



Evento	Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Análise de regiões alvo no genoma humano para inserção de sequências usando sistema CRISPR/Cas9
Autor	PAOLA BARCELOS CARNEIRO
Orientador	URSULA DA SILVEIRA MATTE

Análise de regiões alvo no genoma humano para inserção de sequências usando sistema CRISPR/Cas9

Paola Barcelos Carneiro¹, Ursula Matte¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CRISPR (do inglês: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) é um mecanismo imune de procariotos contra infecções virais aplicado à edição gênica em outros organismos. Seu funcionamento se baseia em uma endonuclease capaz de clivar em uma região específica mediada por uma sequência de RNA com 20 nucleotídeos complementar ao sítio-alvo. Esse sistema pode ser utilizado para inserção de sequências de DNA em regiões específicas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar duas regiões gênicas associadas aos *loci* THUMPD3-AS1 e AAVS1 como potenciais sítios-alvo para inserção gênica. Para isso utilizaram-se métodos de identificação de potenciais *off-targets* e de eficiência a partir de análises computacionais. Para a predição de *off-targets* as sequências foram submetidas à ferramenta CHOPCHOP utilizando como base o genoma humano. Além disso, três aspectos foram avaliados para escolha das sequências: o número de *mismatches*, o conteúdo GC e a eficiência da endonuclease. Foram obtidas cinco sequências-alvo sem *mismatch* para THUMPD3-AS1 e duas para AAVS1. O conteúdo GC ficou entre 50 e 70%, visto que esta é a porcentagem ideal para eficiência do sistema no que se refere à estabilidade da molécula híbrida de DNA e RNA e à concentração de domínios CG. Além desses critérios, também foi levada em consideração a eficiência de corte associado à região PAM adjacente a sequência do sítio-alvo. Para confirmar a predição realizada pela ferramenta CHOPCHOP, as sequências foram submetidas a um alinhamento local com a utilização da ferramenta BLASTn. A avaliação foi estipulada levando em consideração as regiões *seed* (localizadas a 10-12 nucleotídeos a montante do códon PAM) e PAM, que são determinantes na complementaridade do RNA e atividade da Cas9, respectivamente. A averiguação confirmou que, a partir do banco de dados de sequências nucleotídicas do NCBI, não há potenciais *off-targets* das sequências estabelecidas em outro local no genoma humano. Por conseguinte, três sequências de 23 pares de bases foram escolhidas com base nos critérios mencionados. A seguir, essas sequências serão submetidas a ensaios experimentais por intermédio de cultivo celular para a confirmação *in vitro* da predição de *off-targets*.