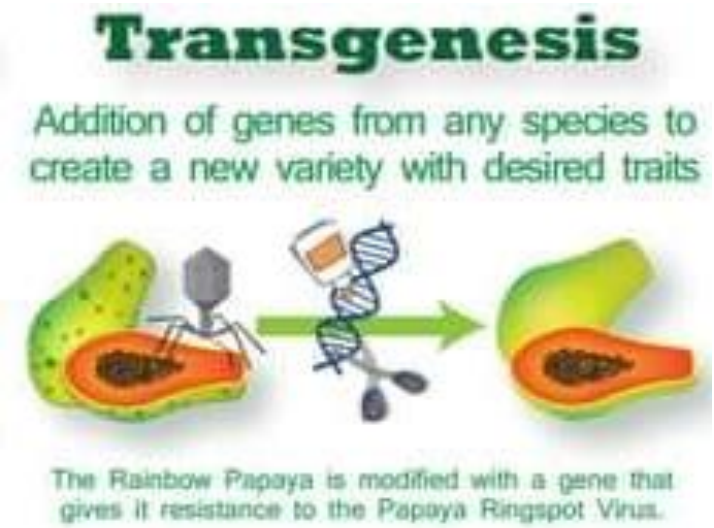
Edição Gênica

Bruno Silvestre Lira

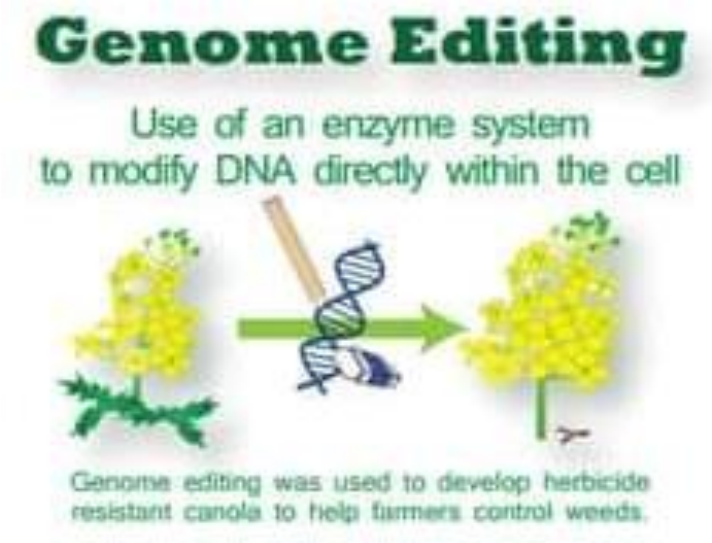
Abril/2023

Laboratório de Genética Molecular de Plantas

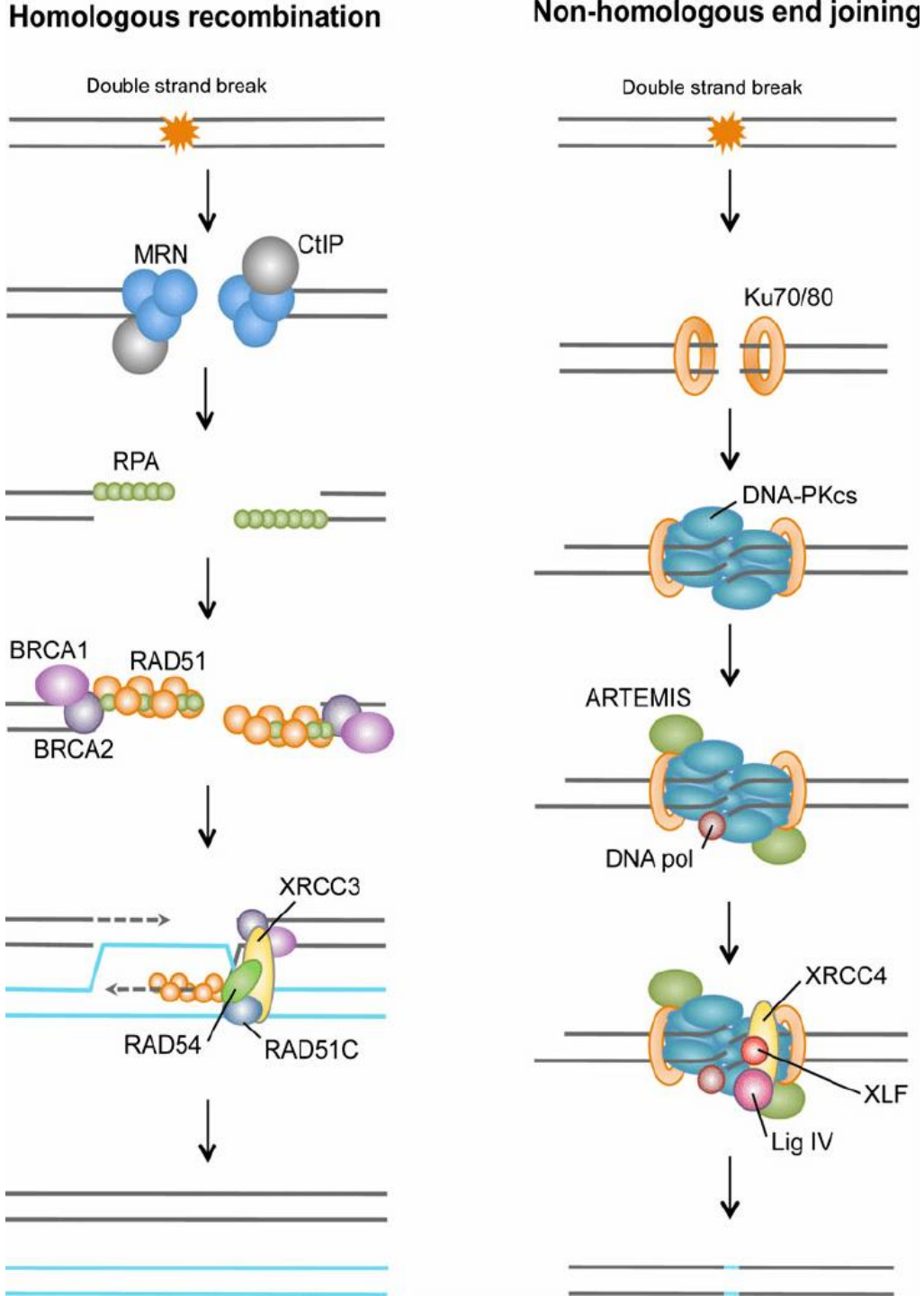
