



Entendendo funções dos genes com CRISPR

Maklouf, Giovanna R. ¹

¹ Instituto Nacional do Câncer (INCA), Brasil

Correo para correspondencia: giomaklouf@gmail.com

Resumen

Avanços nos diferentes tipos de sequenciamentos fizeram com que entendêssemos melhor sobre a genômica dos seres através de projetos como a elucidação do genoma humano, um trabalho de mais de 20 anos. Mas mapear o genoma é suficiente? Qual é o impacto de certos genes no resultado final apresentado pelos sistemas biológicos? Como definir quais partes do nosso genoma de fato resultam na aparição de doenças? Considerando isso, ao utilizar a robustez da manipulação genética com CRISPR-Cas, os cientistas provaram que esta técnica é útil para a investigação da genômica funcional. Desse modo, esse artigo descreve a utilização de CRISPR screening para o estudo paralelo de milhares de genes envolvidos em processos biológicos de interesse e como isto pode auxiliar a elucidar mecanismos importantes.

Palabras clave: CRISPR, screening, genômica funcional, sequenciamento.

Abstract

Breakthroughs in the many types of sequencing have enabled a greater understanding of the genomics of living things, through projects such as the elucidation of the human genome, which has been more than 20 years of work. However, is mapping the genome sufficient? What is the contribution of certain genes to the final result presented by biological systems? How can we define which parts of our genome do lead to the outbreak of a disease? Considering this, by using the robustness of genetic manipulation with CRISPR-Cas, scientists have proven that this technique is useful for functional genomics research. Hence, this article outlines the use of CRISPR screening for the parallel study of thousands of genes involved in biological processes of interest and how this can help elucidate important mechanisms.

Keywords: CRISPR, screening, functional genomics, sequencing.

Artículo

Há 21 anos tínhamos a notícia que um consórcio de cientistas ao redor do mundo mapeou 92% do genoma humano e em 2022 observamos a publicação dos 8% remanescentes. Estes fatos marcaram então o Projeto Genoma Humano como um acontecimento mundial histórico que impactou a ciência como conhecemos. Mas, já que temos todas essas informações do genoma, qual o motivo de ainda hoje não termos respostas definitivas para doenças como o Alzheimer, diabetes, câncer e até mesmo sobre o envelhecimento?

É verdade que muitas complicações estão presentes na resposta para esta pergunta, entretanto um dos pontos importantes é que apesar do genoma humano ser o código-fonte presente nas nossas células, é fácil perceber o quão dinâmico este código é, sendo possível gerar

os mais diversos diferentes tipos celulares, comportamentos complexos como a homeostase, o sistema imune e até mesmo a nossa consciência.

Sendo assim, é possível dizer que ainda não entendemos por completo a relação entre sequências genéticas (genótipo) e os comportamentos finais apresentados pelos sistemas biológicos (fenótipos), campo da ciência chamado genômica funcional.

Entendendo a vida com a engenharia reversa

Quando não é possível saber integralmente o comportamento de um sistema, seja ele elétrico, mecânico ou biológico, uma das possibilidades de elucidar suas lógicas internas é usando a estratégia de remover ou desligar seus elementos individuais, e assim a observar quais as mudanças causadas - abordagem esta chamada de engenharia reversa. E se fosse possível fazer exatamente isso para entender funcionalidade na genética ao desligar genes em células e poder entender o que essas mudanças causam ao nível de desfecho (fenótipo)? O termo associado a este evento chama-se perturbação, ou seja, quando há alteração da função biológica seja de estímulos externos ou internos [1].

A modificação genética com CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) associado as enzimas Cas é uma técnica incrivelmente robusta, foco do Prêmio Nobel de Química no ano de 2020, que permite que inserções (knock-in) e deleções (knock-out) sejam conduzidas de maneira precisa e confiável.

