

SILENCIAMENTO DE RNAs NÃO CODIFICADORES LONGOS ENRIQUECIDOS EM CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS PANCREÁTICAS ATRAVÉS DO SISTEMA CRISPR-Cas13d INDUZÍVEL

**Andressa Albuquerque Seiffert
Daniela Sanchez Basseres**

Universidade de São Paulo
andressaseiffert@usp.br

Objetivos

O objetivo deste projeto é silenciar RNAs longos não codificadores (lncRNAs) identificados como enriquecidos em células tronco-tumorais (CTTs) de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) a fim de determinar a relevância funcional desses lncRNAs para o fenótipo tronco-tumoral.

Métodos e Procedimentos

Dados públicos de RNAseq de tumores de xenoenxerto derivados de 4 pacientes de PDAC cultivados na forma de tumoresferas (que enriquece para CTTs) e na forma aderente (que não enriquece para CTTs) foram analisados para identificar lncRNAs enriquecidos em CTTs. LncRNAs promissores foram selecionados para validação funcional com base nas análises bioinformáticas e por validação por qRT-PCR. Para silenciar os lncRNAs selecionados, uma abordagem lentiviral foi utilizada para gerar linhagens celulares tumorais pancreáticas com expressão induzível de Cas13d. RNAs guias complementares aos lncRNAs de interesse foram desenhados utilizando a plataforma online *cas13d design*, e em seguida clonados em um vetor lentiviral a fim de serem utilizados para produção de lentivirus.

Resultados

Foram identificados 53 lncRNAs enriquecidos em CSCs de PDAC, e 3 (LINC01948, LINC02432 e LINC02889) foram selecionados para validação funcional. As linhagens MIA-PaCa-2-Cas13d e

PANC-1-Cas13d foram geradas e a expressão induzível de Cas13d foi confirmada por Western Blot. gRNAs para os lncRNAs selecionados foram desenhados,克隆ados e usados para produção lentiviral.

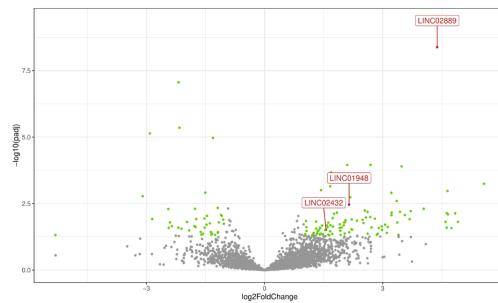


Figura 1. LncRNAs diferencialmente expressos escolhidos para validação funcional. Sancho et al. realizou RNAseq usando tumores PDX (xenoenxertos derivados de pacientes) cultivados em monocamadas aderentes (que não enriquece para CTTs) e como tumoresferas (que enriquece para CTTs). Os dados públicos de RNAseq foram reanalizados e os lncRNAs diferencialmente expressos LINC01948, LINC02432 e LINC02889 foram selecionados com base em seus valores de fold change e de expressão média entre as amostras.

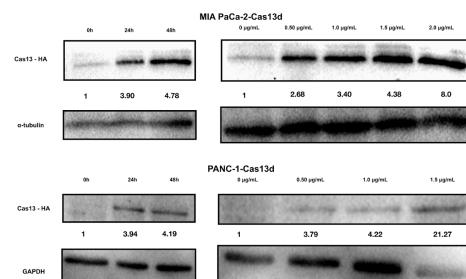


Figura 2. Expressão de Cas13d após indução com doxiciclina no pool das linhagens celulares

pancreáticas geradas. As células MIA-PaCa-2-Cas13d e PANC-1-Cas13d foram tratadas com 1 µg/mL de doxiciclina por 0h, 24h ou 48h ou tratadas por 48h com 0 µg/mL, 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 1.5 µg/mL, e 2.0 µg/mL de doxiciclina. Após extração e quantificação de proteínas, foi realizado Western Blot para determinar a expressão de Cas13d utilizando anticorpo anti-HA. Os valores abaixo das bandas indicam a intensidade relativa das bandas das amostras tratadas com doxiciclina por diferentes tempos ou concentrações normalizadas pelas mesmas amostras não tratadas com doxiciclina (0h ou 0 µg/mL), que foram arbitrariamente ajustadas para 1.

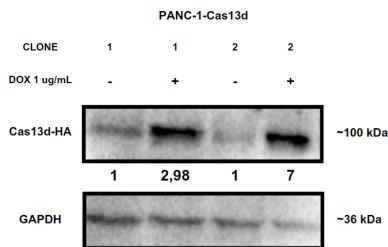


Figura 3. Expressão de Cas13d após indução com doxiciclina em células PANC-1-Cas13d submetidas à seleção clonal. Células correspondentes aos clones individuais #1 e #2 foram tratadas com 1 µg/mL de doxiciclina por 48h e comparadas às mesmas células não tratadas com doxiciclina. Após extração e quantificação de proteínas, foi realizado Western Blot para determinar a expressão de Cas13d usando anticorpo anti-HA. Os valores abaixo das bandas indicam a intensidade relativa das bandas das amostras tratadas com dox (+) normalizadas pelas mesmas amostras não tratadas (-), que foram arbitrariamente ajustadas para 1.



Figura 4. Sequenciamento de Sanger das sequências de RNAs guias clonados. Os gRNAs para os três lncRNAs Enriquecidos em CTTs Selecionados (LINC01948, LINC02432 e LINC02889) foram desenhados usando a

plataforma online *cas13d design*. Oligonucleotídeos complementares correspondentes às sequências guias foram sintetizados e clonados no vetor lentiviral pLentiRNAGuide. As sequências dos inserts foram então confirmadas por sequenciamento Sanger e os vetores foram utilizados para produção lentiviral.

Conclusões

Nós geramos linhagens celulares tumorais pancreáticas com expressão induzível de Cas13d, uma endonuclease guiada por RNA que cliva especificamente moléculas de RNA sem sobrecarregar a via de RNA de interferência endógena. Nós também clonamos as sequências de RNAs guias com alvos para os lncRNAs enriquecidos em CTTs selecionados. Estudos futuros irão avaliar a eficiência de silenciamento dos lncRNAs e ensaios funcionais serão realizados para a validação funcional dos papéis desses lncRNAs nas propriedades relacionadas às CTTs.

Agradecimentos

Este estudo teve apoio da FAPESP (processo 2023/08998-2) e da CNPq (processo 126662/2023-1).

Referências bibliográficas

- KONERMANN, S. Cell (2018). PMID: 29551272
 SANCHO, P. Cell Metab (2015). PMID: 26365176
 WESSELS, H.H. Nat Biotechnol (2020). PMID: 32518401