

Desenho de RNAs guias para edição e indução da expressão de genes *myb* em morango (*Fragaria x ananassa*)

MÉLANY ANDRADE THIELO¹; SELENE HENSE LILGE²; PEDRO REISSER³;
CHRISTIAN SANCHEZ⁴; VANESSA GALLI⁵

¹Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – melanythielo@gmail.com

²Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – selenelilge04@gmail.com

³Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – reisser.pedro@gmail.com

⁴Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – christian.kun@gmail.com

⁵Departamento de Biotecnologia - CDTec, UFPEL, Pelotas/RS – vane.galli@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A mudança de cor é uma das principais características utilizadas como parâmetro para avaliar a qualidade e a maturação do fruto. Existem três principais classes de pigmentos que promovem a coloração de plantas: flavonóides/antocianinas, betalainas e carotenóides (TANAKA et al., 2008).

Os flavonóides são um grupo de metabólitos secundários pertencentes à classe dos fenilpropanóides e possuem a mais ampla gama de cores. As antocianinas, uma classe de flavonóides, são responsáveis pelas cores de laranja a azul encontradas em muitas flores, folhas, frutos, sementes e outros tecidos (TANAKA et al., 2008; DIAS et al., 2021). O morango (*Fragaria* spp) possui a sua cor vermelha característica em decorrência do acúmulo de uma antocianina baseada em pelargonidina, a calistefina (ALMEIDA et al., 2007; URRUTIA et al., 2016).

Na biossíntese de antocianinas, além das enzimas que catalisam esse processo, vários fatores de transcrição (TFs) demonstraram desempenhar papéis importantes, regulando a expressão de genes biossintéticos por meio de múltiplos mecanismos, como a interrupção de sequências promotoras, introdução de novas sequências promotoras alternativas e silenciamento epigenético (HIRSCH et al., 2017; REBOLLO et al., 2012; VICIENT et al., 2017). A regulação da biossíntese de antocianinas a nível transcricional é controlada por um complexo ternário de ativação transcricional MYB–bHLH–WD40 (MBW), que contém proteínas MYB R2R3 de ligação ao DNA, proteínas básicas hélice-alça-hélice (bHLH) e proteína de repetição WD40 (LIN-WANG et al., 2010).

O recrutamento do TF MYB10 na região promotora leva à expressão de genes biossintéticos e ao acúmulo de antocianina em espécies como laranja (*Citrus x sinensis*), maçã (*Malus x domestica*) e pimenta (*Capsicum annuum*) (BUTELLI et al., 2012; ZHANG et al., 2019; JUNG et al., 2019). Em morango (*Fragaria x ananassa*), o homólogo de MYB10, *FaMYB10*, foi previamente identificado e demonstrou ser o principal ativador de genes estruturais na via das antocianinas durante o desenvolvimento do fruto, e sua expressão foi reprimida por auxina e estimulada por ácido abscísico (MEDINA-PUCHE et al., 2014; SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2022). Além do papel de ativação transcricional, vários repressores da via de fenilpropanóides também são TFs MYB, incluindo um repressor MYB R2R3 de morango, o *FaMYB1* (AHARONI et al., 2001; KADOMURA-ISHIKAWA et al., 2015).

Sendo assim, a alteração na expressão ou função de um único gene MYB, como *FaMYB10* e *FaMYB1*, pode alterar drasticamente a biossíntese de antocianinas, tornando-os potenciais alvos para transformação genética de morangos, visando aumentar o conteúdo destes compostos.

A tecnologia da proteína Cas9 associada à repetição palindrômica curta regularmente interespaçada em cluster (CRISPR/Cas9) tem sido amplamente utilizada na edição gênica. As proteínas Cas9 são nucleases guiadas por RNA; sua

forma nativa contém dois domínios de nuclease, HNH e domínio RuvC, que podem clivar o DNA alvo quando direcionados por um único RNA guia (gRNA) na presença de um motivo protoespaçador-adjacente (PAM). A introdução de mutações nos domínios HNH e RuvC foi capaz de remover a atividade endonuclease da Cas9, mantendo a atividade de ligação resultando em uma Cas9 cataliticamente deficiente (dCas9). A dCas9 oferece uma plataforma para regular a expressão transcricional com a adição de domínios ativador ou repressor, sendo utilizada juntamente com o seu gRNA complementar ao gene alvo (CASAS-MOLLANO et al., 2020; KNOTT; DOUDNA, 2018).

