



Laboratório Nacional de Biociências
Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais



Projeto para solicitação de bolsa PIBIC/CNPq

Geração de camundongo nocaute condicional para o receptor nuclear órfão COUP-TFII por CRISPR/Cas9

Pesquisador responsável: Dr. José Xavier-Neto (LNBio/CNPq)

Co-orientadora: Dra. Ângela Saito (LNBio/CNPq)

Campinas, maio de 2016

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Regulação da expressão atrial-específica de *slow myosin heavy chain 3*

As câmaras atriais e ventriculares apresentam diferentes propriedades morfológicas e eletrofisiológicas, além de expressão distinta do repertório de genes membros da família de proteínas contráteis. As isoformas de miosina são comumente utilizadas como marcadores específicos das identidades atriais e ventriculares, e têm contribuído para a determinação dos mecanismos que levam a dicotomia cardíaca. As miosinas de cadeia pesada, AMHC1 e SMYHC3; miosinas de cadeia leve, MLC-1a e MLC-2a; e fator natriurético atrial, ANF, apresentam expressão específica no território atrial (Wang et al. 1996, 1998; Yutzey et al., 1994; Zeller et al. 1987), enquanto as miosinas MLC-2v e β -MyHC são restritas ao território ventricular (Lyons et al. 1990; O'Brien et al. 1993).

O gene SMYHC3 (*slow myosin heavy chain 3*) codifica a isoforma 3 da cadeia pesada de miosina lenta de maneira atrial-específica no coração de codorna (*Coturnix japonica*) adulta e embrionária, e na musculatura dos membros durante os estágios embrionários. No adulto, mais especificamente nas fibras musculares lentas, a SMYHC3 é substituída pelas isoformas 1 e 2 da cadeia pesada de miosina lenta (Nikovits et al. 1996; Wang et al. 1996). Durante o desenvolvimento embrionário da codorna, o gene SMYHC3 é expresso em todo o território do coração tubular, mas a medida que há formação das câmaras cardíacas, a expressão de SMYHC3 é gradualmente reduzida nos ventrículos e mantida nos átrios (Wang et al. 1998).

Estudos moleculares em cultura de cardiomiócitos de codorna e em embriões identificou, no promotor 5' do gene SMYHC3, uma região de 160 pb (entre -840 e -680 pb), denominada domínio atrial regulatório 1 (ARD1) e responsável pela sua expressão atrial-específica. Deleções ou mutações no elemento *Vitamin D₃ Receptor-like* (VDR) dentro do ARD1 do promotor de SMYHC3 revelou que este elemento controla a expressão específica atrial do gene através de regulação negativa (Wang et al., 1996). Outro elemento presente na sequência ARD1, o elemento GATA, mostrou-se regular positivamente a expressão do gene SMYHC3 por todo o coração tubular e subsequentemente no átrio. Durante a transição do coração linear para a formação das câmaras cardíacas, a restrição da expressão de SMYHC3 para o território atrial é mediada pelo elemento VDR, que age como um elemento inibitório da expressão de SMYHC3 no ventrículo dos cardiomiócitos (Wang et al. 1998).

Para estudar se a expressão do promotor SMyHC3 poderia refletir a restrição sino-atrial da sinalização de ácido retinóico (AR) em camundongos, a região proximal de 840 pb do promotor do gene SMyHC3 foi utilizada para dirigir a expressão do gene repórter da fosfatase alcalina humana (HAP) através do camundongo transgênico SMyHC3-HAP. A expressão deste transgene mostrou estar relacionada diretamente com a intensidade da instalação do programa atrial, o que tornou o SMyHC3-HAP um excelente marcador da escolha do fenótipo atrial por parte dos cardiomiócitos (Xavier-Neto et al. 1999).

Muitos resultados de nosso grupo obtidos com várias técnicas ao longo dos últimos anos apontam para o receptor nuclear COUPTF-II, implicado no desenvolvimento do átrio e sistema venoso, como o melhor candidato a ativador atrial do gene SMyHC3. Nosso grupo identificou uma região de 33 pares de base (pb) no promotor de SMyHC3 denominada Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN) e determinou os nucleotídeos do ECRRN responsáveis pela ativação atrial e repressão ventricular em embriões de camundongos transgênicos. Ensaios celulares de transativação do gene repórter da luciferase sob o controle do promotor de SMyHC3 demonstrou que a ativação desse promotor por COUP-TFII requer a presença do ECRRN.

