

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Saúde

Vitor Antonio dos Santos

**Inativação do receptor PD1 por CRISPR/Cas9 para melhoramento da
imunoterapia com células CAR-T**

São Paulo

2023

Vitor Antonio dos Santos

**Inativação do receptor PD1 por CRISPR/Cas9 para melhoramento da
imunoterapia com células CAR-T**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Saúde do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Dr. José Ricardo Jensen

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Santos, Vitor Antonio dos

Inativação do receptor PD1 por CRISPR/Cas9 para melhoramento da imunoterapia com células CAR-T / Vitor Antonio dos Santos ; orientador(a) José Ricardo Jensen - São Paulo, 2023.

44 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. CRISPR/Cas9 2. PD-1. 3. sgRNA . 4. CAR-T I. Jensen, José Ricardo. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Vitor Antonio dos Santos, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

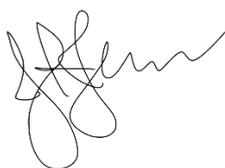
Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 31 de janeiro de 2023.



.....
aluno: Vitor Antonio dos Santos



De acordo:.....
Orientador: José Ricardo Jensen

À minha avó por ter proporcionado os meus estudos,
Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Criador e fonte de todo o entendimento, por ter provido os meios e oportunidade de estudar e realizar um sonho.

Ao meu orientador José Ricardo, pela orientação, incentivo e paciência ao me orientar, assim como à Dra. Andrea Borrego que igualmente me ensinou.

Ao laboratório CENTD, pelo espaço de desenvolvimento dos experimentos e boa convivência; em especial ao Dr. Carlos DeOcesano-Pereira pela disponibilidade para ensinar.

Aos meus pais e família pela educação e formação como pessoa.

À Ana Carolina e Alanis pela companhia diária no realizar das atividades.

A todos os amigos que me aconselharam para a realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pelo Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP.

"A mesma energia criadora que trouxe o mundo à existência, exerce-se ainda na manutenção do Universo e continuação das operações da Natureza."

Ellen White.

RESUMO

SANTOS, Vitor Antonio Dos. **Inativação do receptor PD1 por CRISPR/Cas9 para melhoramento da imunoterapia com células CAR-T.** 2023. 44 p. Trabalho de Conclusão de Curso Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é uma técnica de edição genética capaz de editar regiões do DNA de maneira eficaz e relativamente fácil, sendo considerada uma revolução na engenharia genômica. Suas aplicações na área da saúde são diversas. O nocaute pela técnica de CRISPR pode ser aplicado no melhoramento da imunoterapia, em especial de células CAR-T. Considerando os tumores sólidos, estas células são menos eficazes, devido à expressão de moléculas de checkpoint imunológico em células cancerígenas, que ao se ligarem a receptores de superfície em células T, regulam negativamente a resposta imunológica. Um desses receptores é o PD-1, codificado pelo gene *PDCD1*. Desta forma, este trabalho sugere a inativação do gene *PDCD1*, visando demonstrar parte do processo necessário para edição e aplicação da técnica CRISPR/Cas9 para o melhoramento da imunoterapia através da inativação do receptor PD-1 em células T.

Palavras-chave: CRISPR. CAR-T. PD-1. sgRNA. Imunoterapia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema CRISPR-Cas9	15
Figura 2 – sgRNA	28
Figura 3 – Primers de verificação	29
Figura 4 - Plasmídeo 4	32
Figura 5 - Plasmídeo 10	33
Figura 6 - Controle	33
Figura 7 – Bacterias isoladas	34
Figura 8 – Eletroforese	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio LB Ágar	24
Tabela 2 - Mix de fosforilação	25
Tabela 3 - Mix de clonagem dos plasmídeos.....	25
Tabela 4 - Resultado da eletroporação.....	32
Tabela 5 - Mix de validação	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Câncer	18
1.2 CAR-T	19
2 OBJETIVOS	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Linhagem Celular	23
3.2 Ensaios de CRISPR/Cas9 para edição específica no genoma em linhagem celular:	23
3.3 Ensaio de clonagem.....	24
3.4 Produção do lentivírus.....	26
3.5 Transdução por lentivirus nas células T	26
3.6 Genotipagem dos clones de células transduzidas	27
3.7 Testes funcionais	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Primers para PCR e sequenciamento.....	28
4.2 Atividades realizadas	29
4.2.1 Preparo de meio de cultura LB	29
4.2.2 Preparo de Bactérias eletrocompetentes	29
4.2.2.1 <i>Pré-inóculo</i>	29
4.2.3 Fosforilação dos oligos e clonagem nos plasmídeos	30
4.2.4 Inserção dos óligos nos plasmídeos	31
4.2.5 Eletroporação dos plasmídeos para edição dos genes <i>CCL2</i> e de um gene de interesse do CENTD.	31
4.2.6 Isolamento das colônias de bactérias	33
4.2.7 Extração de DNA plasmidial- Midiprep e Miniprep	35
4.2.8 PCR de colônia	35
4.2.9 Preparação do gel de agarose e eletroforese	36

4.3 Outras atividades	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

Em abril de 2003, foi concluído o Projeto Genoma Humano (PGH). Desde que foi iniciado, no ano de 1989, teve como objetivo o sequenciamento das 3,1 bilhões de bases do genoma humano, suscitando a expectativa de haver benefícios imediatos em relação à cura de doenças congênitas e grande avanço às pesquisas biomédicas (GOÉS; OLIVEIRA, 2014). Foi um grande avanço na área de biologia, mas havia a dificuldade de alterar o genoma de maneira simples (POLLO, 2019).

Dentre as primeiras técnicas para edição de DNA, foram desenvolvidas em 2005 as *Zinc-finger Nucleases* (ZFNs) (KOZOVSKA *et al.*, 2021). As ZFNs são proteínas quiméricas desenhadas para reconhecer e clivar sequências de nucleotídeos específicos do DNA (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016). Em 2010, foi desenvolvida a técnica de *Transcription-activator-like Effector Nuclease* (TALENs, ou nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição). Estas nucleases podem ser programadas para reconhecer uma sequência de DNA específica para o alvo (KOZOVSKA *et al.*, 2021; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

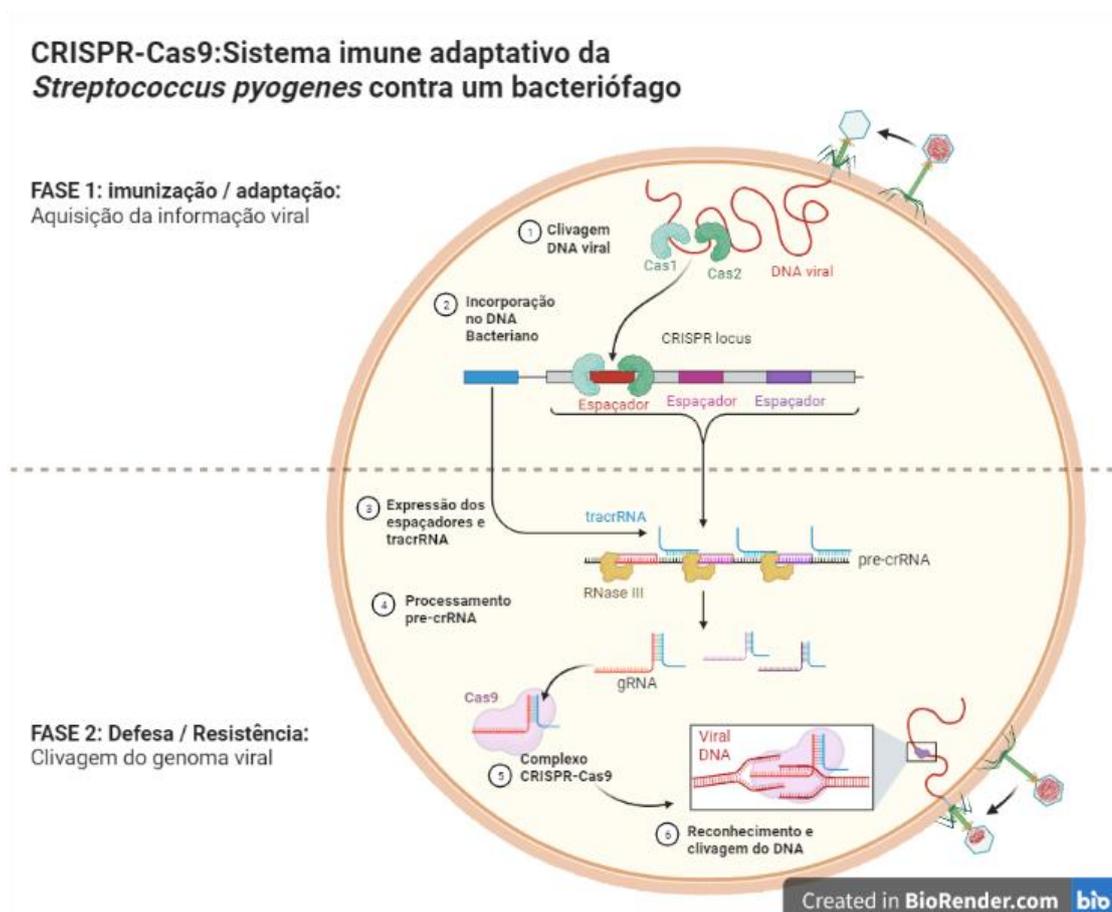
Ambas as técnicas necessitam de duas cadeias peptídicas ligadas à nuclease *FokI* para que haja a clivagem do DNA. Enquanto a cadeia peptídica das ZFNs reconhece 3 nucleotídeos por alvo, sendo recomendado, portanto, 6 proteínas *zinc finger* por cadeia peptídica. A edição por meio de TALEN requer 17 pares de aminoácidos que reconhecem um nucleotídeo cada, sendo mais vantajosa pelo desenho mais simples de cadeia comparado a ZFNs (COSTA; ASSUMPÇÃO; GOISSIS, 2021). Tal desenho de cadeia peptídica ocorre por meio de engenharia elaborada de proteínas específicas para cada alvo, tornando desta forma complexo e custoso o procedimento. (ZHANG; WEN; GUO, 2014)

