# ***Curso Pós-Graduação***

# ***Sistema de Expressão Gênica em Células Animais***

# ***Menck- abril a junho de 2021. ONLINE***

***Assuntos abordados*:** vetores genéticos, sistemas de transfecção e seleção genética em células animais. Inativação genética por recombinação homóloga: disrupção gênica ou nocaute. Vírus como vetores genéticos: modelos de adenovírus, retrovírus e adeno-associados. Modelos de Terapia Gênica. Clonagem e reprogramação em células de mamíferos. Perspectivas do emprego de células tronco. Metabolismo de RNA de interferência, miRNA, seu uso para estudos de funções gênicas (knock-down, siRNA e shRNA) e aplicações clínicas. CRISPR-Cas9 no processo de edição gênica. Entrega de RNA mensageiro, como vacina e em outras opções.

***Metodologia*:** o curso deverá se basear em discussão de textose seminários dos alunos (artigos científicos). Cada grupo (2 alunos) deverá preparar e discutir os textos para **apresentação de metade de todos os artigos.** Haverá um sorteio momentos antes da apresentação de cada seminário (no máximo 30 minutos). Em revisões ou comentários os grupos serão definidos na aula anterior. Além dos seminários sugeridos, outros seminários poderão ser sugeridos pelos grupos, que poderão ficar responsáveis pela apresentação.

*Avaliação:* A avaliação levará em conta a participação do aluno na discussão, médias de provas de leitura, apresentação dos seminários e uma avaliação formal no final do curso.

***Cronograma:***

**20/04-**

**Introdução ao Curso- Menck**

“Sistemas de introdução de DNA e expressão gênica em células animais- construindo animais a partir de células”.

**24/04- Introdução- Menck**

“Processos de Terapia Gênica e CRISPR-CAS”

**27/04**

**Seminário 1-** Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. *High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome.* Cell. 1986 Feb 14; 44(3): 419-28.

**Seminário 2**- Thomas, KR e Capecchi, MR. *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived Stem cells.* Cell 51: 503-512, 1987.

**30/04**

**Seminário 3:** Marchetto MC, Muotri AR, Burns DK, Friedberg EC, Menck CF.

*Gene transduction in skin cells: preventing cancer in xeroderma pigmentosum mice*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17759-64.

**Seminário 4:** Wang M, Li R, Li Y, Yu C, Chi X, Wu S, Liu S, Xu J, Chen W. Construction and Immunological Evaluation of an Adenoviral Vector-Based Vaccine Candidate for Lassa Fever. Viruses. 2021 Mar 15;13(3):484.

**Seminário 5 (Revisão):** Xia Y, Li X, Sun W. Applications of Recombinant Adenovirus-p53 Gene Therapy for Cancers in the Clinic in China. Curr Gene Ther. 2020;20(2):127-141.

**04/05**

**Seminário 6:** Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. Nat Med. 2004 10: 828-834.

**Seminário 7:** Hordeaux J, Hinderer C, Buza EL, Louboutin JP, Jahan T, Bell P, Chichester JA, Tarantal AF, Wilson JM. Safe and Sustained Expression of Human Iduronidase After Intrathecal Administration of Adeno-Associated Virus Serotype 9 in Infant Rhesus Monkeys. Hum Gene Ther. 2019 Aug;30(8):957-966.

**Seminário 8 (revisão):** Keeler AM, Flotte TR. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? Annu Rev Virol. 2019 Sep 29;6(1):601-621. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015530. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31283441; PMCID: PMC7123914.

**07/05**

**Seminário 9-** Hacein-Bey-Abina et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science. 2003 Oct 17; 302(5644):415-419.

**Seminário 10-** Khan A, Barber DL, Huang J, Rupar CA, Rip JW, Auray-Blais C, Boutin M, O'Hoski P, Gargulak K, McKillop WM, Fraser G, Wasim S, LeMoine K, Jelinski S, Chaudhry A, Prokopishyn N, Morel CF, Couban S, Duggan PR, Fowler DH, Keating A, West ML, Foley R, Medin JA. Lentivirus-mediated gene therapy for Fabry disease. Nat Commun. 2021 Feb 25;12(1):1178.

**11/05**

**Seminario 11-** Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.” Nature 1997; 385: 810-813.

**Seminario 12:** Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature. 1998 Jul 23; 394(6691): 369-374.

**Seminário 13 (Comentário):** Solter D. Dolly is a clone--and no longer alone. Nature. 1998 Jul 23;394(6691):315-6.

**14/05**

**Seminário 14:** Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663–676.

**Seminário 15:** Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using humaninduced pluripotent stem cells. Cell. 2010 143(4):527-39.