O receptor nuclear órfão COUP-TFII

O receptor nuclear COUP-TFII (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors*) pertence à superfamília de receptores nuclear COUP-TFs. Estes receptores são considerados órfãos por não possuírem ligante conhecido. Em vertebrados, dois homólogos são conhecidos, o COUP-TFI (NR2F1 ou EAR3) e o COUP-TFII (NR2F2 ou ARP-1), os quais apresentam domínios altamente similares: domínio de ligação ao DNA (DBD) localizado na região N-terminal e o domínio de ligação ao ligante (LBD) C-terminal. O DBD e o LBD de COUPTF-I e COUPTF-II dividem 98% e 96% de identidade de aminoácidos, respectivamente. Ambos os receptores são altamente conservados evolutivamente; os COUP-TFs de humano possuem quase 95% de identidade com as proteínas homólogas de outros vertebrados e invertebrados, o que sugere que os COUP-TFs possam ser membros primordiais da família de receptores nuclear (Tsai and Tsai 1997).

Os receptores COUP-TFs têm se mostrado importantes em processos como angiogênese, desenvolvimento cardíaco e neural. Ambos, COUP-TFI e COUP-TFII, são expressos durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário murino e a sua

expressão é reduzida logo após o nascimento. O COUP-TFI é expresso principalmente no sistema nervoso central e periférico, enquanto o COUP-TFII é detectado no mesenquima de diversos órgãos e na vasculatura em desenvolvimento (Pereira et al. 2000; Pereira et al. 1995). A inativação gênica de COUP-TFII, gerado por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias, revelou que 2/3 dos camundongos heterozigotos morrem antes do desmame e a deleção homozigótica do COUP-TFII é letal em cerca de 10 dias de gestação. Os embriões desenvolvem-se mais lentamente e apresentam severa hemorragia e edema em 9.5 dias pós-coito (dpc) (Pereira et al. 1999). Análises histológicas mostraram formação de vasos sanguíneos exacerbados, desenvolvimento anormal do átrio, seio venoso e veias cardinais. Análises moleculares e imunológicas do sistema vascular mostraram uma redução na extensão e complexidade da microvasculatura na região da cabeça e da espinha, sugerindo defeitos na angiogênese e no remodelamento da vasculatura nos mutantes de COUP-TFII (Pereira et al. 1999).

Mais recentemente, foi demonstrado que a principal função do COUP-TFII no miocárdio é a determinação da identidade atrial através da ligação direta e modulação do padrão de expressão de genes importantes no desenvolvimento atrial e ventricular (Wu et al., 2013). Também, a deleção condicional de COUP-TFII em células do endotélio, as leva a adquirem características arteriais, tais como a expressão de marcadores arterial neurofilina-1 (NP-1) e moléculas da sinalização de Notch, demonstrando que COUP-TFII exerce papel importante na repressão da sinalização de Notch para manter a identidade venal (You et al., 2005).

O Sistema CRISPR/Cas9 para edição do genoma

Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) surgiu como uma eficiente ferramenta para introduzir modificações específicas no genoma, através de clivagem de DNA pela endonuclease Cas9 guiada por um pequeno RNA que parecia em vinte nucleotídeos no DNA alvo (Barrangou, 2012; Cong et al., 2013; Jinek et al., 2012). Comparado aos métodos antigos que utilizam nucleases engenheiradas para introduzir quebras de dupla-fita de DNA, ZFNs e TALENs, o sistema CRISPR/Cas9 tem se mostrados mais simples de se desenhar e construir, mais específico, e eficiente para edição de múltiplos genes simultaneamente, passível de ser realizado em diversos tipos celulares e organismos

modelo (Chang et al. 2013; Cong et al. 2013; Gratz et al. 2013; Hwang et al. 2013; Jao et al. 2013; Mali et al. 2013; Wang et al. 2013; Yang et al. 2013).