Modificação de plantas



Modificação de plantas



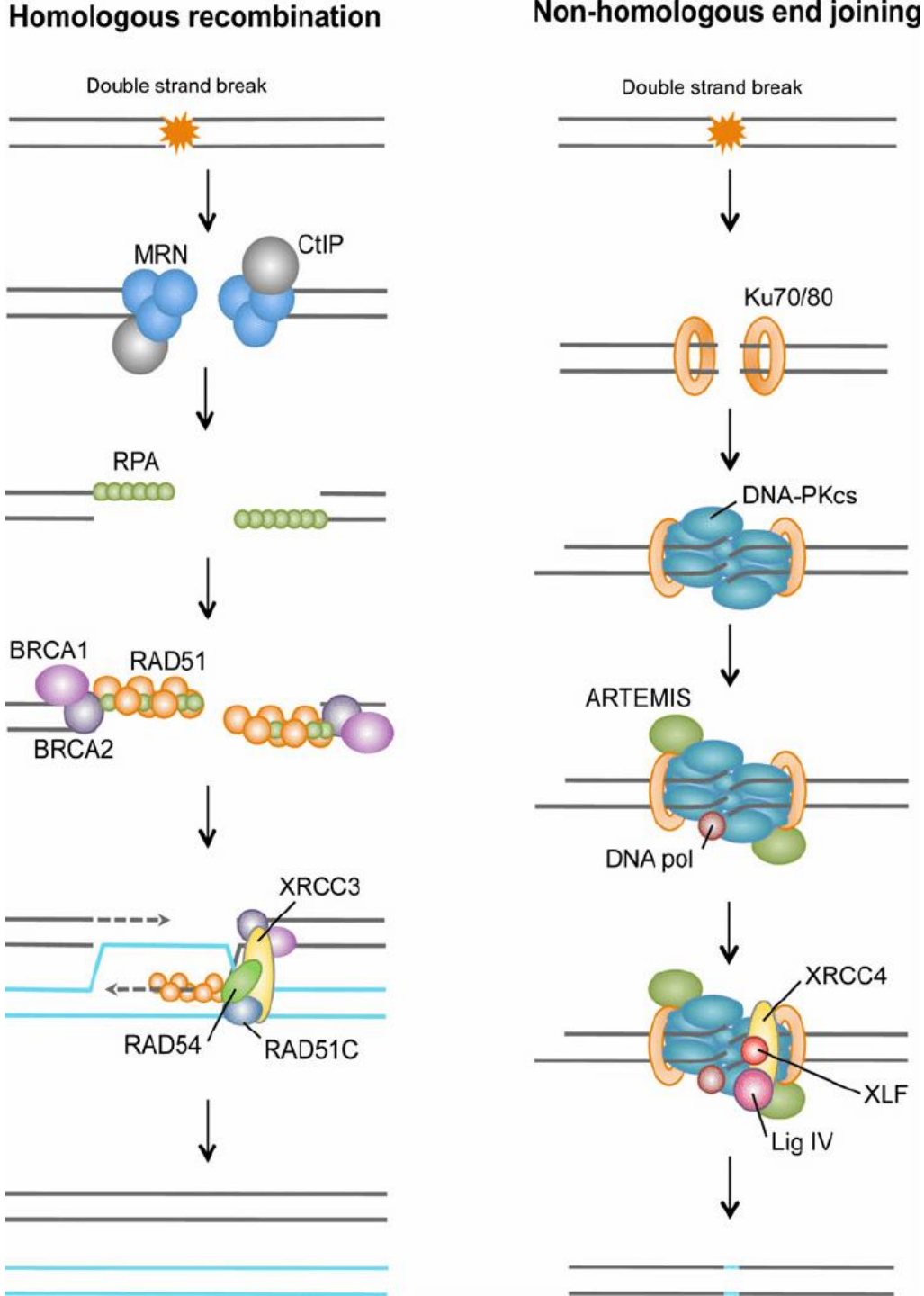
Edição gênica
Reparo



Brochier, C., & Langley, B. (2013). *Neurotherapeutics*, *10*, 817-830.