Tendo isto em vista, para aumentar o acúmulo de antocianinas em morangos através das técnicas de CRISPR/Cas9 e CRISPR/dCas9, faz-se necessário projetar gRNAs os quais são complementares à sequência que se pretende editar ou regular. O objetivo do presente trabalho foi selecionar, através de softwares de bioinformática, RNAs guia (gRNAs) complementares para os alvos *FaMYB10* e *FaMYB1* para posterior edição gênica por CRISPR/dCas9 e CRISPR/Cas9, respectivamente, em morango (*Fragaria x ananassa*).

2. METODOLOGIA

A sequência de nucleotídeos do promotor do gene que codifica para *FaMYB10*, assim como a sequência de nucleotídeos da região codificadora do gene que codifica para *FaMYB1*, foram encontradas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A sequência completa da região codificadora do gene *FaMYB1* e os últimos 1.700 pares de bases do promotor do gene *FaMYB10* foram submetidos a ferramenta Chopchop (versão 3), utilizando a configuração padrão (LABUN et al., 2019). O mesmo foi feito com a ferramenta CRISPOR (versão 5.2), a fim de comparar o resultado de ambas e selecionar a melhor opção (CONCORDET; HAEUSSLER, 2018).

Após a seleção da sequência alvo mais eficiente para o desenho de gRNAs a partir da comparação entre as ferramentas citadas, foi realizada a adição dos nucleotídeos para ligação nos vetores de clonagem. Estas sequências foram submetidas ao software de bioinformática vector NTI advanced 11.0 (<https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) para verificar características termodinâmicas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gRNA é um componente importante no sistema CRISPR. Como funciona como um guia para a Cas9, o design do sgRNA é crucial para reduzir ligações fora do alvo. Por exemplo, gRNAs com alto conteúdo de GC (40–60%) demonstraram melhorar as atividades no alvo no trigo, de acordo com WANG et al. (2014), ou se a alta porcentagem de GC for mais próxima do sítio PAM, a eficiência seria maior. O comprimento do gRNA é outro aspecto importante para a ocorrência de mutações indesejadas, sendo ideal que se localize na região de 20 nt a montante do sítio PAM (KARLSON et al., 2021; REN et al., 2014).

A partir das ferramentas de bioinformática utilizadas e dos critérios para obtenção de gRNAs eficientes para CRISPR/Cas9 e CRISPR/dCas9, foi selecionada a sequência 5' GGAGCACGGCACCCTTTAAAAG 3', na posição 288 do promotor, como alvo para *FaMYB10* e 5' GTACGTGAAAATCATCAGA 3', na posição 640 da região codificadora, para *FaMYB1*, de acordo com as imagens 1 e 2, respectivamente.

Os efeitos fora do alvo do CRISPR/Cas9 podem ser previstos por ferramentas *in silico*, onde buscam esses potenciais sítios em todo o genoma e calculam a probabilidade de uma edição fora do alvo (Bao et al., 2021). Para a sequência alvo de *FaMYB10*, a ferramenta ChopChop calculou dois possíveis efeitos fora do alvo, enquanto CRISPOR não encontrou nenhum. Para *FaMYB1*, a ferramenta ChopChop calculou onze possíveis efeitos fora do alvo, enquanto CRISPOR calculou vinte e dois.

Classificação: 3

Sequência de alvos: AGCACGGCACCGTTTAAAAGCGG

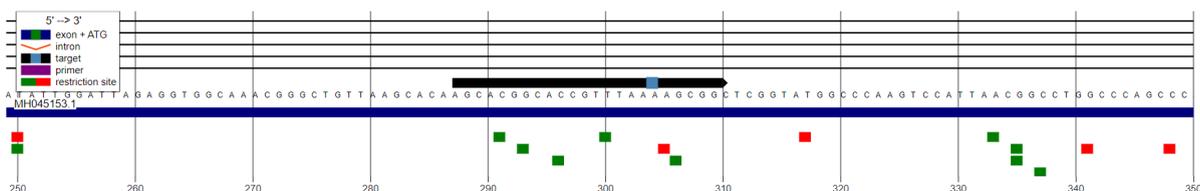


Imagem 1. Sequência alvo para o gene *FaMYB10*, na posição 288 do promotor, gerada pelo software ChopChop.

Classificação: 5

Sequência de alvos: GTACGTCGAAAATCATCAGACGG

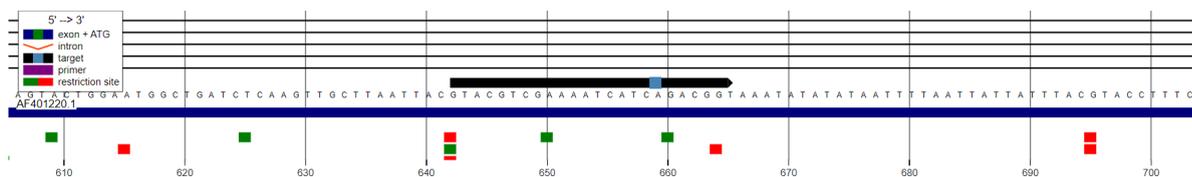


Imagem 2. Sequência alvo para o gene *FaMYB1*, na posição 640 da região codificadora, gerada pelo software ChopChop.