Embora a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 no contexto de edição do genoma seja recente, a compreensão da função biológica dos elementos repetitivos, conhecidos como CRISPR e encontrados em toda a diversidade de Bactéria e Archaea, levou quase duas décadas de estudos (Ishino et al., 1987; Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2000, 2005). O *loci* CRISPR tipicamente contém um grupo de genes Cas (*CRISPR-associated*) e uma assinatura de arranjos CRISPR - uma série de pequenas sequências repetitivas (*direct repeats*) regularmente espaçadas por sequências variáveis (*spacers*), que correspondem à sequências de elementos genéticos invasores. Enquanto os genes Cas são traduzidos em proteínas, a maioria dos arranjos CRISPR são primeiro transcritos em RNAs únicos, seguidos de processamento em pequenos CRISPR RNAs (crRNAs), os quais direcionam a atividade nucleolítica de algumas enzimas Cas para degradar DNAs de fagos invasores (Barrangou et al. 2007; Jinek et al. 2012; Mojica et al. 2005). As proteínas Cas, CRISPR RNAs (crRNAs), *trans*-activating crRNA (tracrRNA) formam complexos ribonucleicos, os quais detectam e degradam ácidos nucleicos estrangeiros, guiados pelos crRNAs (Jinek et al., 2012). Um complexo ribonucleoprotéico é criado com a proteína Cas9 e com uma estrutura pareada formada pelo *trans*-activating crRNA (tracrRNA) e o crRNA alvo para permitir a clivagem da sequência específica do DNA invasor. Além da duplex tracrRNA:crRNA, a Cas9 também precisa de um pequeno motivo 5'-NGG (do inglês, *protospacer adjacent motif* - PAM), localizado a jusante à região complementar no DNA alvo (Figura) (Barrangou, 2012; Jinek et al., 2012).

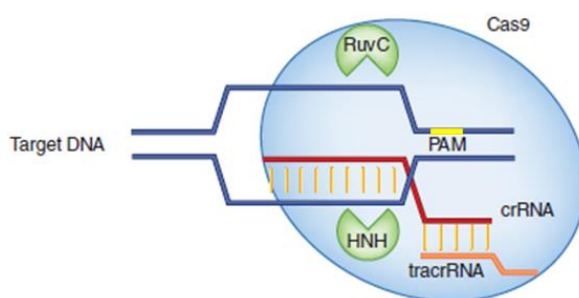


Figura 1: Ilustração esquemática da clivagem de DNA pela Cas9 guiada pelo crRNA, como ocorre no sistema imune adaptativo de Bactéria e *Archaea*. A proteína Cas9 (azul claro) combina com o crRNA (vermelho) e tracrRNA (laranja) para formar um complexo de interferência ribonucleoprotéico. A sequência crRNA guia o complexo de interferência até uma sequência complementar no DNA alvo (azul escuro). Uma vez que o R-loop é formado (veja a estrutura aberta), os domínios da Cas9 HNH e RuvC cortam em “nick” as fitas de DNA complementar e não-complementar, respectivamente, aproximadamente três nucleotídeos a montante da sequência PAM (amarelo) (modificado de Barrangou, 2012).

Considerando a potencial utilidade do sistema CRISPR/Cas9 para clivagem de DNA e modificação do genoma, Jinek e colaboradores (2012) criaram um RNA guia único (do inglês, *single-guide RNA* - sgRNA) consistindo da fusão de um crRNA e tracrRNA e mostraram que este sgRNA pode guiar a endonuclease Cas9 para induzir quebra de dupla-fita de DNA (DSB) em *loci* específico no genoma. Em resposta à clivagem no DNA, mecanismos de reparo celular são estimulados (Figura 2), como a via NHEJ (do inglês, *nonhomologous end joining*) ou a via de reparo por homologia HDR (do inglês, *high-fidelity homology-directed repair*). Quando a via de reparo NHEJ é ativada, na ausência de um DNA molde, pequenas inserções ou deleções (*indels*) podem ser deixadas, o que pode resultar em mudança do códon de leitura e/ou a criação de um códon de parada prematuro (Chen et al., 2011; Cong et al., 2013). Por outro lado, DSBs podem facilitar a recombinação homóloga através de HDR, na presença de um DNA molde exógeno, e gerar modificações definidas no genoma. O molde de reparo pode ser uma construção de vetor alvo contendo dois braços de homologia ou um oligonucleotídeo de DNA de uma única fita (ssODNs) (Chen et al. 2011).

