

GERAÇÃO DE CÉLULAS *KNOCKOUTS* DOS GENES *PARP14*, *p62* E *RNF114* VIA TECNOLOGIA CRISPR/Cas9

Fernando Pacheco Cintra^{1,2}

Prof. Dr. Nicolás Carlos Hoch²

¹Curso de Ciências Moleculares - Pró-Reitoria de Graduação (PRG-USP)

²Instituto de Química - Universidade de São Paulo (IQ-USP)

fernandopachecocintra@usp.br, nicolas@iq.usp.br

Objetivos

ADP-ribosilação (ADPr) é uma modificação pós-traducional de proteínas catalisada por uma superfamília de enzimas chamada ADP-ribosiltransferases (ARTs), mas também conhecida como PARPs. Tal modificação possui diversas funções, sendo as mais relevantes para este projeto a atuação na resposta ao interferon (IFN) e em mecanismos antivirais¹. Em infecções virais, a resposta ao IFN é iniciada como ferramenta da imunidade inata e, dentre diversas consequências, há a indução da expressão dos ISGs (*Interferon-stimulated genes*). Interessantemente, sabe-se que a expressão de certas PARPs é estimulada por IFN e que esta citocina inflamatória, tanto o tipo I quanto o tipo II, induz ADPr em células humanas - além de que um macrodomínio de Sars-Cov-2, vírus causador da COVID-19, hidrolisa esta modificação pós-traducional². Mais especificamente, existem três proteínas que estão envolvidas no contexto de ADPr em resposta ao IFN em que o laboratório possui interesse: (a) PARP14: essa proteína é uma das integrantes das ARTs e é a responsável por catalisar a ADPr nesta sinalização por IFN³; (b) p62: essa proteína atua em seleção de processos de autofagia⁴ e, em resultados preliminares, o laboratório mostrou a sua co-localização com a ADP-ribose; (c) RNF114:

essa proteína é uma Ub E3 Ligase⁵, além de que, também em resultados preliminares do laboratório, foi mostrada sua co-localização com a ADP-ribose. Com isso, há a necessidade de prosseguir a exploração bioquímica da ADPr em resposta ao IFN e o objetivo deste trabalho é gerar, via CRISPR/Cas9, células *knockout* de PARP14, de p62 e de RNF114 a fim de possibilitar novos experimentos que elucidem o papel - catalítico e/ou regulador - destas proteínas dentro deste contexto.

Métodos e Procedimentos

A construção de células *knockouts* consiste em 5 grandes etapas com seus respectivos procedimentos. (i) Desenho de RNAs guias (gRNAs): utiliza-se ferramentas de bioinformática, como a plataforma *Benchling*, que identificam sequências de 20 nucleotídeos precedidas por uma sequência PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) 5'-NGG-3'. Como critérios de seleção, usa-se a eficiência de corte e a minimização de efeitos *off-target*, e três gRNAs distintos são selecionados para cada gene. Além disso, adicionam-se sequências complementares aos sítios de restrição da enzima utilizada. (ii) Clonagem: os gRNAs são fosforilados (T4 PNK, NEB) e anelados (37°C por 30 min, 95 por 5 min e descer temperatura gradualmente até 25°C) e, então, ligados (T4 DNA Ligase) ao DNA plasmidial, que é digerido com enzima de

restrição e purificado via eletroforese em gel de agarose 1%. Então, as bactérias *NEB 5-alpha Competent E. coli*, que são derivadas de DH5 α , são transformadas com o plasmídeo ligado e plaqueadas em LB-ágar contendo ampicilina para haver a seleção *overnight* das bactérias transformadas e, logo, a clonagem das colônias escolhidas. Posteriormente, os plasmídeos são extraídos utilizando o kit comercial *Monarch® Plasmid Miniprep Kit* e submetidos ao sequenciamento Sanger para validar a clonagem. (iii) Transfecção: cada tipo de plasmídeo é transfectado via eletroporação em células hTERT RPE-1 e em células A549 e são posteriormente selecionadas com o antibiótico correspondente. (iv) Validação dos *knockouts*: as células selecionadas têm seu DNA genômico extraído e submetido a PCR e a sequenciamento a fim de observar a diferença causada pela Cas9 no gene alvo. Além disso, a perda da expressão da proteína alvo é confirmada por Western blot e imunofluorescência. (v) Expansão: os clones confirmados como *knockouts* para cada um dos genes são então expandidos em condições de cultura padrão e preservados em criotubos no nitrogênio líquido para experimentos futuros.

Resultados parciais

O desenho dos plasmídeos para PARP14, para p62 e para RNF114 foram bem-sucedidos. Além disso, foram concluídos a fosforilação e o anelamento dos gRNAs, seguidos da ligação do inserto no plasmídeo eSpCas9(1.1), que foi antes digerido com BbsI. Ademais, foi feita a transformação destes plasmídeos em bactérias competentes, a seleção via antibiótico, o crescimento destes microrganismos e a extração do DNA plasmidial, faltando apenas o sequenciamento para validação e, assim, finalização da etapa de clonagem.

Conclusões

A situação avançada do processo de clonagem é um indicador promissor de que o sistema CRISPR/Cas9 foi montado adequadamente e está pronto para ser utilizado nas etapas seguintes. A validação da clonagem via

sequenciamento Sanger é uma fase crucial para o processo, pois comprova se os gRNAs foram realmente ligados com sucesso ao plasmídeo. Com isso, estabelece-se, então, as bases para as próximas etapas do projeto, que são transfectar as células eucarióticas, validar e expandir estas células que serão *knockouts*. Assim, será possível, promover experimentos em células PARP14-KO, p62-KO e RNF114-KO para elucidar o papel destas proteínas no processo de ADPr em resposta ao interferon.

Agradecimentos

Agradecimentos à FAPESP pelo financiamento desta pesquisa e do laboratório. Número dos processos: FPC, 2024/04283-1; NCH, 2018/18007-5.

Referências

- [1] Hoch NC, Polo LM. ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease. *Genet Mol Biol.* 2019;43(1 suppl 1):e20190075. Published 2019 Dec 13. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2019-0075
- [2] Russo LC, Tomasin R, Matos IA, et al. The SARS-CoV-2 Nsp3 macrodomain reverses PARP9/DTX3L-dependent ADP-ribosylation induced by interferon signaling. *J Biol Chem.* 2021;297(3):101041. doi:10.1016/j.jbc.2021.101041
- [3] Ribeiro VC, Russo LC, Hoch NC. PARP14 is regulated by the PARP9/DTX3L complex and promotes interferon γ -induced ADP-ribosylation. *EMBO J.* 2024;43(14):2908-2928. doi:10.1038/s44318-024-00125-1
- [4] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.* 2017 Dec 12;61(6):609-624. doi:10.1042/EBC20170035.
- [5] Zhu K, Suskiewicz MJ, Hloušek-Kasun A, Meudal H, Mikoč A, Aucagne V, Ahel D, Ahel I. DELTEX E3 ligases ubiquitylate ADP-ribosyl modification on protein substrates. *Sci Adv.* 2022 Oct 7;8(40):eadd4253. doi:10.1126/sciadv.add4253.