A sequência do gRNA para *FaMYB10* será posteriormente clonada no plasmídeo pHSN6A01, o qual apresenta o gene para expressão de dCas9 fusionada a um ativador transcricional do tipo VP64 (XING et al., 2014). Enquanto que o gRNA para *FaMYB1* será clonado no plasmídeo pHAAtC, que apresenta gene para expressão de Cas9 (KIM et al., 2016). A clonagem será realizada pelo método Golden Gate, onde a montagem é mediada por enzimas de restrição do tipo IIS (deslocadas). Portanto, foi necessário adicionar ao gRNA nucleotídeos para o reconhecimento e corte pelas enzimas, sendo a enzima *BsaI* utilizada para o vetor pHSN6A01 e a *AarI* para o vetor pHAAtC, assim como a adição de uma guanina no início de cada sequência para o reconhecimento pelo promotor dos vetores no momento da clonagem, visto que são do tipo U6, pequenos RNAs nucleares (ENGLER; KANDZIA; MARILLONNET, 2008).

Ao final, a sequência obtida para *FaMYB1* no sentido senso foi AAACGTACGTCGAAAATCATCAGA, e no sentido antisenso GATTTCTGATGATTTTCGACGTAC. A sequência senso, de acordo com o software Vector, apresentou temperatura de melting (T_m) 54,6°C, conteúdo GC de 37,5% e a sequência no sentido anti senso apresentou temperatura de melting (T_m) 47,7°C e conteúdo GC 47,2%.

A sequência obtida para *FaMYB10* no sentido senso foi ATGGGAGCACGGCACCGTTTAAAAG, com temperatura de melting (T_m) 64°C e conteúdo GC 50%. No sentido antisenso a sequência obtida foi AAACCCTTTTAAACGGTGCCGTGCT, com temperatura de melting (T_m) 66°C e conteúdo GC 48%.

4. CONCLUSÕES

Foram selecionadas sequências alvo para construção de gRNAs complementares para futura clonagem e edição do gene *FaMYB1* e futura clonagem e superexpressão do gene *FaMYB10* em morango (*Fragaria x ananassa*), utilizando as ferramentas ChopChop e CRISPOR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHARONI, A. et al. The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 28, n. 3, p. 319–332, nov. 2001.
- BUTELLI, E. et al. Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. **The Plant Cell**, v. 24, n. 3, p. 1242–1255, mar. 2012.
- CASAS-MOLLANO, J. A. et al. CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes. **The CRISPR Journal**, v. 3, n. 5, p. 350–364, 1 out. 2020.
- CONCORDET, J.-P.; HAEUSSLER, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W242–W245, 2 jul. 2018.
- ENGLER, C.; KANDZIA, R.; MARILLONNET, S. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, p. e3647, 5 nov. 2008.
- JUNG, S. et al. A non-LTR retrotransposon activates anthocyanin biosynthesis by regulating a MYB transcription factor in *Capsicum annuum*. **Plant Science**, v. 287, p. 110181, out. 2019.
- KADOMURA-ISHIKAWA, Y. et al. RNAi-mediated silencing and overexpression of the *FaMYB1* gene and its effect on anthocyanin accumulation in strawberry fruit. **Biologia plantarum**, v. 59, n. 4, p. 677–685, 1 dez. 2015.
- KARLSON, C. K. S. et al. CRISPR/dCas9-Based Systems: Mechanisms and Applications in Plant Sciences. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2055, 29 set. 2021.
- KIM, H. et al. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 8, p. 705–712, ago. 2016.
- KNOTT, G. J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 866–869, 31 ago. 2018.
- LABUN, K. et al. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W171–W174, 2 jul. 2019.
- LIN-WANG, K. et al. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 50, dez. 2010.
- MEDINA-PUCHE, L. et al. *MYB10* plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria × ananassa* fruits. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 2, p. 401–417, fev. 2014.
- REN, X. et al. Enhanced Specificity and Efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in *Drosophila*. **Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 1151–1162, nov. 2014.
- SÁNCHEZ-GÓMEZ, C.; POSÉ, D.; MARTÍN-PIZARRO, C. Insights into transcription factors controlling strawberry fruit development and ripening. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1022369, 10 out. 2022.
- TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 733–749, maio 2008.
- WANG, Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 9, p. 947–951, set. 2014.
- XING, H.-L. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 327, dez. 2014.
- ZHANG, L. et al. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2 abr. 2019.