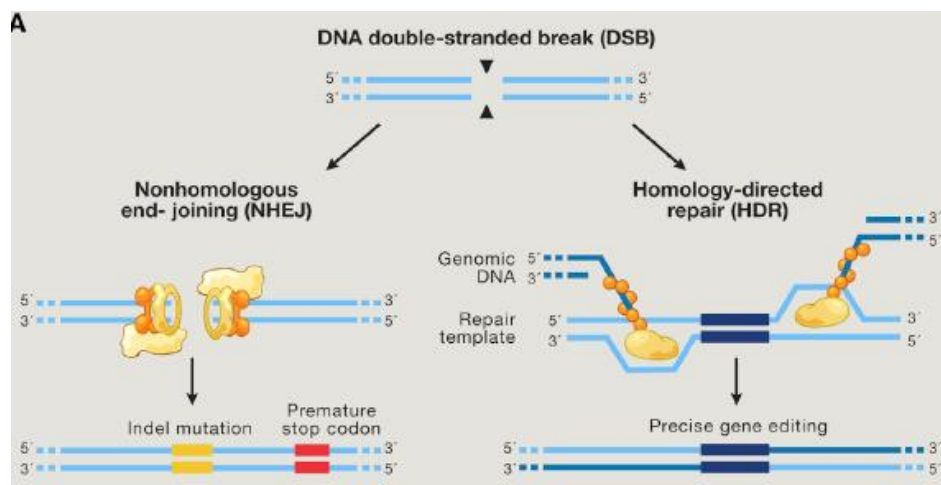


Figura 2: Edição do genoma gerada pela maquinaria de reparo de quebra de dupla-fita de DNA (DSB). DSBs são tipicamente reparadas por NHEJ (do inglês, *nonhomologous end-joining*) ou por HDR (*homology-directed repair*). Na via de reparo que deixa erros, NHEJ, heterodímeros formados pelas proteínas Ku ligam-se às terminações da DSB e atuam como suporte molecular para proteínas de reparo associadas. Inserções ou deleções (*indels*) são introduzidas quando as pontas das fitas de DNA complementares são unidas e o reparo é desalinhado devido a micro-homologia, levando a mutações que eventualmente levam a alteração do códon de leitura ou nocaute do gene. Alternativamente, as proteínas Rad51 podem unir as terminações da DSB durante a fase de HDR, recrutando fatores acessórios que direcionam recombinação genômica com os braços de homologia do DNA exógeno (Extraído de Hsu et al., 2014).

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido aprimorado para induzir modificações específicas no DNA de mamíferos (Cong et al., 2013). Foi desenvolvido um vetor

bicistrônico contendo o promotor U6 de RNA polimerase III, o qual dirige a expressão do sgRNA e, o promotor de CBh, que dirige a expressão da endonuclease Cas9 de *S. pyogenes*, cujos códons foram humanizados (*hSpCas9*) e extremidades foram fusionadas à sinais de localização nuclear (do inglês, *nuclear localization signals* - NLSs). O sgRNA é formado por uma sequência alvo (chamada de *protospacer sequence*) que parecia com 20 nucleotídeos no gene de interesse e é expressa em fusão com uma sequência de RNA transativador, formando um guia de RNA para a Cas9. Um requerimento para a seleção do sítio de clivagem pela Cas9 é a presença de uma sequência PAM (*protospacer adjacent motif*), que consiste de um 5'-NGG localizado diretamente 3' à sequência alvo de 20 pb (Cong et al., 2013; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013).

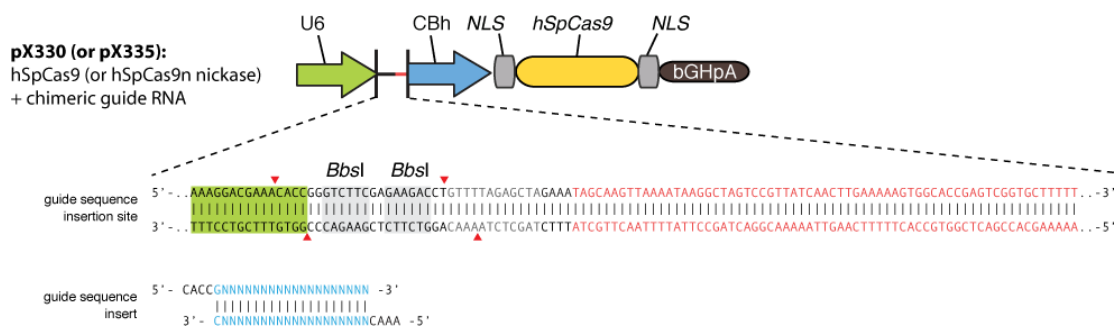


Figura 3: Esquema do vetor de expressão bicistrônico px330 utilizado no sistema CRISPR/Cas9. Este vetor contém o promotor U6 de RNA polimerase III, o qual dirige a expressão do sgRNA e, o promotor de CBh, que dirige a expressão da endonuclease Cas9 de *S. pyogenes*, cujos códons foram humanizados (*hSpCas9*) e extremidades foram fusionadas à sinais de localização nuclear (*nuclear localization signals*- NLSs). A sequência alvo de 20 nucleotídeos (em azul) é clonada nos sítios de BbsI do vetor para que seja transcrita em fusão com uma sequência transativadora (parcialmente indicada em vermelho)(extraído de <http://www.genome-engineering.org/crispr/>).