Edição gênica
Reparo

Reparo por:
- Homologia
- Junção das pontas

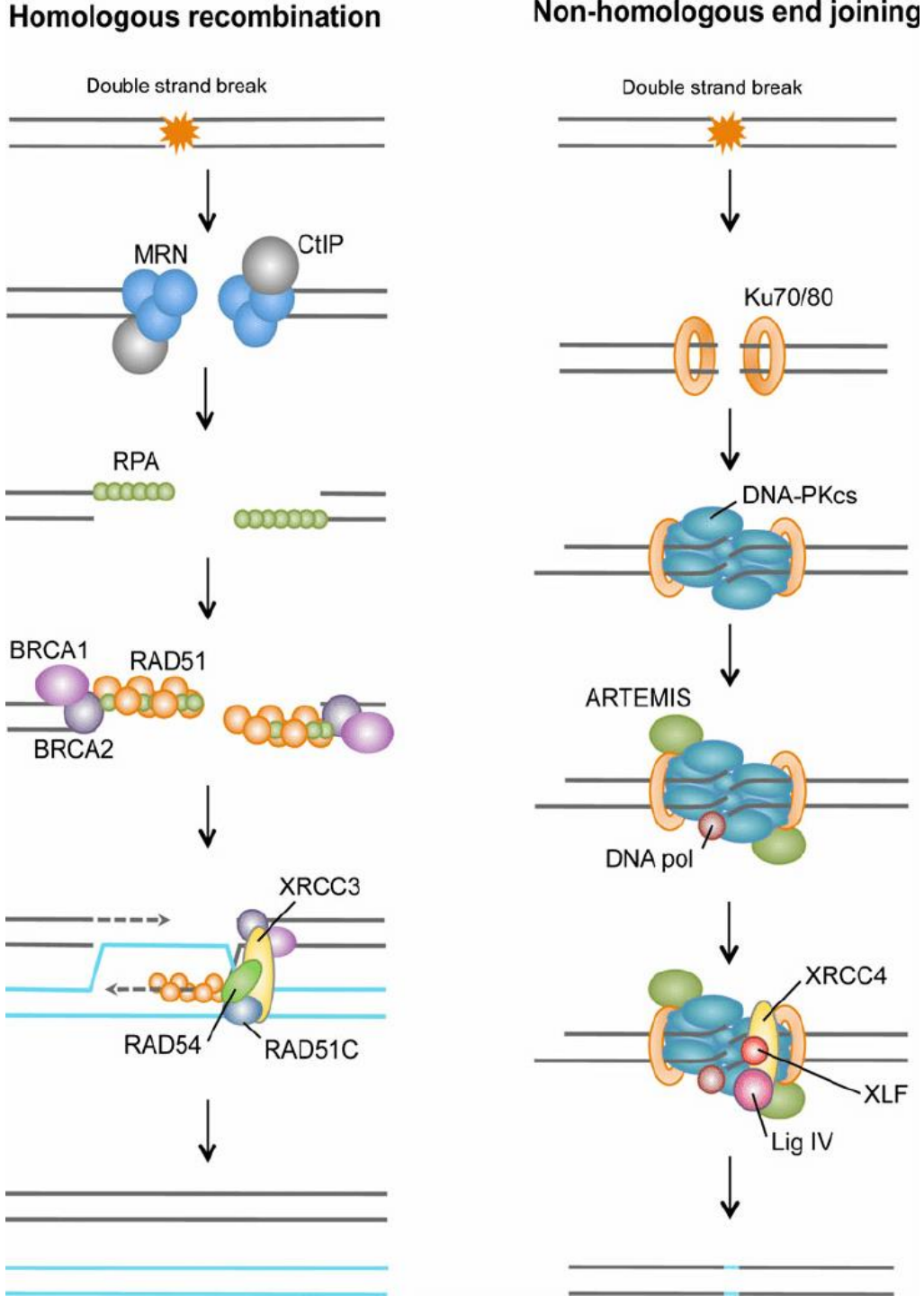


Brochier, C., & Langley, B. (2013). *Neurotherapeutics*, *10*, 817-830.

Edição gênica
Reparo

Reparo por:

- Homologia
  - Inserção (extensa)
- Junção das pontas
  - Pequenos InDels



Brochier, C., & Langley, B. (2013). *Neurotherapeutics*, *10*, 817-830.

Edição gênica
Estratégia

Sistema capaz de induzir quebra de dupla fita (DSB) sítio-específica

Reparo por:

- Homologia
  - Inserção (extensa)
- Junção das pontas
  - Pequenos InDels

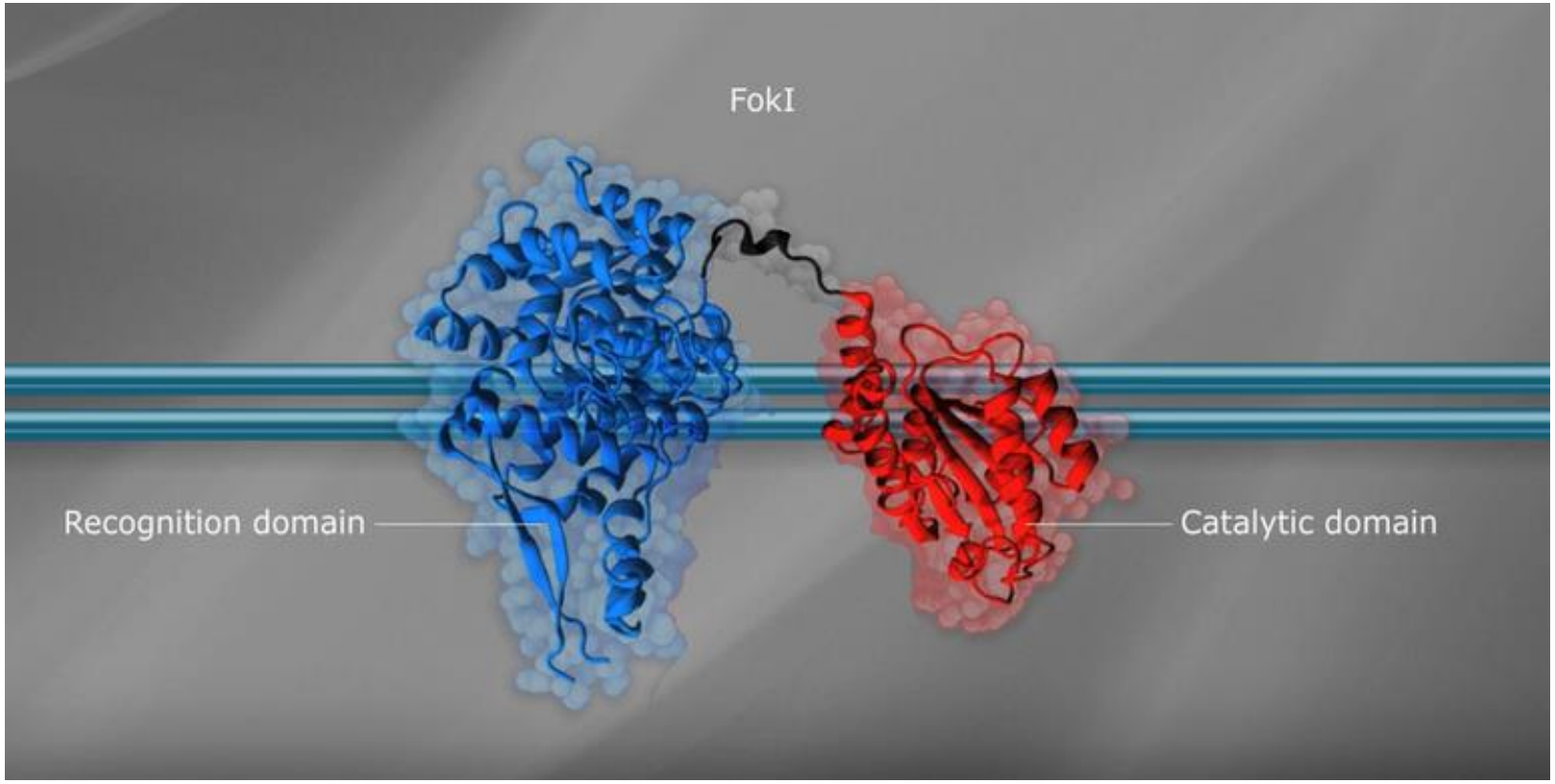
Edição gênica
Estratégia

Reparo por:
- Homologia
  - Inserção (extensa)
- Junção das pontas
  - Pequenos InDels

Sistema capaz de induzir quebra de dupla fita (DSB) sítio-específica

Edição gênica
Estratégia

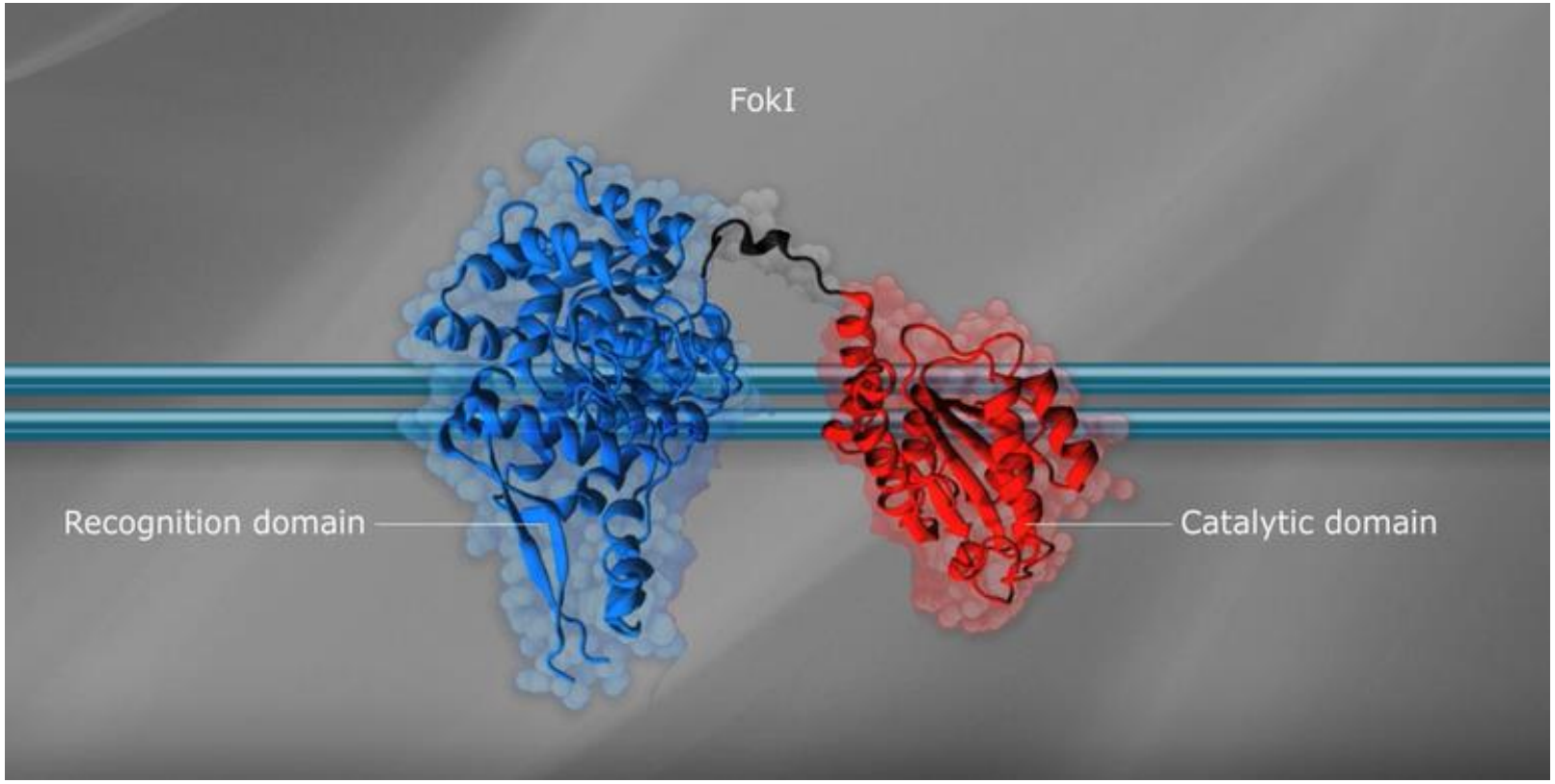
Sistema capaz de induzir quebra de dupla fita (DSB) sítio-específica



https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/type-ii-restriction-enzymes?autoplay=1