No ano de 2002, foi criada a sigla CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) para se referir à região do genoma de bactérias e Archaea descoberto inicialmente em 1987 pelo pesquisador Yoshizumi Ishino. Tais regiões possuem espaçadores e repetições de material genético e, em 2005, foi sugerida a função desse locus como um sistema imune adaptativo de procariontos, com sequências de espaçadores de origem exógena servindo de memória para se defender de patógenos invasores (PEREIRA, 2016).

Esse sistema de defesa pode ser dividido em três etapas: adaptação, biogênese do *crRNA* (*CRISPR-derived RNA*) e ação contra o invasor. O processo é

iniciado quando há a infecção por bacteriófagos, transposons ou plasmídeos na bactéria, e através de enzimas codificadas pelos genes *Cas*, o material genético invasor é clivado e inserido no locus CRISPR, se tornando um espaçador entre as regiões de sequências repetidas. A partir desse momento, ocorre a transcrição da região e a formação do pré-*crRNA* que contém várias sequências de espaçadores em um único RNA. Em associação ao *tracrRNA* (*trans-activating RNA*) um RNA não codificante e complementar às sequências do pré-*crRNA* irá auxiliar na maturação em *crRNA*. Esse emparelhamento é essencial para a formação de um *gRNA* (*guide RNA*) eficiente, pois uma das extremidades do *tracrRNA* se associa ao *crRNA* formando uma alça que interage com a enzima Cas9, permitindo que a extremidade 5' do *crRNA* reconheça a sequência-alvo. Essa maturação resulta na origem do *crRNA* correspondente a cada espaçador. Assim, quando o *crRNA* maduro é associado a proteínas Cas, forma-se o complexo CRISPR-Cas9 que em presença de uma reinfecção, cliva o DNA exógeno, inativando-o (PEREIRA, 2016).

Figura 1 - Sistema CRISPR-Cas9



Em uma pesquisa básica para se investigar como as bactérias respondem a infecções virais, as pesquisadoras Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier descobriram em 2012 que tal mecanismo poderia ser utilizado para alterar o DNA de qualquer organismo, servindo de alternativa para as técnicas ZFN e TALEN. O sistema CRISPR/Cas9 depende apenas de um RNA guia único (*sgRNA*) de aproximadamente 20 nucleotídeos para conferir especificidade, reconhecimento genômico e para realizar a DSB (*double strand break* - em português clivagem de fita dupla), sem precisar de uma endonuclease específica. Com isso, a técnica de CRISPR/Cas9 teria um custo menor e uma maior praticidade de execução (KOZOVSKA *et.al.*, 2021; ZHANG; WEN; GUO, 2014).

A técnica CRISPR/Cas9 se tornou uma ferramenta poderosa de edição genômica devido à facilidade de *design*, simplicidade de uso e eficiência, possibilitando seu uso na comunidade científica (JIANG; DOUDNA, 2017).

A vantagem da técnica CRISPR-Cas9 consiste na utilização da mesma endonuclease para atingir um novo alvo de DNA. Ao contrário das TALENs, que precisam ser desenhadas para alcançar uma nova região genômica, a Cas9 pode ser redirecionada com a presença de um RNA guia de 20 nucleotídeos correspondentes à região de interesse. Além disso, a Cas9 possui um padrão de clivagem específico na região da 17^a-18^a bases da sequência alvo, em contraste com as TALENs que clivam de forma indeterminada entre a 12^a e a 24^a bases, assim como a facilidade de direcionamento da nuclease Cas9 possibilita a atuação em vários loci genômicos ao mesmo tempo (*multiplex*) (RAN *et al*, 2013).

O sistema CRISPR possui duas classes, distinguidas pela operação dos módulos efetores, totalizando seis tipos diferentes. O tipo II, encontrado em *Streptococcus pyogenes*, é o mais estudado e o mais simples de todos, pois é definido pela endonuclease Cas9 sendo guiada pelo crRNA, clivando o DNA na presença do domínio PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). Esse domínio é essencial para a ancoragem da endonuclease e posterior clivagem, sendo composto de 2-5 nucleotídeos (por exemplo, NGG, no caso da Cas9) (CAI; GAO; ZHOU, 2019; PEREIRA, 2016).

Quando a associação entre Cas9, *sgRNA* e DNA alvo é efetiva, resultando na clivagem do DNA, o sistema de reparo celular é ativado para evitar a apoptose e a senescência celular. Este sistema repara a célula por uma de duas vias: a primeira, denominada junção de extremidades não homólogas (NHEJ na sigla em inglês, *non-*

homologous end joining); a segunda, denominada via de reparo direcionado por homologia (HDR na sigla em inglês, *homology directed repair*) (PEREIRA, 2016; CHEN *et al.*, 2019).

O reparo NHEJ é propenso a erros, gerando mutações pontuais aleatórias do tipo *indel* (inserção ou deleção de nucleotídeos) e normalmente resultando na inativação, ou nocauteamento do gene, em decorrência da alteração da fase de leitura do DNA, a qual pode gerar um códon de parada prematura no DNA do gene. Por outro lado, também é possível que a alteração da fase de leitura resulte em uma sequência peptídica diferente, o que também inativa funcionalmente o gene e é de grande interesse na área biomédica (PEREIRA, 2016).

A via de reparo HDR ocorre na presença de um DNA doador que possui regiões homólogas às regiões que flanqueiam a sequência editada (braços de homologia). Após passar por um processamento que deixa as extremidades 3' livres, a fita homóloga do DNA se liga à fita do DNA doador, resultando na síntese de DNA e na sua integração ao genoma, gerando alterações precisas na sequência alvo. Apesar de ser menos frequente e estar ativa apenas em células em divisão, é um meio para a inserção de transgenes e alteração alélica, na qual é inserida uma sequência de nucleotídeo semelhante, porém distinta, da original (PEREIRA, 2016; RAN *et al.*, 2013).

A versatilidade de CRISPR vai além da edição genética, podendo ser utilizado na regulação de expressão de genes endógenos (amplificação ou repressão), clivagem de RNAs, mapeamento de genes, rastreamento de RNA e marcação de DNA através da associação de dCas9 (*dead Cas9*), um uma Cas9 modificada por engenharia genética que se liga, mas não cliva, o DNA com a técnica *DNA labeling*, que em conjunto com o gene da GFP (*Green fluorescent protein*, ou proteína verde fluorescente) torna possível a visualização por microscopia de fluorescência da região alvo em que se ligou a dCas9, sendo útil em áreas como pesquisa básica, saúde humana, agronegócio e na indústria (PEREIRA, 2016; TORRES-RUIZ; RODRIGUEZ-PERALES, 2017).

As aplicações em saúde humana vão desde combate a patógenos, identificação ou validação de novos alvos terapêuticos, combate ao câncer, tratamento de doenças genéticas como a síndrome de Duchenne, doença falciforme, talassemia, assim como o HIV (KOZOVSKA *et al.*, 2021). CRISPR foi utilizada como ferramenta de estudo em doenças neurológicas, como a epilepsia causada por

mutação do gene *SCN1A*; no estudo de genes candidatos a promoverem câncer, usando como modelo a indução, por um alelo mutante do gene *Kras*(G12), de tumores no pulmão de camundongos (TORRES-RUIZ, RODRIGUEZ-PERALES, 2017).