Dado que a endonuclease Cas9 pode tolerar algumas bases mal pareadas (ou *mismatches* em inglês), cuidado especial deve ser tomado para evitar atividade de clivagem fora da sequência alvo (ou *off-targets* em inglês) (Hsu et al., 2013). Atualmente, é possível utilizar ferramentas computacionais para buscar no genoma possíveis sítios *off-targets* de uma dada sequência alvo (Ran, et al. 2013b; Xiao et al. 2014). Embora o padrão de bases não pareadas a serem toleradas pela Cas9 variar para cada sgRNA, demonstrou-se experimentalmente que alguns fatores interferem na tolerância da Cas9 às bases mal pareadas. Os 12 nucleotídeos da sequência alvo mais próximos do NGG compõem a região *seed* e são mais críticos para a tolerância da nuclease. A concentração da enzima também é importante. As bases não pareadas tendem a ser mais toleradas quando a Cas9 está em altas concentrações (Hsu et al. 2013; Ran et al. 2013b). Embora a atividade de clivagem em sítios inespecíficos seja vista como uma preocupação, um desenho criterioso

e a utilização de ferramentas computacionais para buscar um sgRNA mais específico pode superar esta dificuldade. Também, no contexto de geração de linhagens de animais modificados, as possíveis mutações *offtargets* acabam sendo “diluídas” a cada geração de cruzamentos, e diferentes linhagens do mesmo mutante podem ser criadas para a comparação do fenótipo entre elas.

Uma alternativa para reduzir os *offtargets* é a utilização de uma endonuclease Cas9 contendo mutações em seus domínios catalíticos para convertê-la em *nickase* (*SpCas9n*). Os domínios catalíticos HNH e RuvC I da endonuclease *SpCas9* clivam as fitas de DNA complementar e não-complementar, respectivamente. Uma substituição do aminoácido aspartato para alanina (D10A) no domínio RuvC I a converte em uma *nickase* de DNA (Cong et al., 2013). Assim, uma vez que clivagens em somente uma das fitas do DNA são reparados predominantemente pela via de reparo por excisão de base (do inglês, *base excision repair* - BER), o qual apresenta alta-fidelidade (Dianov & Hübscher, 2013), a *spCas9n* pode ser utilizada para reduzir a atividade de *offtarget* através do uso de um par de sgRNAs apropriadamente espaçados e orientados para introduzir clivagens em fita simples do DNA, gerando cortes de ambas as fitas (Ran et al. 2013a).

Atualmente, o sistema CRISPR/Cas9 tem se mostrado uma ferramenta flexível para uma série de aplicações (Hsu et al., 2014). Essa versatilidade foi alcançada com a criação de uma nuclease Cas9 contendo os dois domínios catalíticos HNH e RuvC I mutados, tornando a enzima inativa ou “morta” (*dead Cas9*, dCas9). No entanto, ela ainda retém a habilidade de se ligar ao DNA através da especificidade do sgRNA. Assim, a dCas9 pode ser utilizada como plataforma para reguladores transcricional de DNA, com o intuito de ativar ou reprimir a função dos genes, pela fusão da dCas9 a domínios regulatórios (Gilbert et al., 2013). Também, dCas9 tem sido aplicada para purificar qualquer sequência do genoma especificada por um determinado sgRNA em experimentos denominados *enChIP* (*engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP*). Nesse caso, a dCas9 é fusionada a um epítipo Flag para ser imunoprecipitada juntamente com o DNA genômico ligado ao sgRNA (Fujita & Fujii, 2013). Outra aplicação da dCas9 é facilitar a identificação de regiões no genoma em células vivas através da fusão da enzima com um marcador fluorescente, como GFP, e utilização de um único sgRNA (Chen et al., 2013).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é gerar uma linhagem de camundongo nocaute condicional COUP-TFII^{f/f} para inativação da expressão de COUP-TFII especificamente nos domínios atriais e ventriculares do coração do embrião de camundongo e demonstrar de forma fisiológica e definitiva o papel de COUP-TFII na ativação da expressão atrial-específica de SMyHC3 *in vivo*. O alelo condicional será importante para evitar a letalidade embrionária do mutante homozigoto de COUP-TFII no início do desenvolvimento murino. Sendo assim, utilizaremos a recente tecnologia CRISPR/Cas9 para introduzir dois sítios loxP, um a jusante do exon 1 e outro a montante do exon 3, no gene *Nr2f2* através do mecanismo de reparo por recombinação homóloga (HDR).