Edição gênica
Estratégia

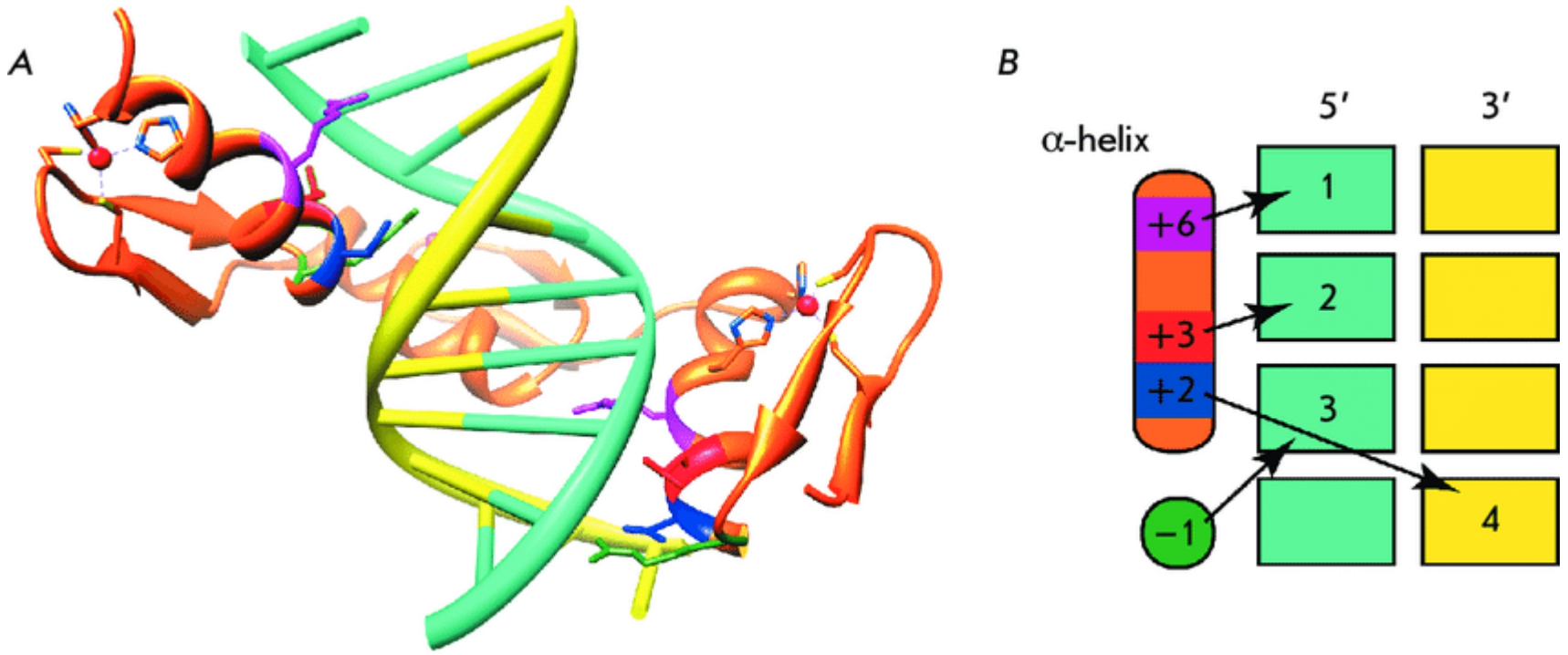
Sistema capaz de induzir quebra de dupla fita (DSB) sítio-específica



https://international.neb.com/tools-and-resources/video-library/type-ii-restriction-enzymes?autoplay=1