**Seminário 16 (Revisão):** Guo X, Tang L, Tang X. Current Developments in Cell Replacement Therapy for Parkinson's Disease. Neuroscience. 2021 Mar 26:S0306-4522(21)00155-X. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.03.022.

**18/05**

**Seminário 17:** Marchetto MC, Hrvoj-Mihic B, Kerman BE, Yu DX, Vadodaria KC, Linker SB, Narvaiza I, Santos R, Denli AM, Mendes AP, Oefner R, Cook J, McHenry L, Grasmick JM, Heard K, Fredlender C, Randolph-Moore L, Kshirsagar R, Xenitopoulos R, Chou G, Hah N, Muotri AR, Padmanabhan K, Semendeferi K, Gage FH. Species-specific maturation profiles of human, chimpanzee and bonobo neural cells. Elife. 2019 Feb 7;8:e37527.

**Seminário 19:** Kosanke M, Osetek K, Haase A, Wiehlmann L, Davenport C, Schwarzer A, Adams F, Kleppa MJ, Schambach A, Merkert S, Wunderlich S, Menke S, Dorda M, Martin U. Reprogramming enriches for somatic cell clones with small scale mutations in cancer-associated genes. Mol Ther. 2021 Apr 5:S1525-0016(21)00194-5.

**21/05**

**Seminário 20:** Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19; 391(6669):806-11.

**Seminário 21 (Comentário):** Wagner RW, Sun L. Double-stranded RNA poses puzzle. Nature. 1998 Feb 19; 391(6669): 744-5.

**Seminário 22:** Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 May 24; 411(6836): 494-8.

**25/05-**

**Seminário 23:** Mirzaei S, Gholami MH, Hashemi F, Zabolian A, Hushmandi K, Rahmanian V, Entezari M, Girish YR, Sharath Kumar KS, Aref AR, Makvandi P, Ashrafizadeh M, Zarrabi A, Khan H. Employing siRNA tool and its delivery platforms in suppressing cisplatin resistance: Approaching to a new era of cancer chemotherapy. Life Sci. 2021 Mar 28;277:119430.

**Seminário 24:** Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, Tournev I, Schmidt HH, Coelho T, Berk JL, Lin KP, Vita G, Attarian S, Planté-Bordeneuve V, Mezei MM, Campistol JM, Buades J, Brannagan TH 3rd, Kim BJ, Oh J, Parman Y, Sekijima Y, Hawkins PN, Solomon SD, Polydefkis M, Dyck PJ, Gandhi PJ, Goyal S, Chen J, Strahs AL, Nochur SV, Sweetser MT, Garg PP, Vaishnaw AK, Gollob JA, Suhr OB. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. N Engl J Med. 2018 Jul 5;379(1):11-21.

**28/05-**

**Seminário 25:** Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol. 2005 Feb;60(2):174-82.

**Seminário 26:** Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21.

**31/05**

**Seminário 27:** Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-23.

**Seminário 28:** Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, Zhou J, Guo X, Bi Y, Si C, Hu B, Dong G, Wang H, Zhou Z, Li T, Tan T, Pu X, Wang F, Ji S, Zhou Q, Huang X, Ji W, Sha J. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. Cell. 2014 Feb 13;156(4):836-43.

**Seminário 29 (comentário):** Lander ES. The Heroes of CRISPR. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):18-28.

**08/06**

**Seminário 30:** Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40.

**Seminário 31:** Boros G, Miko E, Muramatsu H, Weissman D, Emri E, Rózsa D, Nagy G, Juhász A, Juhász I, van der Horst G, Horkay I, Remenyik É, Karikó K, Emri G. Transfection of pseudouridine-modified mRNA encoding CPD-photolyase leads to repair of DNA damage in human keratinocytes: a new approach with future therapeutic potential. J Photochem Photobiol B. 2013 Dec 5;129:93-9.

**11/06**

**Seminário 32:** Vogel AB, Lambert L, Kinnear E, Busse D, Erbar S, Reuter KC, Wicke L, Perkovic M, Beissert T, Haas H, Reece ST, Sahin U, Tregoning JS. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. Mol Ther. 2018 Feb 7;26(2):446-455.

**Seminário 33:** Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shresta S, Pierson TC, Ciaramella G, Diamond MS. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. Cell. 2017 Mar 23;169(1):176.

**Seminário 34 (revisão):** Meng Z, O'Keeffe-Ahern J, Lyu J, Pierucci L, Zhou D, Wang W. A new developing class of gene delivery: messenger RNA-based therapeutics. Biomater Sci. 2017 Nov 21;5(12):2381-2392.

**18/06**

**AVALIAÇÃO**