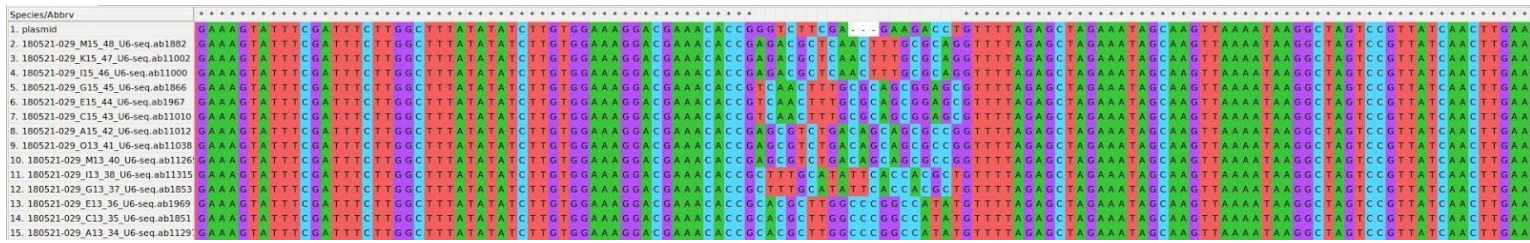


Fig. 5: Alinhamento do plasmídeo (1), controle *scrambled* (2-4) e RNAs-guia após sequenciamento. Os clones de cada sgRNA foram agrupados em três, com exceção do sequenciamento, que foi descartado e os clones restantes, agrupados (clones 11 e 12).

3bS1	10 ng/ μ L
3bS2	16 ng/ μ L
3bS3	28 ng/ μ L
3bA1	48 ng/ μ L
3bA2	17 ng/ μ L
Scrambled	20 ng/ μ L

Tabela 1: Concentrações das 3 sequências-guia *sense*, 2 *antisense* e controle *scrambled* resultantes do procedimento de Midiprep.

Os plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-Puro preparados anteriormente foram utilizados na transfecção de células HEK293 com o reagente PEI. Após a transfecção, as células foram selecionadas por cerca de 72 horas com puromicina e submetidas à purificação de DNA genômico. As amostras de DNA genômico purificado foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para análise de integridade (fig. 6).



Fig. 6: Confirmação da integridade do DNA genômico purificado de células HEK293 transfectadas com plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-Puro.

Para a amplificação das regiões do éxon 3b, onde esperamos que tenham ocorrido DSBs induzidas por CRISPR/Cas9, desenhamos pares de primers que flanqueiam essas regiões a uma distância de 200 pb de ambos os lados para garantir a amplificação da maioria dos *indels* de diversos tamanhos inevitavelmente gerados pelo processo de reparo (Tabela 2).

	Sequence (5' \rightarrow 3')	Tm ($^{\circ}$ C)	GC%	Amplicon length (bp)
TCF4 3b F	GTGCCGAAACTACACTTTTGTG	62.1	45.5	664
TCF4 3b R	ACAAGATTATGCACCTGGCT	61.8	45.0	

Tabela 2: Primers Forward (F) e Reverse (R) para amplificação do éxon 3b do gene *TCF4* acompanhados de seus respectivos valores de Tm e conteúdo GC.

Para confirmar a amplificação, submetemos as reações à eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 7). Após a confirmação da amplificação, purificamos e quantificamos os amplicons.

