



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Centro de Energia Nuclear na Agricultura



PROJETO DE TCC

Título: Utilização do sistema CRISPR/Cas9 para criar *InDels* gene específicos: transformação e seleção de plantas de *A. thaliana* para mutar uma fosfatidilinositol quinase planta-específica.

Professor Orientador: Prof. Dr. Francisco Scaglia Linhares

Aluno: Kalvin Leonardo de Almeida

NºUSP: 10318326

Piracicaba
Outubro/2022

INTRODUÇÃO

Arabidopsis thaliana é uma pequena planta da família Brassicaceae que vem sendo usada como organismo modelo para a Biologia Molecular há um bom tempo devido a algumas de suas características, como ciclo de vida curto, pequeno porte, genoma pequeno e totalmente sequenciado e facilidade de transformação. Atualmente, outros fatores como o grande número de linhagens mutantes e o amplo entendimento dos mapas genéticos de todos os seus cinco cromossomos, reforçam o uso de *A. thaliana* como organismo modelo.

Há anos nosso laboratório vem estudando um gene de *A. thaliana* (At2G40850), que codifica uma proteína fosfatidilinositol 4-cinase denominada PI4K γ 1 (doravante referido apenas como “ γ 1”). Plantas mutantes para esse gene apresentam grãos de pólen irregulares e com viabilidade altamente reduzida (aproximadamente 97-98% de grãos de pólen inviáveis), o que demonstra sua implicação no desenvolvimento polínico. Análises por microscopia eletrônica da estrutura da antera demonstraram que o tráfego intracelular das células do tapete estava afetado, o que, por sua vez, afetava a viabilidade dos grãos de pólen. Visto que o nosso gene de interesse apresentou fenótipo na primeira geração mas este fenótipo foi se perdendo ao longo das gerações, se fez necessário a criação de novos mutantes, tanto para ele como para o gene mais próximo, que possui alta similaridade de sequência. Este gene, denominado PI4K γ 8 (doravante referido apenas como “ γ 8”), curiosamente apresenta aumento da expressão gênica no genótipo mutante γ 1, como observamos ao longo das gerações. Dada essa peculiar regulação transgeracional, faz-se necessário criar novos alelos mutantes desses genes para verificar sua regulação.

Dentre as várias técnicas de Engenharia Genética atuais, escolheu-se para o desenvolvimento deste projeto a metodologia CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), por gerar mutações de forma rápida e estável (CONG et al., 2013; JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013). A técnica permite direcionar a endonuclease Cas9, juntamente com um RNA-guia, para promover a clivagem de um alvo específico de DNA, criando mutações a partir da própria maquinaria de reparo de DNA da célula, através dos mecanismos de ligação de extremidades não homólogas (NHEJ), ou de recombinação homóloga (HR) (CHAPMAN et al., 2012; LIU et al., 2012). A vantagem desta técnica é que a mutação é induzida por um transgene, que pode ser eliminado sucessivamente por segregação, permitindo a propagação das linhagens mutantes tanto em homozigose como em heterozigose, sem o transgene inicial.

Em outras palavras, o transgene inserido, que atua na célula ovo, zigoto e nos primeiros momentos do desenvolvimento embrionário da planta, dentre outras coisas, codifica para a endonuclease Cas9 e também gera uma fita simples de RNA-guia (sgRNA). Este sgRNA é reverso

complementar ao gene de interesse e portanto ela se liga à fita de DNA exatamente no gene de interesse justo a frente da sequência PAM. O reconhecimento entre sgRNA e o gene de interesse posiciona a Cas9 neste local e esta realiza o corte da dupla fita de DNA. A partir disso, a própria maquinaria de reparo da célula pode gerar mutações naquele gene, pela adição ou deleção de um ou dois nucleotídeos (chamada também de mutações *InDels*), fazendo com que a proteína que seria codificada pelo gene de interesse tenha a funcionalidade completamente comprometida, uma vez que os marcos de leitura são alterados quando a inserção/deleção é de um ou dois pares de bases.

