



# Análise de regiões alvo no genoma humano para inserção de sequências usando sistema CRISPR/Cas9



CARNEIRO, B.P.<sup>1 3</sup>; MATTE, U.<sup>2 3</sup>

<sup>1</sup> - Graduanda em Ciências Biológicas, UFRGS. <sup>2</sup>-Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS.

<sup>3</sup>-Centro de Terapia Gênica CPE/HCPA.

## INTRODUÇÃO

CRISPR (do inglês: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é um mecanismo imune de procariontos contra infecções virais, que pode ser aplicado à edição gênica em outros organismos. O funcionamento é baseado em uma endonuclease capaz de clivar em uma região específica mediada por uma sequência de RNA com 20 nucleotídeos complementar ao sítio-alvo. Esse sistema pode ser aplicado para inserção de sequências de DNA em regiões específicas como uma alternativa de tratamento de doenças genéticas a partir de terapia gênica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar duas regiões gênicas associadas aos *loci* THUMP3-AS1(3p25.3, homóloga ao locus ROSA26) e AAVS1(19q13; 1-4067pb, sítio de inserção de vírus adenoassociados) como potenciais sítios-alvo para inserção gênica, visto que são regiões nas quais a inserção de genes parece não ser deletéria.

## METODOLOGIA

Utilizaram-se métodos de identificação de potenciais sítios *off-targets* e de eficiência de clivagem a partir de análises computacionais e referências literárias. Para a predição de *off-targets*, as sequências foram submetidas à ferramenta CHOPCHOP utilizando como base o genoma humano. Três aspectos principais foram avaliados para escolha das sequências: o número de *mismatches*, o conteúdo GC e a eficiência da endonuclease. Posteriormente, as sequências foram submetidas a alinhamento local utilizando a ferramenta BLASTn. Os métodos empregados estão ilustrados (Figura 1).

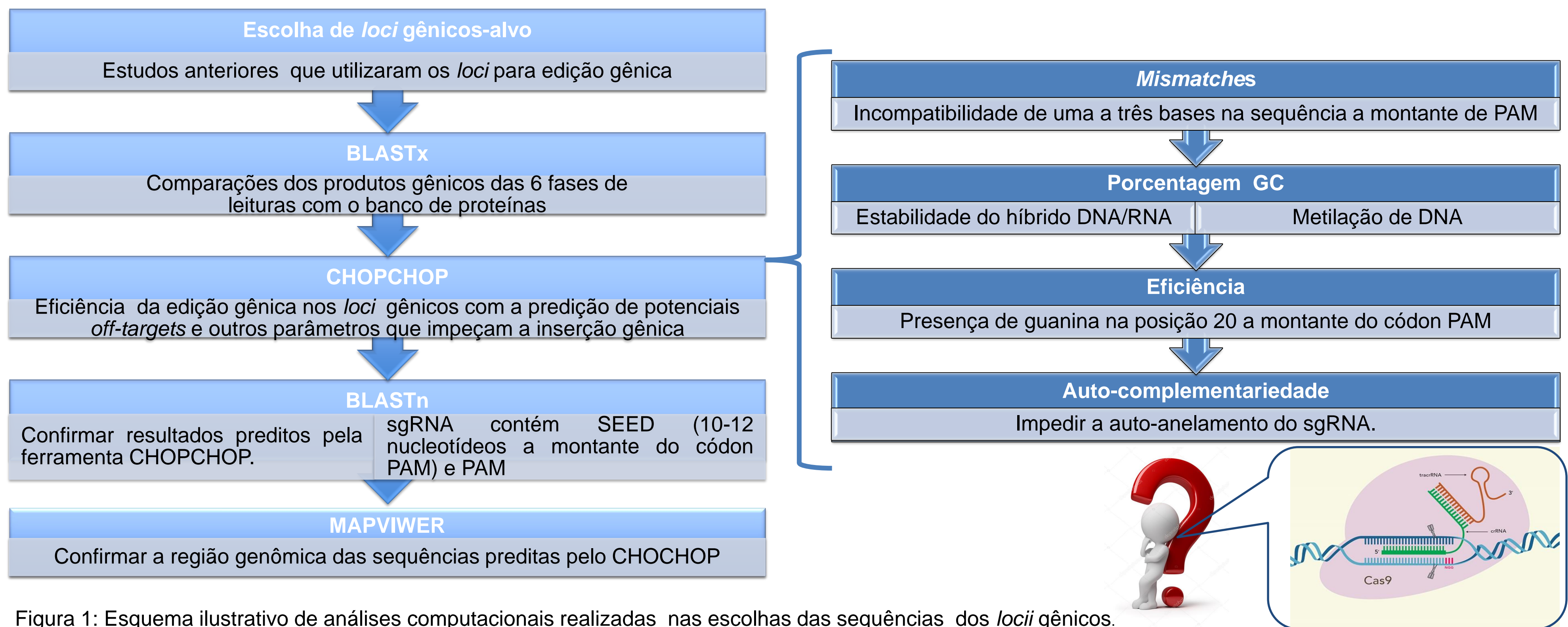


Figura 1: Esquema ilustrativo de análises computacionais realizadas nas escolhas das sequências dos *loci* gênicos.

## RESULTADOS

Das cinco sequências-alvo sem *mismatches* para THUMP3-AS1 e duas para AAVS1 preditos pela ferramenta CHOPCHOP, apenas 3 foram selecionadas, em função dos demais fatores (Tabela 1 e Tabela 2). O conteúdo GC ficou entre 50 e 70%, visto que esta é a porcentagem ideal para eficiência do sistema no que se refere à estabilidade da molécula híbrida de DNA e RNA e à concentração de domínios CG. Além desses critérios, considerou-se o valor maior que 70% como ideal para eficiência de corte e a ausência de auto-complementariedade para a escolha das sequências.

Tabela 1 Análise da sequência gênica do locus THUMP3- AS1 obtida pela ferramenta CHOPCHOP.

	Sequence	Genomic location	Exon	Strand	GC%	Self-complementary	Mismatches	Efficiency
3	ACAGCAAGTTGTCTAACCCGCGG	chr3:9395263	1	-	57	0	0	0.75
10	ATGAGCGAAACCACTGCGCGGGG	chr3:9396769	1	-	65	0	0	0.70

Tabela 2 Análise da sequência gênica do locus AAVS1 obtida pela ferramenta CHOPCHOP

	Sequence	Genomic location	Exon	Strand	GC%	Self-complementary	Mismatches	Efficiency
4	TTGGCCTGGAACCCACGAGAGG	sequence:3102	1	+	65	1	0	0.70

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A predição de análises computacionais permitiu a obtenção de 2 sequência para o locus THUMP3-AS1 e 1 para AAVS1 com 23 nucleotídeos com base nos critérios mencionados. A partir de alinhamento local, a averiguação dos resultados preditos pela ferramenta CHOPCHOP não mostrou potenciais *off-targets* das sequências em outro local descrito do genoma humano e 100% de identidade das sequências escolhidas com a de cada locus gênico sendo *e-value* igual ou menor que 0,0003. Com o intuito de confirmar as predições realizadas, essas sequências serão submetidas a ensaios experimentais por intermédio de cultivo celular para a confirmação *in vitro* da predição de *off-targets* visando a utilização dos sítios-alvos na terapia gênica.