Objetivos específicos:

- 1. Clonagem das sequências alvos no vetor de expressão bicistrônico px330 para a expressão do RNA guia (sgRNA) e endonuclease Cas9.** Serão clonadas três sequências alvos direcionadas para a região a jusante ao exon 1 e três sequências alvos para a região a montante ao exon 3 do gene *Nr2f2*, o qual codifica o COUP-TFII. O sgRNA é composto de sequência alvo + sequência do RNA transativador.
- 2. Transcrição *in vitro* dos sgRNAs e mRNA da endonuclease Cas9.** A sequência do promotor T7 será incluído na região codificante da Cas9 e no sgRNA. Os RNAs guias e o mRNA da Cas9 serão gerados através de transcrição *in vitro* utilizando a enzima T7 RNA polimerase.
- 3. Genotipagem dos animais obtidos a partir da injeção em pró-núcleo de embrião de camundongo.** O mRNA da Cas9, dois sgRNAs e os respectivos DNAs doadores contendo as regiões de homologia e sequências loxP serão micro-injetados em pró-núcleo de embrião de camundongo pela equipe do Laboratório de Modificação do Genoma (LMG-LNBio). O DNA genômico dos animais obtidos será extraído da cauda e utilizado para amplificação das regiões de integração do sítio loxP. Os *amplicons* gerados serão submetidos ao teste de digestão por enzima de restrição para verificar a inserção da sequência loxP. A confirmação final será realizada através de sequenciamento de DNA.

4. Acasalamento do camundongo contendo o alelo condicional COUP-TFII^{ff} com o transgene SMyHC3-eGFP. SMyHC3-eGFP expressa o gene repórter eGFP sob o controle do elemento de 840 pares de base (pb) do promotor de codorna SMyHC3 em estruturas sino-atriais. A presença do transgene SMyHC3-eGFP permitirá identificar mais facilmente o território atrial e ventricular durante o início do desenvolvimento do embrião nocaute para COUP-TFII, consistindo, portanto, uma importante ferramenta para demonstração do papel de COUP-TFII na regulação da expressão atrial-específica de SMyHC3.

5. Acasalamento do camundongo COUP-TFII^{ff}/SMyHC3-eGFP com o transgene GATA4-Cre recombinase. O fator de transcrição GATA4 é expresso desde o início da formação do tubo cardíaco, portanto, a expressão de Cre recombinase ocorrerá somente nas células cardíacas. A ativação da recombinação mediada por Cre será controlada através da injeção intraperitoneal de tamoxifeno em estágios iniciais do desenvolvimento.

3. RESULTADOS PRELIMINARES:

Desenho da estratégia para geração de linhagem de camundongo nocaute condicional de COUP-TFII^{ff}

O COUP-TFII é transcrito pelo gene *Nr2f2*, localizado na fita reversa do cromossomo 7 em camundongos. Este gene possui 3 exons e 2 variantes de transcrito (Figura 4). O transcrito 1 é o mais longo com 1245 nucleotídeos, e o transcrito 2 possui apenas 846 nucleotídeos.

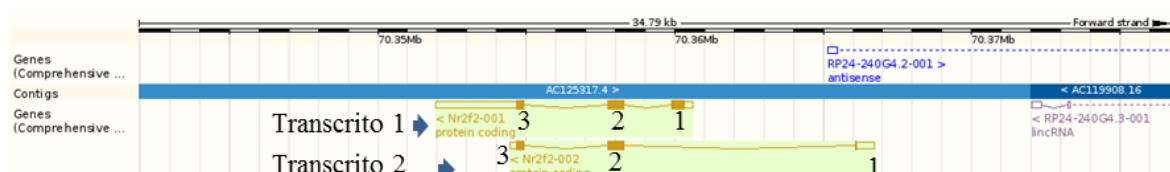


Figura 4: Ilustração esquemática dos transcritos de COUP-TFII. Estão representados os dois transcritos (transcritos 1 e 2), bem como seus exons correspondentes (quadrados amarelos).