1.1 Câncer

O câncer é um grupo complexo de doenças, caracterizado por células que se multiplicam com rapidez e que possuem a capacidade de se disseminarem para outras partes do corpo. É desencadeado por mutações no DNA que ativam oncogenes e/ou inativam supressores tumorais, além da desregulação do epigenoma, que regula a expressão gênica normal; essa doença afeta a célula, se aproveitando de alterações do metabolismo, estrutura celular e da capacidade de crescer em ambientes inóspitos, além de recrutar células normais e suas funções para contornar o sistema de defesa do hospedeiro (KATTI *et al.*, 2022). Sendo assim, o câncer pode ser causado por mutações genéticas, expressão aberrante de genes específicos ou alterações epigenéticas (KOZOVSKA *et al.*, 2021).

As terapias atuais são limitadas devido à complexidade dos mecanismos subjacentes, assim como aos efeitos colaterais resultantes da toxicidade pouco seletiva dos quimioterápicos e da radioterapia, os quais reduzem a qualidade de vida dos pacientes (CHEN, 2019; KHAN, 2016). Técnicas como ZFN e TALENs foram usadas no combate ao câncer, mas não possuem a especificidade de direcionar as alterações epigenéticas por prescindir do reconhecimento de complexos proteínas-DNA, ao passo que a especificidade de CRISPR é dada pelo reconhecimento de DNA e RNA (AKRAM *et al.*, 2020). Assim, essa tecnologia tem maior potencial para tratar doenças, incluindo o câncer, além de poder ser utilizada no desenvolvimento de novas drogas antitumorais mediante a validação de novos alvos terapêuticos e a identificação de genes de resistência, imunoterapia e edição do epigenoma para fins terapêuticos (CHEN *et al.*, 2019).

Uma das estratégias da medicina de precisão visa a identificação de linhagens celulares para distinguir as mutações genéticas que promovem o crescimento do câncer das que não contribuem para a progressão da doença (KATTI *et al.*, 2022).

1.2 CAR-T

Dentre as terapias atuais contra o câncer há um tratamento revolucionário, as células CAR-T. Essa terapia consiste em células imunológicas (linfócitos T) que são retiradas do paciente, modificadas para reconhecerem células tumorais e as eliminarem (COVAS, 2022). *Chimeric antigen receptors* (CAR) ou receptores de antígeno quiméricos de células T são receptores projetados para redirecionar os linfócitos T a se ligarem a antígenos-alvo, gerando a resposta celular e antitumoral, com a vantagem de ser independente do sistema MHC. O uso desta tecnologia foi aprovado em 2017 pelo FDA (*Food and Drug Administration*), para o tratamento de linfoma de células B (STERNER; STERNER, 2021).

Os CARs são compostos por quatro componentes. Um domínio extracelular de ligação, derivado de fragmento variável de cadeia única (scFv) que permite a ligação específica ao antígeno. Esta afinidade deve ser forte o suficiente para gerar uma sinalização, mas não o suficiente para provocar a morte da célula CAR-T, sendo este um problema da terapia. A região de dobradiça dá flexibilidade ao CAR para se ligar no epítipo alvo. Essa região liga o domínio extracelular com o transmembrânico que é responsável pela ancoragem na célula T, e no interior da célula está o domínio de sinalização, que é um coestimulador que imita o sinal de ativação do TCR (STERNER; STERNER, 2021; HASLAUER *et al.*, 2021).

A terapia com células CAR-T foi utilizada no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), doença que afeta as células T (esta é a forma mais comum de leucemias em crianças; em adultos, as células B são as mais afetadas). A terapia possui como alvo o marcador de superfície CD19 mas, devido à perda de antígeno ou exaustão de células T, a terapia pode tornar-se ineficaz. Portanto, outros métodos de construção de CAR e dos domínios co-estimulatórios, assim como a busca de novos alvos terapêuticos, têm sido desenvolvidos (HASLAUER *et al.*, 2021).

Uma limitação das células CAR-T é a efetividade em tumores sólidos. Em tumores hematológicos, por circularem pelos vasos sanguíneos e no sistema linfático, as células modificadas possuem maior contato com as células tumorais, efeito que não ocorre em tumores sólidos, devido às barreiras físicas, à sobrevivência das células T, à incapacidade de recrutamento e um ambiente imunossupressor (RAZEGHIAN, *et al.*, 2021).

O sistema CRISPR foi aplicado na terapia celular contra a Leucemia linfoblástica aguda (LLA) em seres humanos, gerando uma linhagem de células CAR-T CD19/CD22 universal, a qual foi testada em seis pacientes. Apesar das reações adversas esperadas, neste estudo foi demonstrada a segurança da utilização de células T modificadas, servindo de alternativa para o tratamento dos pacientes com LLA, devido à atividade proeminente das células (HU *et al.*, 2021).

A Imunoterapia contra o câncer consiste em gerar uma resposta imunológica, seja ela guiada pela imunidade adaptativa ou inata, atacando o câncer por várias estratégias. As células tumorais possuem a capacidade de evadir o sistema imune por meio de imunossupressão. Isso ocorre devido à presença, nas células saudáveis, de moléculas que inibem a resposta imunológica, chamadas de *immune checkpoints* (IC) ou “pontos de controle imunológico”. Um exemplo é a molécula PD-1L (ligante de PD-1), que é expressa em tecidos saudáveis e interage com o receptor PD-1 (Proteína da morte celular programada 1) em linfócitos T. No entanto, as células tumorais superexpressam essa molécula, causando uma supressão imunológica (ROSSETTI *et al.*, 2022; CHEN, 2019).

O bloqueio da interação entre o receptor PD-1 e o ligante PD-L1 por um anticorpo anti-PD-1 se mostrou vantajoso no tratamento de melanoma e foi aprovado pela FDA (CAI *et al.*, 2016). A inibição de um receptor parecido com PD-1, o CTLA-4, gerou um resultado semelhante (ROSSETTI *et al.*, 2022; CHEN, 2019).

Estratégias baseadas no *knockdown* de genes que codificam receptores de superfície de células T e na inibição de moléculas de *checkpoint* imunológico, como o antígeno CTLA-4, e no *knockout* do gene PD-1, que expressa a proteína PD-1, aumentam a eficácia da terapia com células T contra o câncer (CHEN *et al.*, 2019; WU; CAO, 2018).

A expressão de moléculas de *checkpoint* imunológico evita a morte mediada por células imunes que estão em constante vigilância nos tecidos, como ocorre em células da Leucemia Mielóide Aguda (LMA) que expressam moléculas co-estimuladoras como a CD86 e ICOS-LG. Essas moléculas induzem, em células T CD4 auxiliares, a expressão de quatro receptores: PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3. O desenvolvimento da terapia do câncer pela inibição da regulação imunológica negativa rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2018 para os pesquisadores James P. Allison e Tasuku Honjo (ROSSETTI *et al.*, 2022).

CRISPR oferece uma grande promessa na terapia do câncer. Em 2019, na Universidade da Pensilvânia nos Estados Unidos, foi realizado o primeiro tratamento utilizando CRISPR, no qual células T do paciente foram colhidas e modificadas geneticamente para reconhecerem NY-ESO-1, que é encontrado em células cancerígenas e foram deletados três genes (*PDCD1*, *TRAC* e *TRBC*). Este procedimento possibilitou a produção de células T NYCE que reconheceram o alvo ao serem introduzidas nos três pacientes (dos quais dois possuíam mieloma múltiplo e o outro sarcoma metastático). O estudo mostrou que o tratamento com CRISPR é seguro, não havendo resposta imune contra as células editadas (STADTMAUER *et al.*, 2020).

Apesar de a imunoterapia de células CAR-T possuir bons resultados clínicos, em tumores sólidos essa eficácia se mostrou reduzida. Uma maneira de superar essa limitação é através do bloqueio de moléculas de *checkpoint* imunológico. Este trabalho de revisão de literatura propõe como objetivo teórico o nocaute do gene *PDCD1*, que codifica o receptor PD-1, através da utilização de técnica CRISPR, devido à facilidade e efetividade de edição genética, visando o aumento da eficácia das células CAR-T contra tumores sólidos.

2 OBJETIVOS

Esta revisão tem como objetivo desenvolver uma proposta teórica de inativação do receptor PD-1 em células T, utilizando a técnica de CRISPR-Cas9, mediante o nocaute do gene *PDCD1* para contornar os pontos de verificação imunológica, tornando a linhagem de células CAR-T mais eficiente para o tratamento de tumores sólidos como o melanoma.