Edição gênica
Estratégia

Sistema capaz de induzir quebra de dupla fita (DSB) sítio-específica

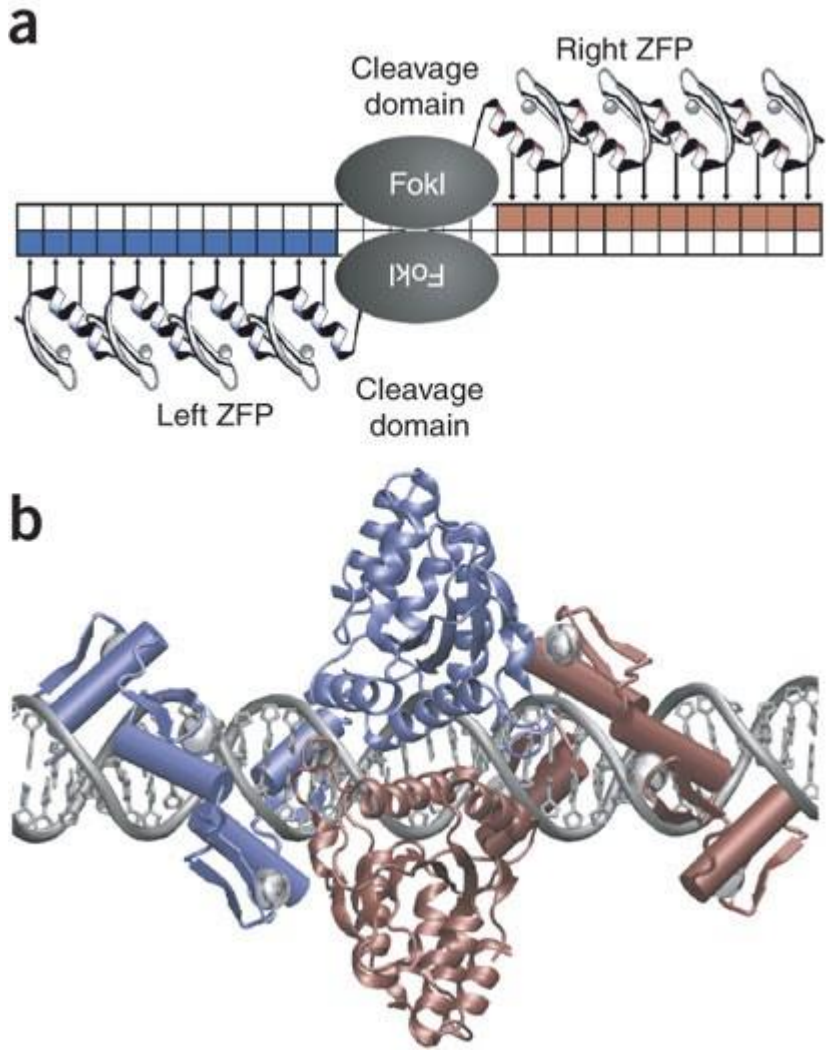


Fedotova, A. A., Bonchuk, A. N., Mogila, V. A., & Georgiev, P. G. (2017). *Acta Naturae*, *9*(2 (33)), 47-58.

Edição gênica
ZFN (Zinc Finger Nuclease)

Domínios dedo de zinco = Especificidade

Domínio catalítico de FokI = Induzir DSB

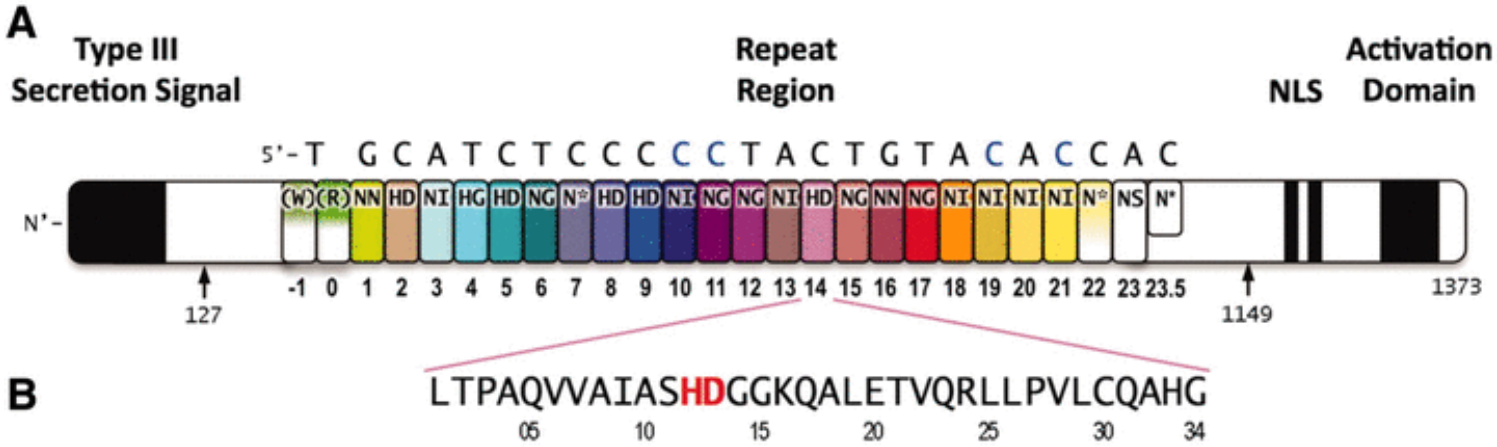


Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., ... & Rebar, E. J. (2007). *Nature biotechnology*, *25*(7), 778-785.

