

CONSTRUÇÃO DE TRANSGENE SINTÉTICO PARA EDIÇÃO GÊNICA DE BIOMODELOS TRANSLACIONAIS

GUILHERME NEVES LIMA RATTMANN¹; JADE RIET GRAMINHO²; LEANDRO SILVA NUNES³; WILLIAM BORGES DOMINGUES⁴; MARIANA HÄRTER REMIÃO⁵; VINICIUS FARIAS CAMPOS⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – gnlr@outlook.com

² Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – jaderiet@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – leandro_donfa@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – williamwwe@yahoo.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – mariana.remiao@ufpel.edu.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas – Laboratório de Genômica Estrutural – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fator de transcrição *fosl1* é membro da família de genes da proteína ativadora 1 (AP-1), família esta que está diretamente ligada a diversas funções celulares, tais como sobrevivência celular, apoptose e diferenciação celular (SHAULIAN et al, 2002). Tais genes costumam ser associados a diversas doenças com o câncer, pois exercem regulação sobre a progressão de células tumorais (SOBOLEV et al, 2022). O câncer é a segunda principal causa de morte atualmente no mundo, e, portanto, muitos esforços em pesquisa têm sido feitos para compreender e buscar novos tratamentos e diagnósticos para tal patologia (MATTIUZZI et al, 2019).

Uma das formas de estudar as funções dos genes nos organismos é através da geração de animais transgênicos, o que permite uma compreensão melhor das rotas envolvidas pois tal estudo ocorre num sistema *in vivo*. Nesse sentido, o *zebrafish* (*Danio rerio*) tem demonstrado ser um modelo interessante pois é altamente eficaz para investigar genes ortólogos, ou seja, genes que compartilham semelhanças estruturais e funcionais com genes humanos, dentre outras características que facilitam a sua manipulação (CORNET et al, 2018).

Uma ferramenta para a geração de animais transgênicos é o sistema CRISPR/Cas9. Essa ferramenta é uma moderna estratégia de edição genética que possibilita a modificação precisa de sequências específicas do DNA de um organismo (JIANG et al, 2017). Esse sistema consiste em dois componentes essenciais: uma proteína conhecida como Cas9, que atua como uma “tesoura molecular”, e uma molécula de RNA guia que direciona a Cas9 para o local desejado (SHARMA, 2021).

Portanto, a presente inovação teve como objetivo a criação de uma molécula de DNA sintética projetada para promover a superexpressão do gene *fosl1* em *zebrafish*, utilizando a técnica do CRISPR/Cas9. Essa construção possibilita a exploração das diversas funções que o gene *fosl1* pode desempenhar nesse organismo, estabelecendo-o como um modelo translacional para vertebrados, facilitando assim a pesquisa e o entendimento das funções de tal gene.

2. METODOLOGIA

Após idealização do projeto, foi feita a busca de anterioridade através dos bancos de patentes INPI (<http://www.inpi.gov.br/>), Google Patents (www.google.com/patents), Portal CAPES (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>), USPTO (<http://patft.uspto.gov/>), WIPO (<https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf>) e ESPACENET (<http://worldwide.espacenet.com>) utilizando os seguintes termos de pesquisa: “*fosl1*; peixe-zebra; doenças”, “*fosl1*; peixe-zebra; construção genética”, “*fosl1*, peixe-zebra; DNA recombinante”, “*fosl1*; peixe-zebra”, “*fra-1*; knockin”, “*fosl1*; gene; construção”, “peixe-zebra; transgenia”, “*fosl1*”, “*fra-1*”, “*fosl1*; knockin”, “*fosl1*; peixe-zebra; doenças; knockin”, “*fosl1*; peixe-zebra; doenças; transgenico”, “*fosl1*; peixe-zebra; knockin”, “*fosl1*; peixe-zebra; transgenico”, “*fosl1*; peixe-zebra; DNA sintético”, “peixe-zebra; transgenico”, “*fosl1* OU *fra-1*; peixe-zebra; doenças; knockin”, “*fosl1* OU *fra-1*; peixe-zebra; doenças; transgenico”, “*fosl1* OU *fra-1*; peixe-zebra; doenças; DNA sintético”, “*fosl1* OU *fra-1*; peixe-zebra; construção genética” e “*fosl1* OU *fra-1*; peixe-zebra; DNA recombinante”

Inicialmente foram realizadas predições *in silico* dos RNAs guia, através da ferramenta CHOPCHOP, para o gene *gapdh* (gene constitutivamente expresso, codificando para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) visando o seu último exon. Nessa ferramenta foram obtidas sequências de micro-homologia, as quais foram inseridas na construção. Os nucleotídeos posteriores as regiões cortadas também foram inseridos na construção, visando não prejudicar a expressão endógena do gene. Na sequência do gene *fosl1* e no gene repórter de fluorescência foram realizadas otimizações de códons para *zebrafish*.