3 METODOLOGIA

O desenvolvimento do estudo ocorreu através do levantamento de revisão bibliográfica por meio de artigos, revistas e publicações em bancos de dados como PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), Scielo (<https://www.scielo.br/>), Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/>) e repositório Sapiencia do Instituto Butantan (<https://repositorio.butantan.gov.br/>). A busca foi realizada com os termos: “CRISPR-Cas9”, “CAR-T *cell therapy*”, “*Immunotherapy*”, “*Immune Checkpoints*” e “*PD-1*”.

A proposta de nocauteamento se baseia no modelo e atividades de pesquisa realizadas em 2022 no Laboratório de Desenvolvimento e Inovação (LDI), em conjunto com o Centre of Excellence in New Target Discovery (CENTD), ambos do Instituto Butantan. Serão apresentados os resultados das atividades práticas que realizei, relacionadas aos genes de interesse estudados nestes laboratórios, em projetos coordenados pelos pesquisadores José Ricardo Jensen e Andrea Borrego.

3.1 Linhagem Celular

O modelo de estudo será o de células T CD4 e CD8 alogênicas.

3.2 Ensaios de CRISPR/Cas9 para edição específica no genoma em linhagem celular:

Para o nocauteamento do gene, primeiramente é necessário realizar o desenho do sgRNA. Para isso, em sites como PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) é realizada a pesquisa da sequência do gene alvo e, em seguida, é selecionado um éxon do gene alvo para que a edição resulte em alterações do ORF (*open reading frame*). Com esta informação, desenhamos os sgRNAs no site CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), onde é inserida a sequência genômica e escolhida a sequência PAM utilizada. Após o processamento e comparação com o banco de dados disponível, o site indica os óligos dos sgRNAs e dos primers com suas especificidades e eficiência para a função pretendida, além de mostrar os potenciais sítios fora do alvo (*off-targets*).

3.3 Ensaio de clonagem

De acordo com o protocolo descrito por Zhang *et al.* (2013), com as modificações propostas por Borrego *et al.* (2022), a fosforilação (Tabela 2), o anelamento e a inserção do sgRNA serão realizados em plasmídeo (vetor) lentiviral de expressão lentiCRISPR v2 (Addgene 52961), contendo a Cas9 e o gene de resistência ao antibiótico puromicina.

A produção do plasmídeo será realizada em linhagem competente de bactéria *E.coli*, da linhagem *Stb13* (ThermoFisher Scientific, EUA), por meio da eletroporação no equipamento Gene Pulser XCell™ (Bio-Rad, EUA). Após a eletroporação, as bactérias serão recuperadas em meio SOC por 1h a 37 °C, sob agitação de 220 rpm. Em seguida, as bactérias serão semeadas em placas com meio LB ágar (Tabela 1) com ampicilina. As colônias que crescerem serão coletadas para a extração e purificação do plasmídeo com o kit ChargeSwitch™ - Pro Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a verificação da inserção do *sgRNA*, amplificaremos por PCR a região U6 do plasmídeo, que é uma região promotora, segundo o protocolo de RAN *et al.*, 2013. Utilizaremos o oligo reverso do *sgRNA* como primer reverso da reação. As amostras que apresentarem bandas (sugerindo o sucesso da clonagem) terão os amplicons purificados com o sistema com o sistema exonuclease I e fosfatase alcalina ExoProStar (Cytiva Lifesciences, EUA) e, em seguida, os fragmentos serão sequenciados no equipamento 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). As sequências obtidas serão analisadas com o *software CodonCode Aligner v.8.0.2* (CodonCode Corporation, EUA) para verificar a presença da sequência do *sgRNA*.

Tabela 1 - Composição do meio LB Ágar

Composição	
Triptona	10g

Extrato de levedura	5g
Cloreto de sódio	10g
Ágar	20g
Água	1000 ml

Fonte: COMUNICAÇÃO PESSOAL LABORATÓRIO NB2.2022.

Tabela 2 - Mix de Fosforilação

Componente	Quantidade (µL)
SgRNA top (100 µM)	1
SgRNA bottom (100 µM)	1
Tampão de ligação T4 10x	1
T4 PNK	1
ddH ₂ O	6
Total	10

Fonte: RAN *et al.*2013.

Tabela 3 - Mix de Clonagem dos plasmídeos

Componentes	Quantidade (µL)
pSpCas9	2
Oligo Duplex diluído	2
Tampão Tango	2
DTT 10mM	1
ATP 10mM	1

FastDigest BBS1	1
T7 ligase	0,5
H2O	10,5
Total	20

Fonte: RAN *et al.*2013.

3.4 Produção do lentivírus

A partícula lentiviral será constituída por 3 plasmídeos: envelope (pCMV-VSV-G, Addgene 8454), empacotador (psPAX2, Addgene 12260) e genômico (lentiCRISPRv2 - contendo o fragmento de DNA clonado - Addgene 12259) em células HEK-293T. O vetor repórter vazio pLJM1-EGFP (Addgene 19319) será utilizado para controle interno de eficiência da transfecção. O sistema de segunda geração, no qual 5 dos 9 genes do vírus HIV-1 são eliminados, mantém os genes *gag* e *pol* que codificam os componentes estruturais e enzimáticos do virion, respectivamente, e os genes *tat* e *rev* que exercem as funções de transcrição e pós-transcrição. A construção é segura e amplamente empregada em experimentos, uma vez que testes sensíveis não detectam recombinantes competentes em replicação com este sistema. Os lentivírus serão coletados do sobrenadante das culturas em 24, 48 e 72h.

3.5 Transdução por lentivirus nas células T

As células serão transduzidas com partículas lentivirais contendo a sequência do sgRNA específico para o gene *PDCD1*, produzidas conforme descrito acima. Os lentivírus serão adicionados às células T na presença do reagente de transfecção polibreno (polimetobrometo de 1,5-Dimetil-1,5-diazaundecametileno - Sigma-Aldrich, EUA) e, após 24h, as células transduzidas serão selecionadas com o antibiótico puromicina. As células que sobreviverem à seleção com puromicina serão separadas individualmente em poços de placas de cultura de 96 poços, pela técnica de *Single Cell Sorting* por citometria de fluxo (sob condições de assepsia), seguidas de período de expansão por 2 a 4 semanas para a obtenção dos clones.

3.6 Genotipagem dos clones de células transduzidas

A extração de DNA genômico dos clones de células transduzidas será realizada com o E.Z.N.A Tissue Kit (Omega Biotek, EUA), conforme instruções do fabricante. A região editada será amplificada por PCR, utilizando primers para amplicons curtos, de 100 a 200 pb, desenhados com a ferramenta Primer-Blast (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os primers e dNTPs não incorporados aos amplicons serão removidos com o sistema exonuclease I e fosfatase alcalina ExoProStar (Cytiva Lifesciences, EUA) e, em seguida, os fragmentos serão sequenciados no equipamento 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, EUA) do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, utilizando o *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). As sequências obtidas serão analisadas com o *software CodonCode Aligner v.8.0.2* (CodonCode Corporation, EUA) para verificar se houve edição no sítio desejado.

3.7 Testes funcionais

Realizaremos ensaios *in vitro* de modelo tumoral que apresenta células cancerígenas com PD-L1.

4 RESULTADOS

Através do site ENSEMBL(<https://www.ensembl.org/index.html>), foi possível obter a sequência genômica do gene *PDCD1*, o qual possui 5 éxons. O éxon mais longo (360 pb) foi escolhido para gerar a sequência guia. Para o desenho do RNA guia, utilizamos a ferramenta de design *on-line* CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/>), e os parâmetros de escolha foram estabelecidos, como o tipo de PAM (Sp-Cas9-NGG). O programa gerou 81 possíveis sequências guias, das quais a sequência denominada 94/rev (CACGAAGCTCTCCGATGTGT/TGG, Figura 2), que contém 20 nucleotídeos seguida pela sequência PAM, foi escolhida devido à alta taxa de efetividade mostrada pela sequência PAM, foi escolhida devido à alta taxa de efetividade mostrada pelos índices de especificidade e *off-target* (efeitos fora do alvo) minimizados em comparação a outras sequências.