Edição gênica
TALEN

Transcription Activator-Like Effectors

Edição gênica TALEN

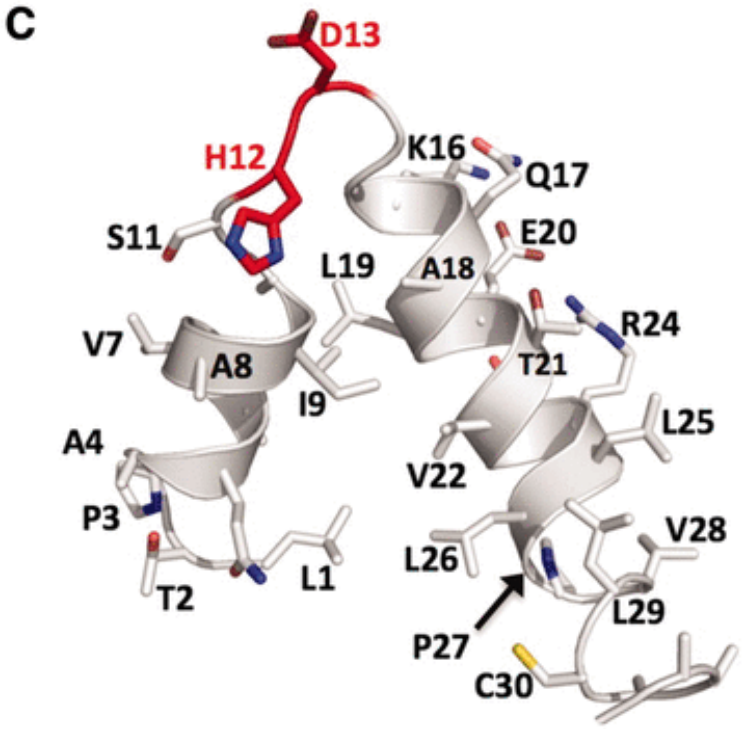


Transcription Activator-Like Effectors

Unidade = Repetição 34aa

Especificidade = resíduos 12-13

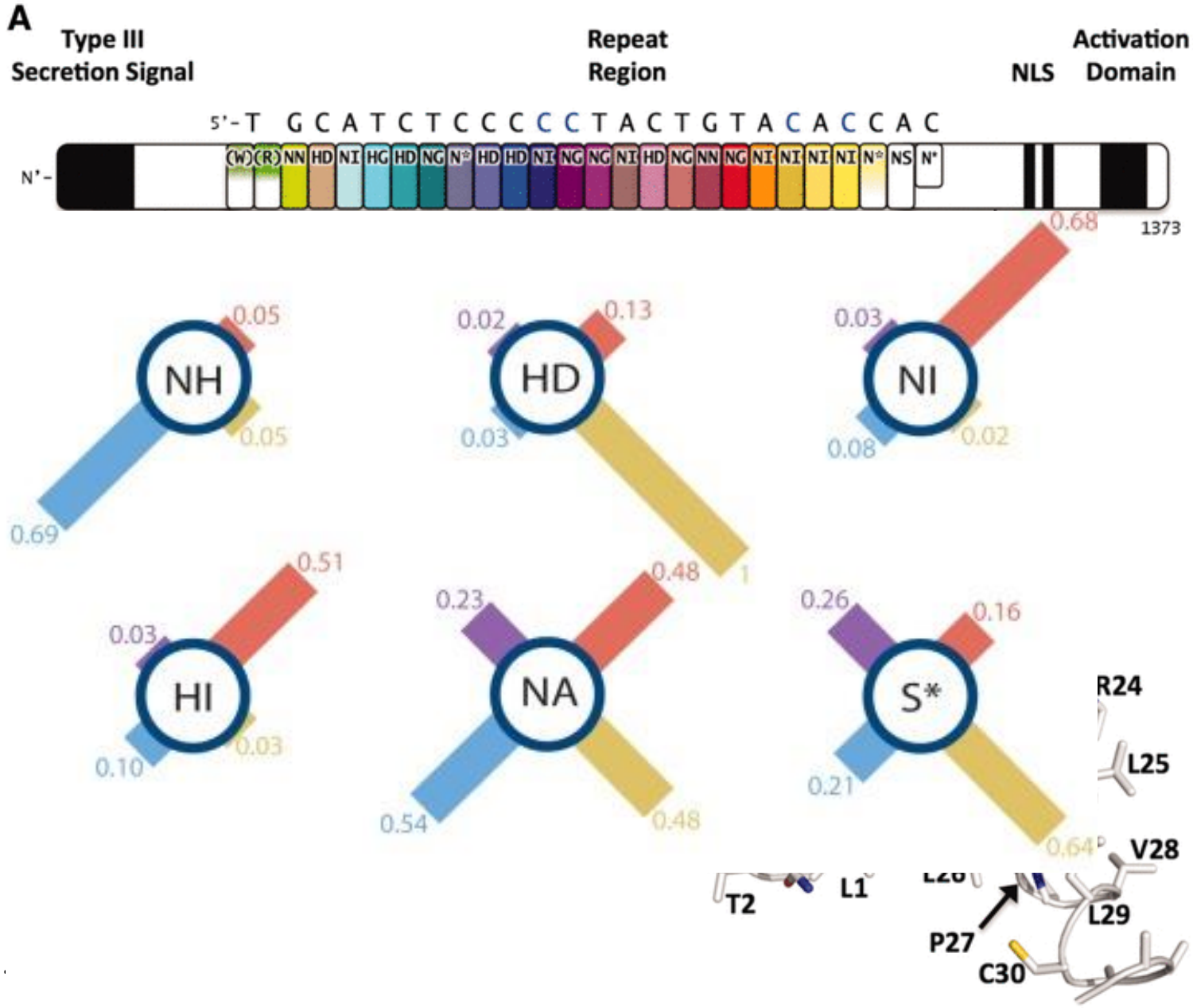
(RVD = Repeat Variable Diresidue)



Mak, A. N. S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. Stoddard, B. L. (2012). *Science*, *335*(6069), 716-719.