Para *knockin* no genoma do *zebrafish*, foi utilizada a ferramenta CRISPR/Cas9, utilizando os braços de micro-homologia para knockin do gene *fosl1* seguido do gene repórter de fluorescência na porção do último exon do gene *gapdh*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca de anterioridade foram encontrados diversos trabalhos conforme os termos de busca utilizados. Porém, nenhuma das patentes encontradas estava diretamente relacionada com a utilização de DNA sintético recombinante para superexpressão do gene *fosl1* em *zebrafish*. Foram encontradas diversas patentes relacionando o gene *fosl1* como um gene de interesse para uma ampla gama de estudos. No entanto não foi encontrada nenhuma patente que

sobreponha a presente invenção assim demonstrando sua importância para estudos com esse gene.

Ao final da construção do DNA sintético, o mesmo foi construído e terá as seguintes características: o primeiro braço de micro-homologia do gene *gapdh*; a porção do último exon após o corte; o gene *fosl1*; o gene repórter de fluorescência; e o último braço de micro-homologia, nessa ordem respectivamente. Tal construção pode ser observada de forma ilustrativa na Figura 1.

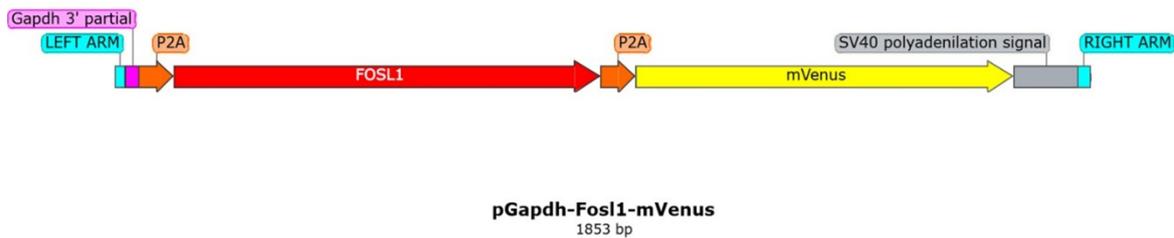


Figura 1. Construção final do DNA sintético construído para edição de *zebrafish* geneticamente editado para superexpressar o gene *fosl1*.

4. CONCLUSÕES

A presente inovação realizou a invenção de uma construção genética de DNA sintético para ser inserida no genoma do *zebrafish* que irá gerar a superexpressão do gene *fosl1*, marcado com um gene repórter de fluorescência.

Com o modelo gerado, será possível estudar as mais diversas funções que o gene *fosl1* desempenha no organismo do *zebrafish*, sendo possível utilizar este como modelo translacional para vertebrados. Pesquisas relacionadas à busca por biomarcadores tumorais e de sensibilidade à terapias, estudo de carcinomas, regeneração tecidual, envelhecimento e reprogramação de células tronco são exemplos de áreas de estudo que serão privilegiadas com a presente invenção.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHARMA, Preeti; SHARMA, B. Sharan; VERMA, Ramtej J. CRISPR-based genome editing of zebrafish. *Progress in molecular biology and translational science*, v. 180, p. 69-84, 2021.

SOBOLEV, Vladimir V. et al. Role of the transcription factor FOSL1 in organ development and tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 3, p. 1521, 2022.

JIANG, Fuguo; DOUDNA, Jennifer A. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual review of biophysics*, v. 46, p. 505-529, 2017.

CORNET, Carles; DI DONATO, Vincenzo; TERRIENTE, Javier. Combining zebrafish and CRISPR/Cas9: toward a more efficient drug discovery pipeline. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 703, 2018.

MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe. Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*, v. 9, n. 4, p. 217, 2019.

SHAULIAN, Eitan; KARIN, Michael. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology*, v. 4, n. 5, p. E131-E136, 2002.