Figura 2 – sgRNA

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency		Outcome		Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr2 only
				Show all scores Doench '16	Mor-Mateos	Out-of-Frame Lindel			
225 / rev	ATGTGGAAGTCACGCCCTT GGG ⚠ Inefficient Enzymes: MwoI, BglI Cloning / PCR primers	97	98	44	89	65 68	0-0-0-0-0-28 0-0-0-0-0-0	28 off-targets	4:intron:PLCL1 4:intergenic:PSAT1-RP11-165H23.1 4:intron:RASSF2 show all...
94 / rev	CACGAAGCTCTCCGATGTGT TGG Cloning / PCR primers	95	96	50	39	49 76	0-0-0-2-34 0-0-0-0-1	36 off-targets	4:intergenic:SDHC/CFAP126-RNU6-481P 4:intergenic:AC023824.1-RP11-488I20.8 4:intergenic:LOXL2/RP11-177H13.2-LOXL2 show all...
64 / fw	CCTGCTCGTGGTACCAGAG GGG Enzymes: PcsI, TaqI, BstFI Cloning / PCR primers	94	92	59	78	54 75	0-0-1-4-55 0-0-0-0-0	60 off-targets	4:intergenic:GPR12-USP12 4:intron:SVN3 4:intergenic:STS-RP11-791N19.1 show all...
226 / rev	CATGTGGAAGTCACGCCCTT TGG Enzymes: MwoI, BglI Cloning / PCR primers	94	97	51	48	62 76	0-0-1-4-34 0-0-0-0-1	39 off-targets	2:exon:NAV1 3:exon:CHRN6 4:intron:SLC2A5 show all...
43 / rev	CCCTTCGGTCACCCAGCA GGG Enzymes: BssSI, BstI Cloning / PCR primers	93	97	59	60	62 82	0-0-0-5-42 0-0-0-0-0	47 off-targets	4:intron:FGFR1 4:intron:RP11-88I21.2 4:intergenic:LIN9-PARP1 show all...

Fonte: CRISPOR,2022.

Legenda: Tabela de sgRNA gerados pelo site CRISPOR. Cada sequência gerada é classificada pela especificidade, eficiência e avaliação de potenciais efeitos fora do alvo e sua localização. PDCD1-sequência guia Reversa: CACGAAGCTCTCCGATGTGT TGG.

4.1 Primers para PCR e sequenciamento

Para a verificação de clonagem o primer U6, citado na metodologia, foi escolhido para a confirmação conforme indicado na figura 3.

Figura 3 – Primers de verificação

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence CACGAAGCTCTCCGATGTGT does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid:

To clone the guide into *lentiCRISPR v2 (Zhang lab)*, use these primers:

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This is not the case for this guide. Several options are possible, you can either add an additional G- prefix to the N20 guide sequence, called gN20 guides here, or replace the first with a G and create a gN19 guide. For users of HF1 and eSpCas9: G- prefixing with the high-fidelity variants may reduce efficiency, as it introduces a mismatch.

Primers for gN20 guides:

Name	Primer Sequence
PDCD1_gN20-guideRNA94rvU6senseentiCrispr	CACCGCACGAAGCTCTCCGATGTGT
PDCD1_gN20-guideRNA94rvU6antisenseentiCrispr	AAACACACATCGGAGAGCTTCGTGC

Primers for gN19 guides:

[Kim et al 2020](#). showed that changing the first nucleotide to 'G' is slightly more efficient.

Name	Primer Sequence
PDCD1_gN19-gN20-guideRNA94rvU6senseentiCrispr	CACCGACGAAGCTCTCCGATGTGT
PDCD1_gN19-gN20-guideRNA94rvU6antisenseentiCrispr	AAACACACATCGGAGAGCTTCGTGC

The plasmid has to be digested with: *BsmBI*

[Click here](#) to download the cloning protocol for *lentiCRISPR v2 (Zhang lab)*

Fonte: CRISPOR,2022.

Legenda: Sequência do primer contendo a região U6, que localizada em uma região promotora, servindo como validação de inserção do sgRNA. Primers: PDCD1_gN20-guideRNA94rvU6senseentiCrispr: CACCGCACGAAGCTCTCCGATGTG

4.2 Atividades realizadas

4.2.1 Preparo de meio de cultura LB

Para o crescimento das bactérias, foi preparado em laboratório de segurança NB2 o meio de cultura Ágar-LB. Cada placa de Petri continha 20 mL de ágar-LB, com 20 µL de antibiótico ampicilina (100 mg) para o controle de crescimento.

Após a montagem, as placas ficaram 48h fora do refrigerador para verificar a ausência de contaminação.

4.2.2 Preparo de Bactérias eletrocompetentes

4.2.2.1 Pré-inóculo

Primeiro é feita a semeadura da bactéria *E.coli*, linhagem *StbI3*, em duas placas de Petri: uma com meio ágar-LB, e outra com meio LB mais ampicilina a 100 µg/mL para o controle negativo; as placas foram incubadas a 37°C *overnight*. Foi

observado que não houve crescimento de colônias na placa controle e na placa com meio puro houve o crescimento das bactérias.

Na placa em que houve o crescimento de bactérias, uma colônia foi escolhida dentro do fluxo e, com o auxílio de uma ponteira estéril, foi inoculada em dois tubos Falcon de 50 mL contendo 3 mL de LB líquido, sendo um tubo com 3 μ L de ampicilina (100 μ g/mL) para controle negativo. Os tubos foram deixados semi-abertos para troca gasosa e incubados em um *shaker Innova 2* (New Brunswick Scientific, Alemanha) a 220 rpm e 37°C *overnight*.

Após a incubação, houve o crescimento no meio em que não recebeu o antibiótico, observado pela turvação do meio, e o tubo que continha ampicilina não apresentou crescimento, indicando que não houve contaminação.

A partir do meio de cultura em que houve crescimento, uma alíquota foi inoculada em 500 mL de meio LB em um frasco Erlenmeyer (o volume foi dividido em dois frascos de 500 mL cada para melhor administração nos equipamentos), para incubação no *shaker* a 37°C/220 rpm até atingir a D.O (densidade óptica) de 600. A D.O. foi medida após 3h e 25 min, com a retirada de 750 μ L do meio puro para fazer a leitura do branco no equipamento e de 750 μ L do meio de crescimento para realizar a leitura. A D.O. dos dois frascos foi de 634 e 558. Após a medição, os frascos foram colocados em gelo para desacelerar a atividade de crescimento.

O produto foi então dividido em tubos Falcon de 50mL que foram centrifugados a 4000 rpm/4°C por 10 minutos. A partir deste ponto se iniciou o processo de lavagem.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspense em 100 ml de glicerol a 10%, gelado. O conteúdo foi dividido em 4 tubos, sendo centrifugado novamente nas mesmas condições. Após o processo, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspense em 50 mL de glicerol (foi dividido em 2 tubos Falcon), novamente centrifugado e após novo descarte do sobrenadante adicionou-se 50 mL de glicerol, mas sem ressuspender o pellet. Em seguida, o processo de centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetido.

Após o processo de lavagem, adicionou-se 3 mL de glicerol para ressuspender o pellet, o qual foi alíquotado (50 μ L) em tubos eppendorf de 600 μ L para armazenamento a -80°C.

4.2.3 Fosforilação dos oligos e clonagem nos plasmídeos

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias de acordo com o protocolo do kit PureLink (Invitrogen, EUA). Os plasmídeos utilizados foram o PX459 (com marcador de resistência à puromicina e à ampicilina) para transfecção denominado neste trabalho plasmídeo “10”, PX458 (com marcador GFP e resistência à ampicilina) para transfecção denominado plasmídeo “4”, e um plasmídeo lentiviral (com resistência à puromicina e à ampicilina) para transdução denominado plasmídeo “6”.

Os oligos foram fosforilados seguindo a tabela do protocolo e a programação em termociclador: 37°C por 30 min, 95°C por 5min e *ramp down* de 5°C por minuto até atingir a temperatura de 25°C.

Após o processo, os oligos foram diluídos 1:200 (1µL+199µl de ddH₂O) e armazenados a -20° C.

4.2.4 Inserção dos óligos nos plasmídeos

Os plasmídeos 4, 6 e 10, foram inseridos em bactérias *StbI3* a partir da montagem do mix (tabela 3) e incubados no termociclador seguindo a programação de: 24 ciclos de 37°C por 3 min e 21°C por 5 min, seguidos de 37 °C por 10 min e 4 °C para conservação. O produto foi denominado reação de ligação.

4.2.5 Eletroporação dos plasmídeos para edição dos genes *CCL2* e de um gene de interesse do CENTD.

Nesta etapa, ocorreu a transformação (incorporação do plasmídeo) da bactéria *StbI3*. Os plasmídeos 4, 6 e 10 foram inoculados por eletroporação em cubetas de 0.2 cm (Bio-Rad, EUA). Com auxílio da pipeta, foram aspirados 2 µL (Concentração de 100 ng/mL) da reação de ligação e colocados no tubo das bactérias eletrocompetentes. Todo o volume do tubo foi transferido para a cubeta, para receber um choque elétrico de 2.500 V do eletroporador Gene Pulser XCell™. Em seguida, todo o volume foi aspirado e a cubeta foi lavada com 600µL do meio SOC; o conteúdo foi transferido em seguida para um tubo *ependorf* com 200 µL de meio SOC por 1h a 37°C para recuperação; após centrifugação a 3000 rpm por 5 min, 600 µL do sobrenadante foram descartados e os 200 µL restantes foi

ressuspensos e semeados em placa com meio LB e ampicilina, sendo incubadas *overnight* para observar o crescimento.