OBJETIVOS

- Criar construções genéticas específicas do RNA-guia complementar ao gene At3g56600 (PI4K γ 8).
- Criar construções genéticas específicas do RNA-guia complementar ao gene At2g40850 (PI4K γ 1).
- Criar construções genéticas específicas do RNA-guia complementar a ambos os genes, a fim de conseguir diretamente o duplo mutante *gamma1/gamma8*.
- Preparar essas construções no vetor pHEE401E
- Preparar os clones desta construção transformando eles em *Agrobacterium tumefaciens*.
- Crescer plantas de *A. thaliana* e transformá-las por *floral deep*.
- Selecionar os possíveis transformantes higromicina-resistentes.
- Extrair o DNA das plantas selecionadas e confirmar a transformação por RT-PCR.

Este projeto se insere em um projeto de longo prazo, que visa criar mutantes do gene *gamma1* e *gamma8*, como também o duplo mutante, através da subsequente transformação de plantas de *A. thaliana*. Estes alelos deverão ser disponibilizados à comunidade científica, através dos repositórios internacionais de germoplasma de *Arabidopsis* ABRC e NASC.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho será desenvolvido no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Estrutura Vegetal (LABDEV), do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba – SP. Se utilizarão os vetores pHEE401E disponibilizados através do ABRC, cuja informação de sequência pode ser obtida em (<https://www.addgene.org>). Para a criação dos RNAs-guia específicos contra a sequência genômica do gene de nosso interesse se utilizará inicialmente uma árvore filogenética da família gênica das fosfatidilinositois 4-cinases da subfamília

gamma criada em nosso laboratório, individualizando assim as regiões de baixa similitude de sequência no gene *PI4Kgamma1* e *PI4Kgamma8*. Essas regiões serão inseridas no software E-crispR para encontrar regiões de 22-24 pb próximas a uma PAM compatível com a CRISP de origem (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>). Para a clonagem dos RNAs-guia se utilizará a metodologia descrita por Schiml et al. (2016), até o processo de transferência dos clones em *A. tumefaciens*.

O princípio básico deste sistema de clonagem é composto por dois passos. O primeiro envolve a especificação do RNA-guia para a sequência alvo, por síntese de oligonucleotídeos que são anelados por aquecimento a 95°C e sequencial resfriamento gradual, criando fragmentos de DNA de dupla fita específicos flanqueados por sequências de restrição da enzima *BsaI*. Seguidamente se realizará a digestão enzimática, com tal enzima, do DNA de dupla fita de origem oligonucleotídica, e do vetor de clonagem. Após a purificação dos fragmentos digeridos extraídos de gel eletroforético, se realizará a incorporação do fragmento específico no vetor de clonagem por ligação mediada por T4-DNA ligase. Após a confirmação dos produtos de clonagem, por sequenciamento de DNA, a estrutura completa do RNA-guia será então transferida para vetor pHEE401E, que contém o cassete de expressão Cas9, através de digestão enzimática e subsequente ligação mediada pela enzima de restrição *BsaI*. Células competentes para transformação serão preparadas seguindo o protocolo descrito por Nakata et al. (1997). Para a transformação de células competentes de *A. tumefaciens* por eletrotransformação, será cultivada a cepa GV3101, e se utilizará o protocolo descrito por Fang & Spector (2010). Os estoques de células competentes e transformadas contendo as construções serão mantidas a -80° C.

RESULTADOS ESPERADOS

O presente trabalho espera de resultados a criação de plasmídeos de clonagem e posteriormente de transformação contendo a sequência nucleotídica correta de um RNA-guia. Visa-se também a transformação de plantas de *A. thaliana*, a fins de induzir mutações sítio-dirigidas por CRISPR/Cas9 do gene At3g56600, do seu homólogo funcional At2g40850 e de ambos os genes. Seleção de possíveis transformantes por resistência a higromicina, realização de cálculos estatísticos das plantas resistentes e confirmação da transformação por RT-PCR.

CRONOGRAMA

Parte das atividades como as construções genéticas, transformação de *Agrobacterium tumefaciens*, crescimento e transformação de *A. thaliana* já foram realizadas durante o período de 01/09/2019 e 31/08/2020, interregno no qual desenvolvi um projeto de Iniciação Científica.

Cronograma das atividades remanescentes:

1 e 2 mês: seleção *in vitro* das sementes oriundas do *floral deep*.

3 e 4 mês: Cálculos estatísticos das plantas resistentes e cultivo *in vivo* das plantas selecionadas.

5 e 6 mês: Extração de DNA das plantas, confirmação da transformação por RT-PCR e escrita do documento do TCC.