Apesar da ampla divulgação das técnicas que utilizam CRISPR, uma finalidade um pouco menos conhecida aborda justamente a análise de fenótipos de sistemas biológicos a partir de modificações genéticas (perturbações) proporcionadas pela ferramenta, chamada de CRISPR screening. Ao longo dos anos, diversas metodologias foram criadas para a investigação de perguntas biológicas que fossem respondidas com CRISPR screening. Recentemente, com rápido desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (do inglês, next-generation sequencing – NGS), esta técnica ganhou ainda mais destaque.

Ao unir CRISPR com a potência do NGS atingimos resoluções sem precedentes

Possivelmente, a categoria de NGS que mais beneficia os screenings com CRISPR é o sequenciamento de RNA de células únicas (do inglês, single-cell RNA-Seq - scRNA-Seq) [2], o qual performa o nível de expressão de milhares de genes individualmente em cada célula de uma determinada população. scRNA-Seq como se conhece atualmente foi primeiramente publicado em 2009, mas teve sua popularização somente a partir de 2014 com as primeiras plataformas comerciais estando disponíveis, passo que reduziu o desafio na realização do experimento [3-5].

Logo os cientistas decidiram estudar o impacto da perturbação utilizando essa nova abordagem, multiplicando o poder de acurácia proporcionalmente à resolução ampliada de scRNA-Seq, e uniram ambas técnicas no que se chama Single-Cell CRISPR Screening.

Em suma, a forma mais comum de fazer esse experimento é realizando o knock-out de vários genes que podem estar envolvidos com o fenótipo que se quer analisar, mas desligando especificamente um gene por vez em cada célula. O sequenciamento individual das células sobreviventes pós-perturbação com CRISPR vem em seguida e as conclusões preliminares já podem começar deste ponto: as células que não sobreviveram foram “premiadas” com o knock-out de genes essenciais relacionados à sobrevivência da célula em si e a processos biológicos importantes [6].

As aplicações dessa abordagem são inúmeras e alguns exemplos são:

- a) investigar se a perda de certos genes podem estar envolvidos com a sensibilidade ou resistência a drogas [7];
- b) investigar quais as mudanças funcionais presentes em estados celulares importantes na progressão e desenvolvimento de doenças como o câncer [8,9];
- c) investigar profundamente genes relacionados a epigenética [10,11];
- d) caracterizar genes essenciais para a sobrevivência de células específicas, como por exemplo para neurônios [12];

É importante notar que existem diversas limitações intrínsecas tanto relacionadas a manipulação genética com CRISPR quanto a scRNA-Seq. Na parte técnica, do lado de CRISPR, pode-se citar o design cuidadoso do experimento para não haver falta de especificidade em relação a deleção ou inserção. Do lado de scRNA-Seq, o persistente desafio em ter leituras de qualidade para todas as células. Em ambos, tem-se a barreira financeira, que apesar da evolução e barateamento dos preços ao longo dos anos, ainda se faz presente em muitos laboratórios, principalmente no cenário científico da América Latina.

Apesar disso, e com a esperança de que estas técnicas sejam cada vez mais barateadas, é importante fomentar a prática de screening com CRISPR seguidos de scRNA-Seq, visto que a combinação dessas ferramentas nos proporciona um estudo confiável de vários processos celulares que podem, no futuro, clarificar mecanismos ainda não entendidos.