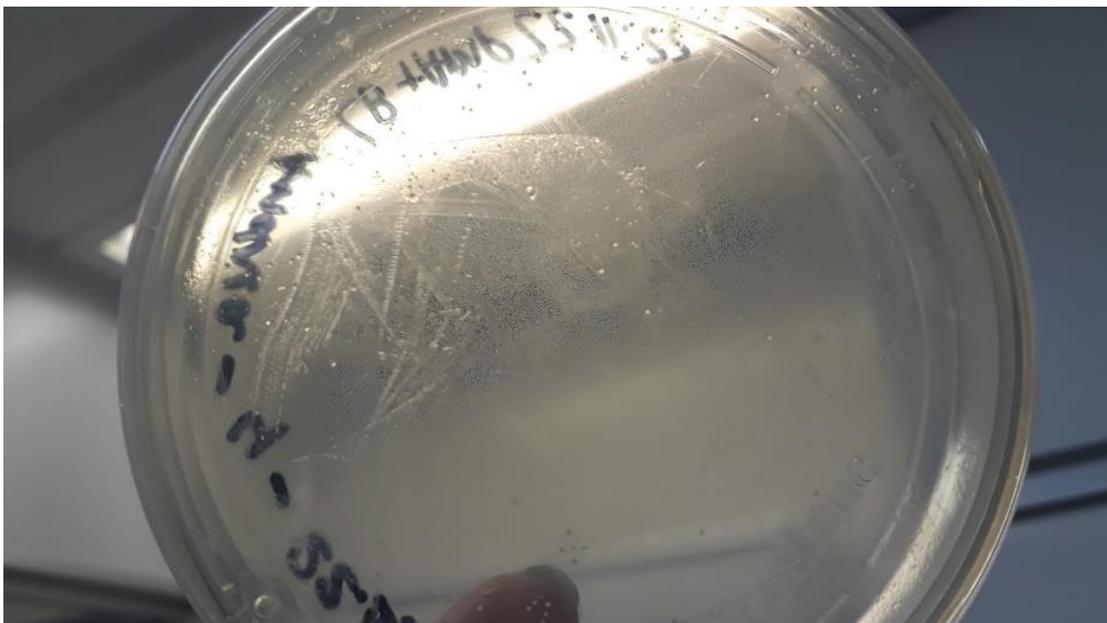
Para o controle, as bactérias foram eletroporadas sem a reação de ligação.

Tabela 4 - Resultado da eletroporação.

Plasmídeo	Nota	Voltagem
Plasmídeo 4	4.7	2478 volts
Plasmídeo 6	4.2	2476 volts
Plasmídeo 10	4.3	2478 volts
Controle 4	5.2	2481 volts
Controle 6	5.1	2481 volts
Controle 10	5.2	2480 volts

Fonte: Próprio autor, 2022.

Figura 4 - Plasmídeo 4



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Placa com crescimento de colônias de bactéria *E. coli Stb13*, transformadas com o plasmídeo 4 (PX459).

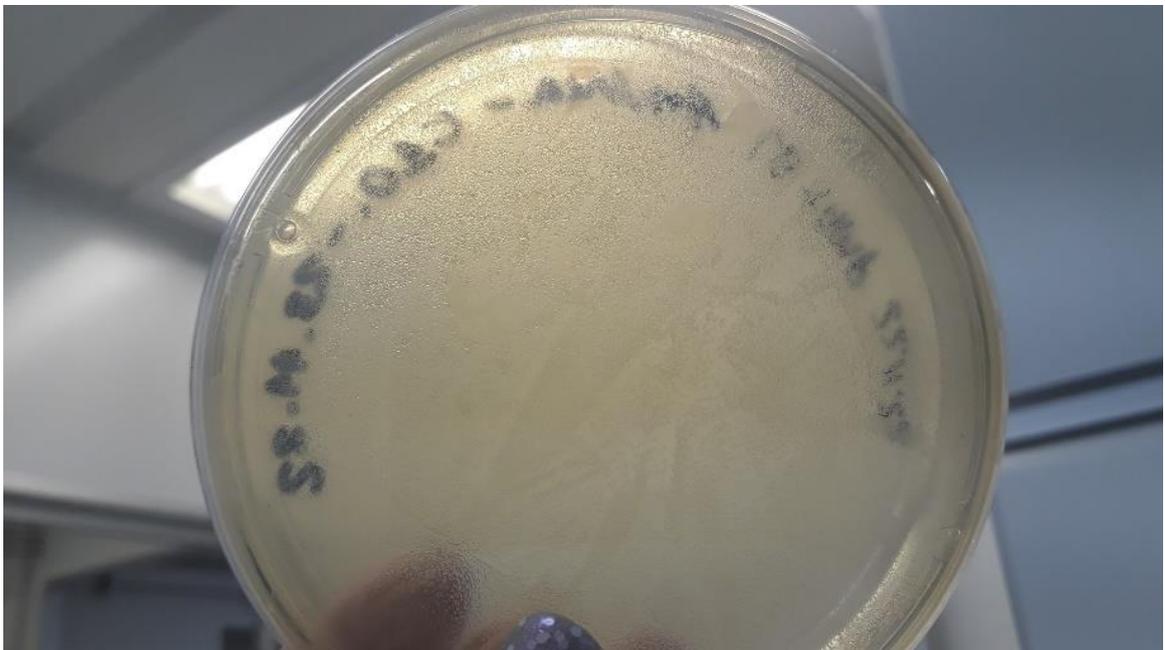
Figura 5 - Plasmídeo 10



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Placa com colônias da bactéria *E. coli Stb13*, transformadas com o plasmídeo 10 (PX458).

Figura 6 - Controle



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Placa controle, bactérias *E. coli Stb13* eletroporadas com a inserção de plasmídeos vazios. É possível perceber pela opacidade a quantidade de colônias que cresceram.

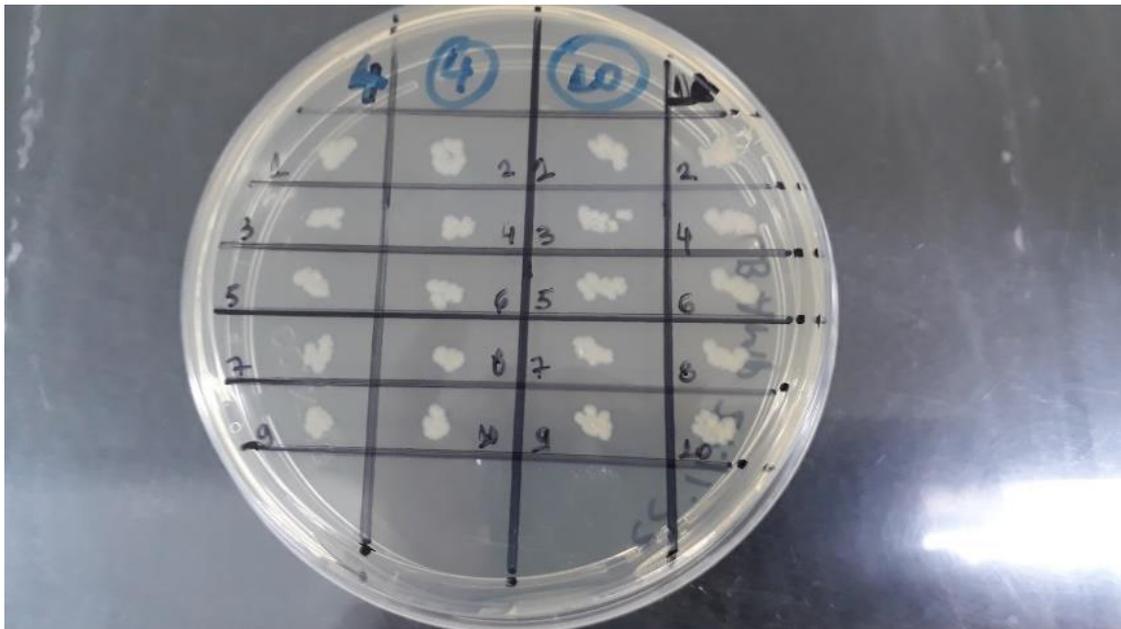
4.2.6 Isolamento das colônias de bactérias

Foi observado que houve crescimento nas placas que receberam os plasmídeos 4 e 10, como pode ser observado nas figuras 4 e 5, mas não houve crescimento na placa das bactérias eletroporadas com o plasmídeo 6.