A estratégia consiste na inserção de uma sequência loxP a jusante do exon 1 do transcrito 1 e outra sequência loxP a montante do exon 3 de ambos os transcritos (Figura 5). Utilizou-se o programa CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>)

para escolher as sequências guias com melhor *score* para cada sítio. O outro componente do sistema, o DNA para recombinação homóloga e inserção das sequências loxP nos sítios de quebra pela endonuclease Cas9 também já foi desenhado e está demonstrado na Figura 5 como *Oligo donor*.

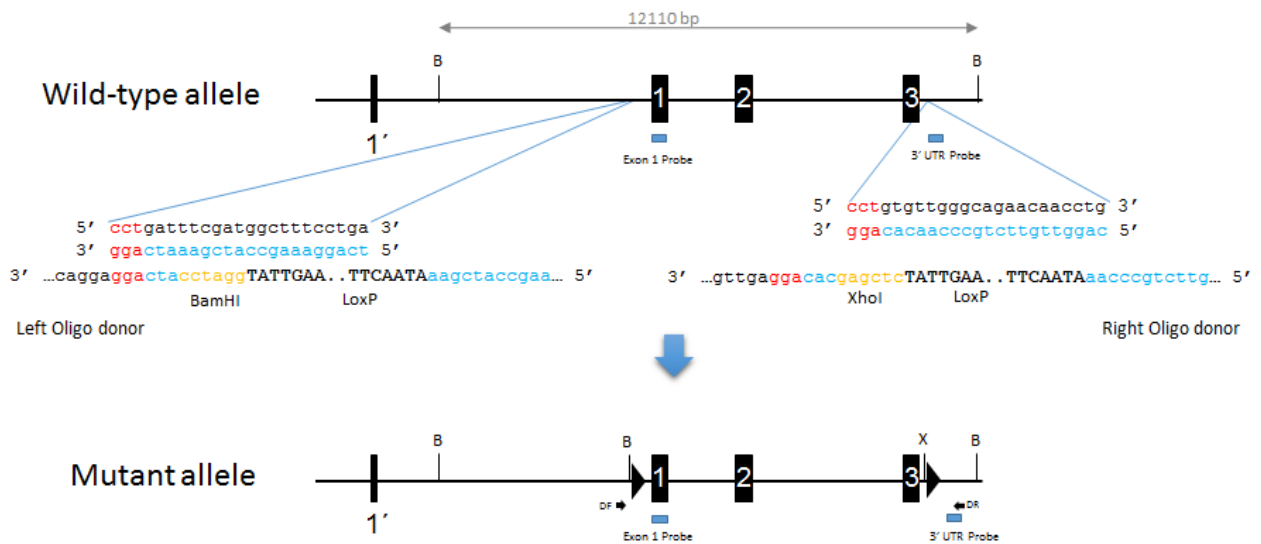


Figura 5: Esquema representativo da estratégia de geração do nocaute condicional para o gene *Nr2f2* (COUP-TFII^{f/f}) pelo sistema CRISPR/Cas9. As sequências alvo de 20 nucleotídeos estão representadas em azul. A endonuclease Cas9 realiza a clivagem das duas fitas de DNA em cerca de 3 nucleotídeos a montante da sequência PAM (em vermelho). Os DNAs contendo regiões de homologia, a sequência loxP e sítio de enzima de restrição BamHI ou XhoI estão demonstrados como “oligo donor”.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho das sequências alvo e clonagem no vetor px330

A ferramenta de análise CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) é utilizada para identificar e classificar os sítios alvos mais adequados e computacionalmente prever os sítios *off-target* de cada sequência alvo. Se a sequência alvo de 20 nucleotídeos não iniciar com uma base guanidina, a eficiência de transcrição do promotor U6 pode ser reduzida. Nesse caso, uma guanidina é adicionada na primeira posição da porção 5', formando uma sequência alvo de 21 bases (Ran et al. 2013).

Para cada construção de sgRNA, dois oligonucleotídeos (oligo) que correspondem à fita de DNA superior e à fita inferior da sequência alvo são anelados através de incubação de 2 µL do oligo superior a 100 µM, 2 µL do oligo inferior a 100 µM, 2 µL de tampão 10x da T4 DNA ligase buffer (New England Biolab - NEB) e 14 µL de água, nas

seguintes condições: incubação a 95°C por 5 min, redução para 25°C à 0,1°C/segundo, 25°C por 10 min. Para clonagem do oligo anelado no vetor px330/px335, o vetor é digerido com a enzima de restrição BbsI (NEB) e é purificado. O vetor linearizado (100 ng) é então ligado ao oligo anelado (2 µL) utilizando 1 µL de T4 DNA ligase (NEB), 1 µL de 10 mM ATP e tampão da T4 ligase. A reação de ligação é incubada à 16°C por 16 h, transformada em bactérias DH5α termo-competentes e plaqueada em meio LB sólido contendo 100 µg/mL de ampicilina. A confirmação de clonagem é realizada por sequenciamento de DNA com o primer U6 seq F (GAGGGCCTATTCCCATGATTCCTTC).