Referencias

- [1] Wang, R.-S. Perturbation. In *Encyclopedia of Systems Biology*; Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., Yokota, H., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013; pp 1680–1681.
- [2] Bock, C.; Datlinger, P.; Chardon, F.; Coelho, M. A.; Dong, M. B.; Lawson, K. A.; Lu, T.; Maroc, L.; Norman, T. M.; Song, B.; Stanley, G.; Chen, S.; Garnett, M.; Li, W.; Moffat, J.; Qi, L. S.; Shapiro, R. S.; Shendure, J.; Weissman, J. S.; Zhuang, X. High-Content CRISPR Screening. *Nature Reviews Methods Primers* 2022, 2 (1), 1–23.
- [3] Aldridge, S.; Teichmann, S. A. Single Cell Transcriptomics Comes of Age. *Nat. Commun.* 2020, 11 (1), 4307.
- [4] Hwang, B.; Lee, J. H.; Bang, D. Single-Cell RNA Sequencing Technologies and Bioinformatics Pipelines. *Exp. Mol. Med.* 2018, 50 (8), 1–14.
- [5] Wu, X.; Yang, B.; Udo-Inyang, I.; Ji, S.; Ozog, D.; Zhou, L.; Mi, Q.-S. Research Techniques Made Simple: Single-Cell RNA Sequencing and Its Applications in Dermatology. *J. Invest. Dermatol.* 2018, 138 (5), 1004–1009.
- [6] Poirier, J. T. Chapter Four - CRISPR Libraries and Screening. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Torres-Ruiz, R., Rodriguez-Perales, S., Eds.; Academic Press, 2017; Vol. 152, pp 69–82.
- [7] Shalem, O.; Sanjana, N. E.; Hartenian, E.; Shi, X.; Scott, D. A.; Mikkelsen, T.; Heckl, D.; Ebert, B. L.; Root, D. E.; Doench, J. G.; Zhang, F. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* 2014, 343 (6166), 84–87.
- [8] McFaline-Figueroa, J. L.; Hill, A. J.; Qiu, X.; Jackson, D.; Shendure, J.; Trapnell, C. A Pooled Single-Cell Genetic Screen Identifies Regulatory Checkpoints in the Continuum of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Nat. Genet.* 2019, 51 (9), 1389–1398.
- [9] Zhang, Y.; Donaher, J. L.; Das, S.; Li, X.; Reinhardt, F.; Krall, J. A.; Lambert, A. W.; Thiru, P.; Keys, H. R.; Khan, M.; Hofree, M.; Wilson, M. M.; Yedier-Bayram, O.; Lack, N. A.; Onder, T. T.; Bagci-Onder, T.; Tyler, M.; Tirosh, I.; Regev, A.; Lees, J. A.; Weinberg, R. A. Genome-Wide CRISPR Screen Identifies PRC2

and KMT2D-COMPASS as Regulators of Distinct EMT Trajectories That Contribute Differentially to Metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00877-0>.

[10] Yang, L.; Chan, A. K. N.; Miyashita, K.; Delaney, C. D.; Wang, X.; Li, H.; Pokharel, S. P.; Li, S.; Li, M.; Xu, X.; Lu, W.; Liu, Q.; Mattson, N.; Chen, K. Y.; Wang, J.; Yuan, Y.-C.; Horne, D.; Rosen, S. T.; Soto-Feliciano, Y.; Feng, Z.; Hoshii, T.; Xiao, G.; Müschen, M.; Chen, J.; Armstrong, S. A.; Chen, C.-W. High-Resolution Characterization of Gene Function Using Single-Cell CRISPR Tiling Screen. *Nat. Commun.* 2021, 12 (1), 4063.

[11] Alda-Catalinas, C.; Bredikhin, D.; Hernando-Herraez, I.; Santos, F.; Kubinyecz, O.; Eckersley-Maslin, M. A.; Stegle, O.; Reik, W. A Single-Cell Transcriptomics CRISPR-Activation Screen Identifies Epigenetic Regulators of the Zygotic Genome Activation Program. *Cell Syst* 2020, 11 (1), 25–41.e9.

[12] Tian, R.; Gachechiladze, M. A.; Ludwig, C. H.; Laurie, M. T.; Hong, J. Y.; Nathaniel, D.; Prabhu, A. V.; Fernandopulle, M. S.; Patel, R.; Abshari, M.; Ward, M. E.; Kampmann, M. CRISPR Interference-Based Platform for Multimodal Genetic Screens in Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron* 2019, 104 (2), 239–255.e12.