Houve então o isolamento das colônias, com uma pipeta estéril, por meio da transferência de uma colônia isolada e com as bordas delimitadas para uma placa dividida por setores indicando a origem de cada colônia. Em cada placa com plasmídeo, 10 colônias foram escolhidas e isoladas, e 3 colônias do controle foram transferidas para uma placa LB com ampicilina e incubadas overnight (Figura 7).

Figura 7 – Bacterias isoladas

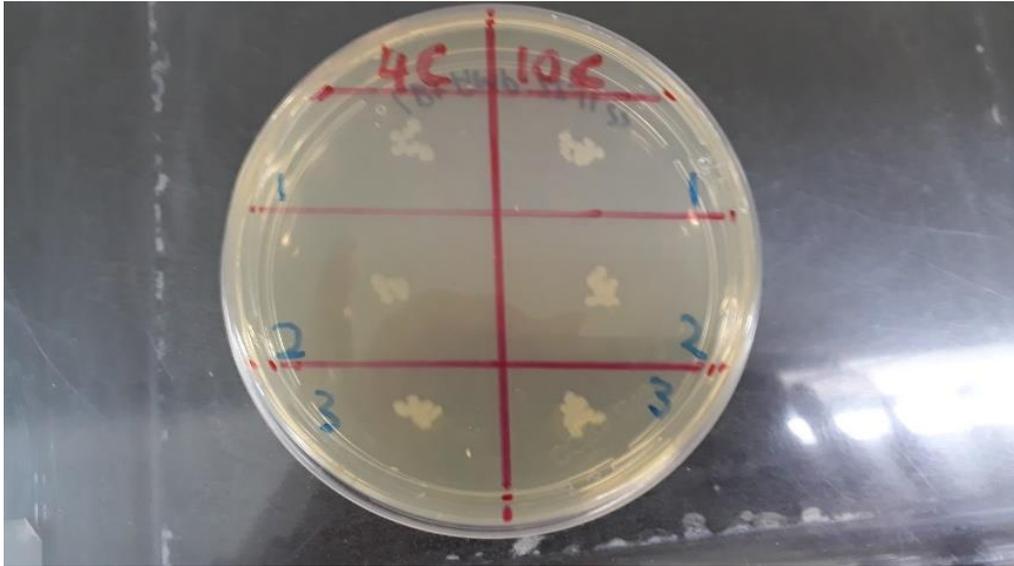
A



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Placa com colônias da E.coli isoladas (manchas brancas), separadas de acordo com a origem e indicação do plasmídeo inserido 4 e 10 através da eletroporação.

B



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Placa controle contendo colônias que foram eletroporadas sem o plasmídeo (manchas brancas), para controle negativo.

4.2.7 Extração de DNA plasmidial- Midiprep e Miniprep

Para extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit da Thermofisher *Purelink HiPure Plasmid Filter- Invitrogen*; seguindo o protocolo da empresa e obtendo a quantificação de DNA para o plasmídeo 4 (PX 458): 524 µg/ml e para o plasmídeo 10 (PX459): 533 µg/ml sendo armazenados em -20° C.

4.2.8 PCR de colônia

Para a validação da inserção do sgRNA no do plasmídeo foi realizado o PCR de colônia. O promotor U6 foi escolhido para esta verificação e para a reação foi utilizado o *primer forward*: GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC (Ran *et al*; 2013) e a sequência *reverse* de cada sgRNA foi utilizada como *primer reverse*.

A suspensão da colônia que serve de *sgRNA* estava a 100 ng, para que ficasse a 20 ng, foi adicionado 40µL de H₂O em 10 µL da solução. O cálculo foi feito com sobra de 2 amostras.

Os mixes foram elaborados seguindo a tabela abaixo (tabela 5):

Tabela 5 - Mix de Validação

Componentes	1 amostra	12 amostras
Tampão 10x	2,5 µl	30µl
dNTP 2,5	3,125µl	37,5µl
MgCL2 25	2,5µl	30µl
F U6	0,375µl	4,5µl
R gRNA 20µM	0375µl	4,5µl
Taq 5U	0,4µl	4,8µl
H2O	13,725µl	164,7µl
Volume total	23µl	276µl

Fonte: RAN *et al.*, 2013

Após a montagem, os mixes foram distribuídos (10 tubos de cada plasmídeo) e identificados como 1.1 a 1.10, 2.1 a 2.10 *etc*, onde o primeiro número indica a placa e o segundo a colônia. As placas 1 e 2 são relacionadas ao plasmídeo 4; 3 e 4 ao plasmídeo 10 e 1 tubo para o gene *CCL2*.

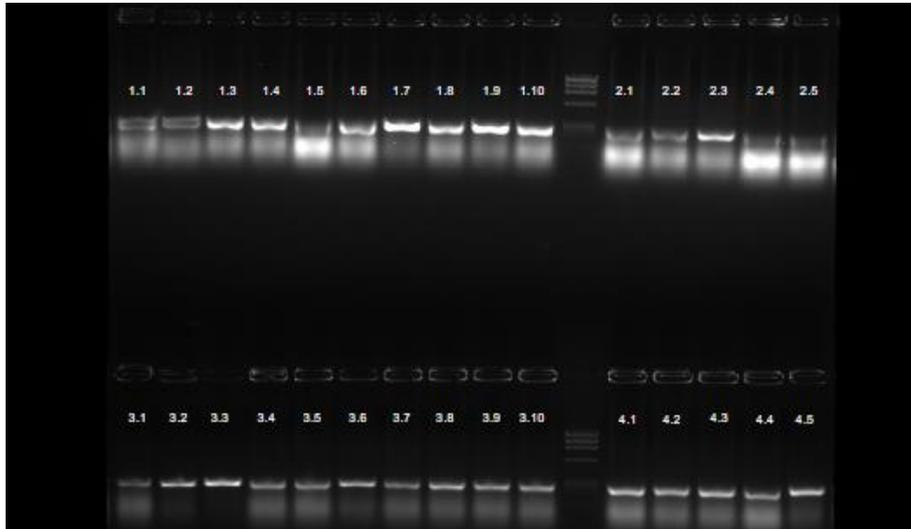
Os mixes foram preparados e o PCR foi realizado seguindo o programa: 95°C por 10 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 49°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 30 seg, seguidos de, 72 °C por 8 min e manutenção a 10°C para conservação.

4.2.9 Preparação do gel de agarose e eletroforese

Para a leitura do PCR, um gel de agarose a 2% foi preparado e colocado para correr em 120V por 30 minutos. Após a leitura em um fotodocumentador *ChemiDoc* (Bio-rad, EUA), a Figura 8 indicou que houve a inserção dos plasmídeos, com exceção do que continha o sgRNA para *CCL2*.

Figura 8 – Eletroforese

A



B



Fonte: LABORATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO, 2022.

Legenda: Figura 8 (A e B): Corrida em gel de agarose a 2% do PCR de colônia para verificação da clonagem da sequência dos RNAs guia para edição gênica. Colônias de bactérias *StbI3* foram transformadas com os plasmídeos PX459 (poços 1.1 a 1.10 e 2.1 a 2.10) e PX458 (poços 3.1 a 3.10 e 4.1 a 4.10). Poço C - colônia transformada com plasmídeo vazio. Os primers utilizados foram: U6-fwd e a sequência reversa do inserto específico de cada RNA-guia.

4.3 Outras atividades

Durante a realização do Curso de Especialização, realizei outras atividades.

Dentro do laboratório, ajudei no desenvolvimento do projeto de iniciação científica da aluna Alanis Tiozzo Souza, que tinha como objetivo a avaliação de genes relacionados à expressão e suscetibilidade da artrite reumatóide, usando as técnicas de PCR e sequenciamento.

5 DISCUSSÃO

A imunoterapia contra câncer nem sempre é eficaz. Uma das possíveis causas é a presença de moléculas de *checkpoint* imunológico em células tumorais, como o PD-1L, ligante do receptor PD-1. Este é expresso em células T ativadas, e a sua ligação resulta em anergia, dificultando a terapia com células CAR-T. Uma forma de evitar essa ligação é através da edição genética, em particular a técnica CRISPR-Cas9, para que as células CAR-T não expressem o receptor PD-1, por meio do nocauteamento do gene *PDCD1* que codifica o receptor.

Na parte prática do trabalho, obtivemos como resultados, para o gene *CCL2*, a demonstração da inserção de uma sequência genômica desejada, sua expressão em plasmídeos e verificação de inserção através da eletroforese.

Fica evidente que na escolha da sequência genômica a ser editada deve-se reduzir a probabilidade de efeitos *off-target* (fora do alvo), ou seja, a edição de sequências indesejadas devido à sua semelhança com a sequência-alvo. O preparo da placa onde será feito o crescimento da bactéria deve ser adequado e livre de contaminação.