ASSINATURAS

Assinam o presente projeto o discente e o docente responsável, respectivamente:



Calvin Leonardo de Almeida



Prof. Francisco Scaglia Linhares

REFERÊNCIAS

Alves-Ferreira, M.; Wellmer, F.; Banhara, A.; Kumar, V.; Riechmann, J. L. & Meyerowitz, E. M. Global expression profiling applied to the analysis of *A. thaliana* stamen development. **Plant Physiology**, v. 145, n. 3, p. 747–762, 2007. CHAPMAN et al., 2012;

CASTRIGNANO, S. B. Enzimas em biologia molecular. II. Sequenciamento genômico pelo método de Sanger: T7 DNA polimerase, Sequenase e Termo Sequenase. Boletim Inst. Adolfo Lutz, v. 27. São Paulo, SP, 2017. p 1-3.

Cong, L.; Ran, F. A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P. D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.; Zhang, F. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science** 03 Jan 2013: 1231143

Fang, Y. & Spector, David L. Live Cell Imaging of Plants. Adapted from Live Cell Imaging, 2nd edition (ed. Goldman et al.). **CSHL Press**, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2010. (doi:10.1101/pdb.top68)

Goldberg, R.B.; Beals, T.P.; Sanders, P.M. Anther development - Basic principles and practical applications. **Plant Cell**, v.5, n.10, p.1217-1229, 1993.

Hsieh, K., Huang, A.H., 2007. Tapetosomes in Brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface. **Plant Cell** 19, 582–596.

Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science** 28 Jun 2012: 1225829

Lampropoulos A, Sutikovic Z, Wenzl C, Maegele I, Lohmann JU, Forner J (2013) GreenGate - A Novel, Versatile, and Efficient Cloning System for Plant Transgenesis. PLoS ONE 8 (12): e83043. HYPERLINK "<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083043>"
\\https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083043

Liu, J., Li, C., Yu, Z., Huang, P., Wu, H., Wei, C., Zhu, N., Shen, Y., Chen, Y., Zhang, B., et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J. Genet. Genomics* 2012. 39, 209–215.

Ma H. Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Plant Biol*, v. 56, p.393–434, 2005.

Mali, P.; Esvelt, K. M.; Church, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology.

Nature Methods, v. 10, n. 10, p. 957–963, 2013.

McCormick S. Control of male gametophyte development. *Plant Cell*, v. 16, p. 142-153, 2004.

Marillonnet, S., & Grützner, R. (2020). Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, 130, e115. doi: 10.1002/cpmb.115

Nakata Y.; Tang, X.; Yokoyama, K. K. Preparation of Competent Cells for High-Efficiency Plasmid Transformation of *Escherichia coli*. In: Cowell I.G., Austin C. A. (eds) *cDNA Library Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 69.

Humana Press. (1997); 69: 129 - 37.

Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., Goldberg, R.B: Anther developmental defects in *A. thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, v. 11, n. 6, p. 297-322, 1999.

Schimpl, S.; Fauser, F.; Puchta, H. CRISPR/Cas-Mediated Site-Specific Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* Using Cas9 Nucleases and Paired Nickases. Minoru Murata (ed.), *Chromosome and Genomic Engineering in Plants: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1469, **Springer Science+Business Media**. New York. 2016.

Seoighe, C.; Gehring, C.; Hurst, L. D. Gametophytic Selection in *Arabidopsis thaliana* Supports the Selective Model of Intron Length Reduction. *PLoS Genet*. 2005 Aug; 1(2): e13.

Wang, Z., Xing, H., Dong, L. *et al.* Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol* 16, 144 (2015). HYPERLINK
"https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0" \h<https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>

TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA

À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc-CB
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título "Utilização do sistema CrispR/CAS9 para criar InDels gene específicos: Transformação e seleção de plantas de *A.thaliana* para mutar uma fosfatidilinositol quinase planta-específica", desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Prof. Francisco Scaglia Linhares e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Kalvin Leonardo de Almeida, declaramos que:

1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de mar o de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

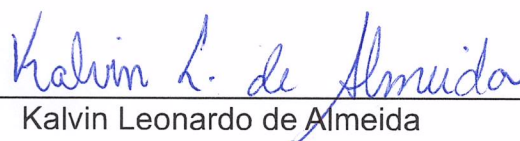
Piracicaba, 21 de outubro de 2022

Assinam:



Prof. Francisco Scaglia Linhares

Docente Orientador(a)



Kalvin Leonardo de Almeida

Aluna(o)