Transcrição *in vitro*

Os RNAs guias serão gerados através de transcrição *in vitro* utilizando a enzima T7 RNA polimerase (MEGAscript T7 kit, Life Technologies) e o produto de PCR T7-sgRNA como molde. O mRNA da Cas9 será gerado por transcrição *in vitro* utilizando o kit mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA kit (Life Technologies) e o produto de PCR T7-Cas9 como molde.

Genotipagem dos camundongos

Os camundongos originados da injeção pró-nuclear dos componentes do sistema CRISPR/Cas9 ou dos cruzamentos subsequentes serão genotipados através de extração de DNA genômico (gDNA) da cauda do animal e PCR para amplificar as regiões de inserção utilizando a enzima Phusion. O fragmento amplificado (cerca de 1000 pb) será purificado com kit de purificação de PCR (Qiagen) e submetido ao ensaio com a T7 endonuclease I, enzima que cliva heteroduplexes de DNA. Alternativamente, ensaios de digestão com os sítios de enzimas de restrição inseridos também serão realizados para checar a recombinação. Após o *screening* inicial dos animais, a confirmação do genótipo de cada um será realizada por meio de sequenciamento da região mutada.

5. REFERÊNCIAS

- Barrangou, R. (2012). RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nature Biotechnology*, 30(9), 836–8.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–12.
- Chang, N., Sun, C., Gao, L., Zhu, D., Xu, X., Zhu, X., ... Xi, J. J. (2013). Genome editing with RNA-

- guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Research*, 23(4), 465–72.
- Chen, B., Gilbert, L. A., Cimini, B. A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.-W., ... Huang, B. (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 155(7), 1479–91.
- Chen, F., Pruett-Miller, S. M., Huang, Y., Gjoka, M., Duda, K., Taunton, J., ... Davis, G. D. (2011). High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature Methods*, 8(9), 753–5.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–23.
- Dianov, G. L., & Hübscher, U. (2013). Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3483–90.
- Fujita, T., & Fujii, H. (2013). Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 132–6.
- Gilbert, L. a, Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. a, Torres, S. E., ... Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–51.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., ... O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4), 1029–35.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(July), 1–8.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., ... Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227–9.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, a. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–33.
- Jansen, R., Embden, J. D. A. Van, Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, 1565–1575.
- Jao, L.-E., Wente, S. R., & Chen, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), 13904–9.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. a, & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–21.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(February), 823–826.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular*

- Microbiology*, 36, 244–6.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–82.
- Pereira, F. A., Qiu, Y., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (1995). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53(1-6), 503–8.
- Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes & Development*, 13(8), 1037–1049.
- Pereira, F. A., Tsai, M. J., & Tsai, S. Y. (2000). COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 57(10), 1388–98.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–9.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. a, & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–308.
- Tsai, S. Y., & Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocrine Reviews*, 18(2), 229–40.
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–8.
- Wu, S., Cheng, C.-M., Lanz, R. B., Wang, T., Respress, J. L., Ather, S., ... Tsai, S. Y. (2013). Atrial identity is determined by a COUP-TFII regulatory network. *Developmental Cell*, 25(4), 417–26.
- Xavier-Neto, J, C M Neville, M D Shapiro, L Houghton, G F Wang, W Nikovits, F E Stockdale, and N Rosenthal. 1999. “A Retinoic Acid-Inducible Transgenic Marker of Sino-Atrial Development in the Mouse Heart.” *Development (Cambridge, England)* 126(12): 2677–87.
- Xiao, A., Cheng, Z., Kong, L., Zhu, Z., Lin, S., Gao, G., & Zhang, B. (2014). CasOT : a genome-wide Cas9 / gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*, (3), 3–5.
- Yang, H., Wang, H., Shivalila, C. S., Cheng, A. W., Shi, L., & Jaenisch, R. (2013). One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR / Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, 154, 1–10.
- You, L.-R., Lin, F.-J., Lee, C. T., DeMayo, F. J., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (2005). Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*, 435(7038), 98–104.