Através do modelo de validação de *CCL2* que foi realizado no Laboratório CENTD, a escolha da linhagem da bactéria *E.coli*, linhagem *Stb13*, para a eletroporação, se mostrou muito vantajosa, pois houve ótimo crescimento no meio de cultura, evidenciado pela aparência turva e gerando uma ótima quantidade para estoque, que pode ser utilizado em outros experimentos.

Na transformação das bactérias o protocolo se mostrou viável, atentando-se com o cuidado para que a cubeta de eletroporação esteja seca, evitando que a mesma quebre ao receber a descarga elétrica.

Ao se analisar as placas semeadas com as bactérias eletroporadas, nas denominadas 4 e 10, que receberam respectivamente o PX459 e PX458, houve o crescimento, indicando que são eletrocompetentes. Já na placa 6 não houve crescimento. Para confirmar a inserção do plasmídeo, uma verificação é feita através do PCR de colônia e leitura em gel de agarose. A Figura 7 indicou que houve a inserção em todas as colônias selecionadas, assim como na Figura 8, com exceção da colônia supostamente transformada com o plasmídeo pLentiCRISPRv2 (#6), indicando que não houve a inserção, por motivos desconhecidos. Será necessário

refazer o experimento para verificar a integridade do plasmídeo ou outras hipóteses para a falha.

O método de extração Midiprep é mais vantajoso quando se necessita de maior quantidade de DNA extraído, apesar de ser mais trabalhoso o processo de extração.

Para o nocaute do gene *PDCD1*, foi escolhido o éxon com maior tamanho (360pb), e inserido no campo para o desenho do sgRNA da ferramenta on-line CRISPOR, pois as células a serem editadas são as células T humanas. Apesar dos resultados gerados, fica aberta a questão se este sgRNA gerado é eficiente para a inativação do receptor PD-1 em células T.

Desta forma, para o nocaute de gene *PDCD1* este procedimento poderia ser utilizado, pois a transformação e a inserção dos plasmídeos se mostrou viável. Os possíveis obstáculos a transpor seriam a dificuldade na transfecção das células CAR-T e a verificação de que as alterações funcionais seriam eficazes e restritas à resposta contra os tumores.

6 CONCLUSÕES

Apesar do estudo estar em andamento, a técnica CRISPR, se mostrou de fácil manuseio e mais eficaz que outras técnicas de edição genética. As ferramentas on-line são de grande ajuda e promovem maior confiança nos produtos gerados, por levar em consideração a previsão dos resultados e limitações da técnica, como efeitos fora do alvo.

A descoberta da técnica CRISPR, que foi obtida através do estudo de bactérias e sua resposta a infecções virais, demonstra que há processos na natureza que possuem potencial para o melhoramento da vida humana, abrindo espaço para maior estudo e aplicação das operações naturais.

As modificações propostas por Borrego *et al.* (2022) são eficientes para os modelos de bactérias e plasmídeos testados.

A verificação da eficácia do sgRNA gerado para o nocaute do gene *PDCD1*, por ser parte de uma proposta teórica para este trabalho, talvez não possa ser realizada na prática.

REFERÊNCIAS¹

- AKRAM, F. *et al.* CRISPR-Cas9, A Promising Therapeutic Tool for Cancer Therapy: A Review. **Protein & Peptide Letters**, v. 27, n. 10, p. 931–944, 2022.
- BUTANTAN. **Página Inicial - Repositório Do Instituto Butantan**. Disponível em: <<https://repositorio.butantan.gov.br/>>.
- BioRender**. Biorender.com. Disponível em: <<https://biorender.com/>>. Acesso em: 18 Ago. 2022.
- CAI, L. *et al.* CRISPR-mediated genome editing and human diseases. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 4, p. 244–251, dez. 2016.
- CAI, P.; GAO, J.; ZHOU, Y. CRISPR-mediated genome editing in non-conventional yeasts for biotechnological applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, 2 abr. 2019.
- CECCATO-ANTONINI, S. R.; COVRE, E. A. From baker's yeast to genetically modified budding yeasts: the scientific evolution of bioethanol industry from sugarcane. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 8, dez. 2020.
- CHEN, M. *et al.* CRISPR-Cas9 for Cancer therapy: Opportunities and Challenges. **Cancer Letters**, v. 447, p. 48–55, abr. 2019.
- CONCORDET, J.-P.; HAEUSSLER, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W242–W245, 14 maio 2018.
- COSTA, C. P. DA; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D'ÁVILA; GOISSIS, M. D. Sistema CRISPR/Cas9 e perspectivas de aplicações na cadeia produtiva animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 1, p. 18–32, 2021.
- COTOIA, A. **Saccharomyces Cerevisiae - The Definitive Guide | Biology Dictionary**. Disponível em: <<https://biologydictionary.net/saccharomyces-cerevisiae/>>. Acesso em: 9. jan. 2023.
- COVAS, D. **Terapia CAR-T: Tecnologia Mais Avançada Contra O Câncer Já Está No Brasil**. Disponível em: <<https://saude.abril.com.br/coluna/com-a-palavra/terapia-car-t-tecnologia-mais-avancada-contra-o-cancer-ja-esta-no-brasil/>>. Acesso em: 14. dez. 2022.
- CRISPOR**. Disponível em: <<http://crispor.tefor.net/>>. Acesso em 9. Nov. 2022.
- GÓES, A. C. DE S.; OLIVEIRA, B. V. X. DE. Projeto Genoma Humano: um retrato da construção do conhecimento científico sob a ótica da revista Ciência Hoje. **Ciência**

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

& Educação (Bauru), v. 20, n. 3, p. 561–577, set. 2014.

GOOGLE SCHOLAR. **Google Acadêmico**. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/>>.

HASLAUER, T. *et al.* CAR T-Cell Therapy in Hematological Malignancies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8996, 20 ago. 2021.

HU, Y. *et al.* CRISPR/Cas9-Engineered Universal CD19/CD22 Dual-Targeted CAR-T Cell Therapy for Relapsed/Refractory B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 10, p. 2764–2772, 24 fev. 2021.

JIANG, F.; DOUDNA, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. **Annual Review of Biophysics**, v. 46, n. 1, p. 505–529, 22 maio 2017.

KATTI, A. *et al.* CRISPR in cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 5, p. 259–279, 22 fev. 2022.

KHAN, F. A. *et al.* CRISPR/Cas9 therapeutics: a cure for cancer and other genetic diseases. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52541–52552, 26 maio 2016.

KOZOVSKA, Z. *et al.* CRISPR: History and perspectives to the future. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111917, set. 2021.

LINDO, L.; WILKINSON, L. H.; HAY, K. A. Befriending the Hostile Tumor Microenvironment in CAR T-Cell Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 10 fev. 2021.

PEREIRA, T. C. **Introdução À Técnica De CRISPR**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira De Genética, 2016.

POLLO, L. **COPIA, COLA E CRIA: Nova Tecnologia Facilita Edição De Genes E Complica Discussão Sobre Melhoramento Humano**. Disponível em: <<https://tab.uol.com.br/educacao/genetica/#page3>>. Acesso em: 9. jan. 2023.

PUBMED. **PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10. jan. 2023.

RAN, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 24 out. 2013.

RAZEGHIAN, E. *et al.* A deep insight into CRISPR/Cas9 application in CAR-T cell-based tumor immunotherapies. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, 28 jul. 2021.

ROSSETTI, R. *et al.* Combination of genetically engineered T cells and immune checkpoint blockade for the treatment of cancer. **Immunotherapy Advances**, v. 2, n. 1, 1 jan. 2022.

SCIELO. **SciELO - Brasil**. Disponível em: <<https://www.scielo.br/>>. Acesso em: 10. jan. 2023.

STADTMAUER, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. **Science**, v. 367, n. 6481, 28 fev. 2020.

STERNER, R. C.; STERNER, R. M. CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer Journal**, v. 11, n. 4, 6 abr. 2021.

TORRES-RUIZ, R.; RODRIGUEZ-PERALES, S. CRISPR-Cas9 technology: applications and human disease modelling. **Briefings in Functional Genomics**, v. 16, n. 1, p. 4–12, 26 jun. 2016.

VASCONCELOS, M. J. V. DE; FIGUEIREDO, J. E. F. **Edição De Genoma Com Nuclease “Zinc Finger”**. Sete Lagoas: Embrapa Milho E Sorgo, 2016.

WU, H.; CAO, C. The application of CRISPR-Cas9 genome editing tool in cancer immunotherapy. **Briefings in Functional Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129–132, 22 mar. 2018.

ZHANG, F.; WEN, Y.; GUO, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. R1, p. R40–R46, 20 mar. 2014.