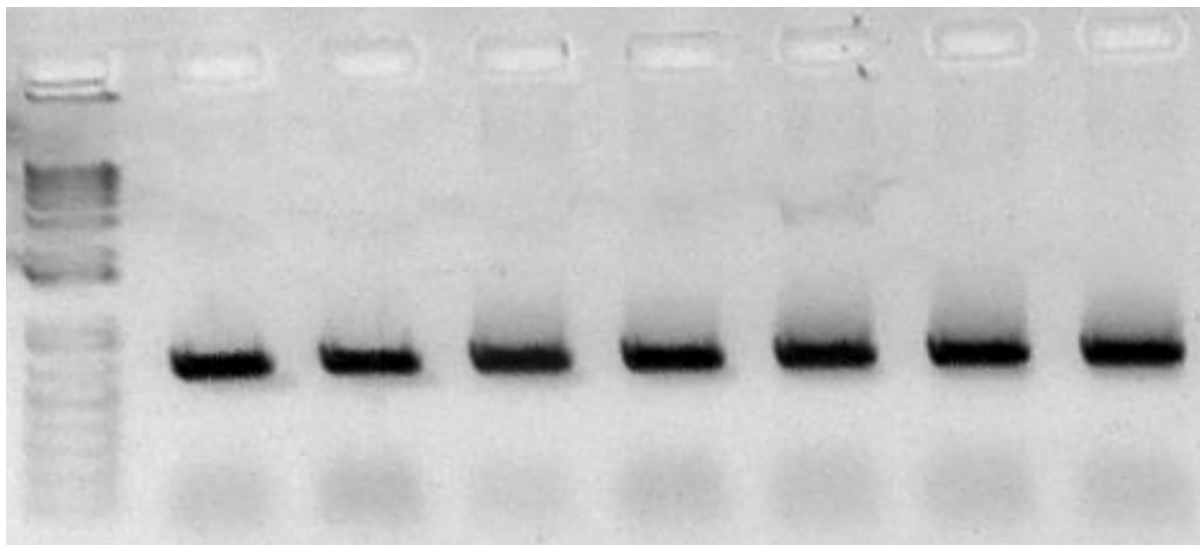


Fig. 7: Confirmação da amplificação do éxon 3b a partir do DNA genômico de células HEK293 transfectadas com plasmídeos pSpCas9(BB)-2A-Puro, cuja sequências-guia têm como alvo o mesmo éxon.

Por fim, avaliamos a heterogeneidade dos amplicons por ensaio com T7 endonuclease I por eletroforese (fig. 8). Na ausência da T7EI, é possível observar um rastro acima da banda principal de tamanho esperado para o amplicon. Esse rastro é formado porque, quanto mais mal pareados, mais lentamente os heteroduplexes migram pelo gel. Como um rastro se formou nos controles *scrambled*, embora numa quantidade bem menor em relação às outras amostras, é possível inferir a existência de polimorfismos preexistentes em nossa linhagem de células HEK293. Na presença da T7EI, é possível observar que os amplicons de todas as amostras foram clivados, inclusive as do controle *scrambled*. Entretanto, os produtos resultantes da clivagem dos amplicons do controle *scrambled* normalmente não possuem o mesmo tamanho e estão numa quantidade bem menor que os produtos da clivagem dos amplicons das outras amostras. Esses resultados revelam que, quando originadas do DNA genômico de células transfectadas com plasmídeo CRISPR/Cas9, as populações de amplicons são altamente heterogêneas, confirmando que as sequências-guia *TCF4* têm como alvo o éxon 3b.

3b

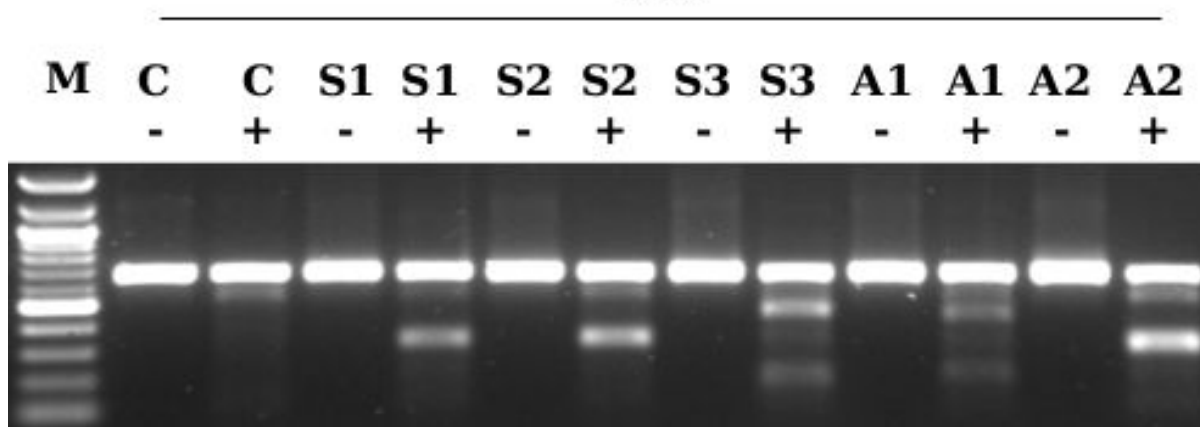


Fig. 8: Resultado do ensaio da T7 endonuclease I. Sinais – e + indicam a ausência e presença da enzima T7 endonuclease I, respectivamente. M, marcador de peso molecular. C, controle. S, sequência-guia *sense*. A, sequência-guia *antisense*.

O projeto objetivou contribuir para os passos iniciais da terapia gênica para a superexpressão de *TCF4*. Conforme demonstram os resultados acima, comprovamos que todos os nossos procedimentos realizados até o presente momento contribuíram com sucesso para a construção de sequências-guia *TCF4* que corretamente identificam como alvo o éxon 3b em células HEK293. Futuramente, é necessário saber se essas sequências funcionam no contexto do sistema de modulação transepigênica mediada por CRISPR/Cas9 para produzir um aumento de fato na expressão do gene.