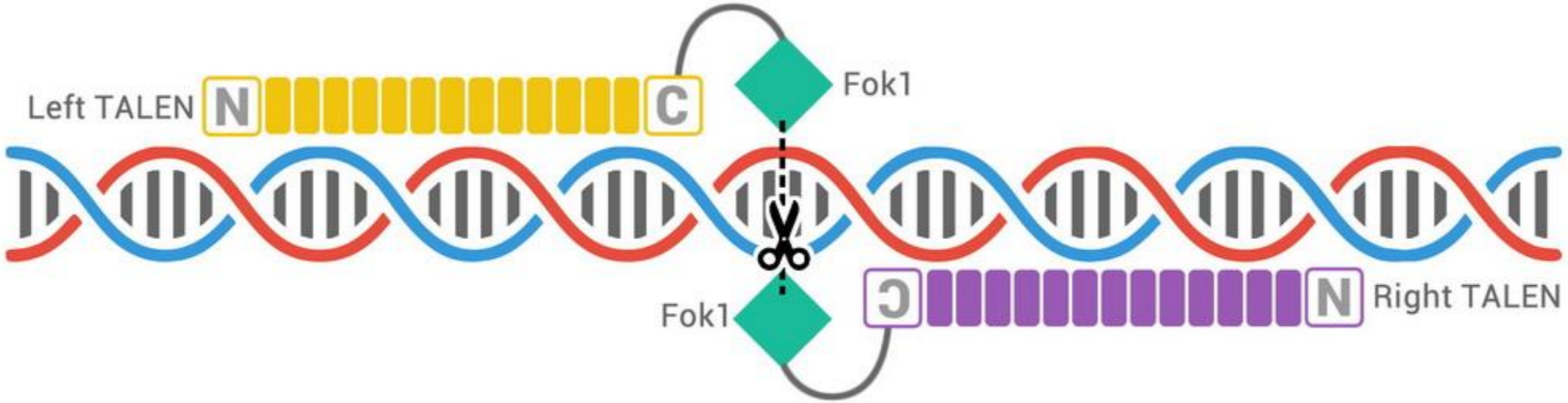
Edição gênica TALEN

Transcript
Effectors
Unidade = I
Especificida
(RVD = Rep



Mak, A. N. S., Bradley, P., Cernadas, R. A., Bogdanove, A. J. Stoddard, B. L. (2012). *Science*, *335*(6069), 716-719.

Edição gênica
TALEN



TALE = Especificidade

Domínio catalítico de FokI = Induzir DSB

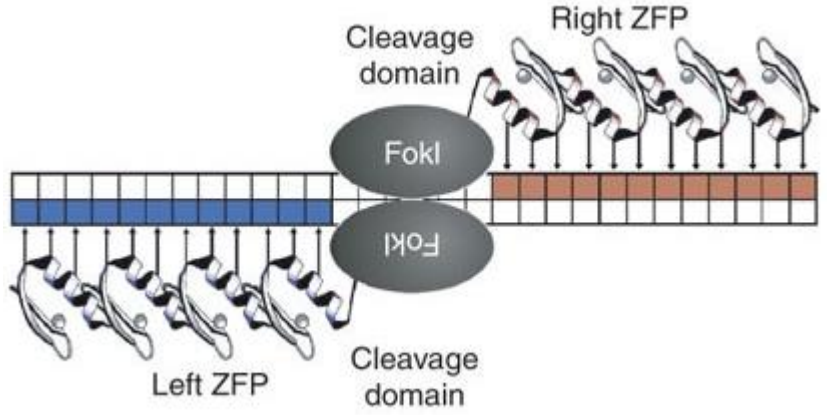
https://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/59/default.asp

Edição gênica
ZFN/TALEN

Difícil manipulação

Especificidade

Proteínas



Edição gênica CRISPR

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat

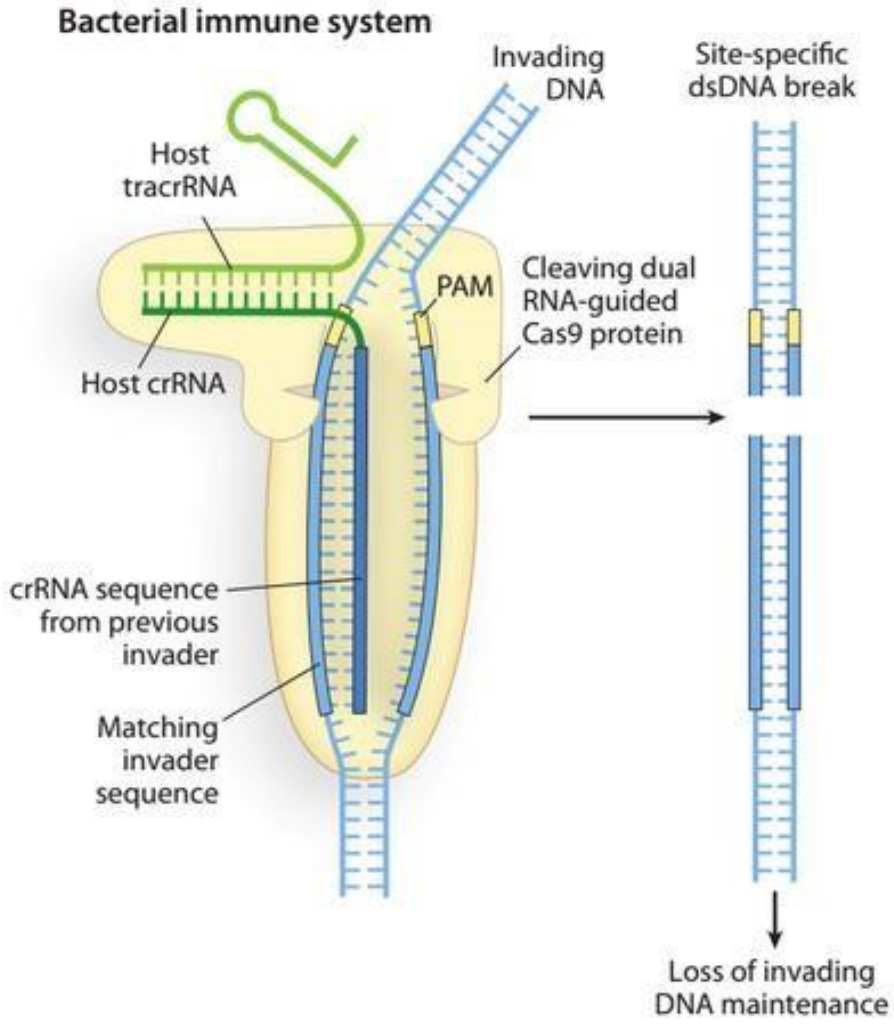


Image by H. Adam Steinberg, artforscience.com

Edição gênica CRISPR

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat

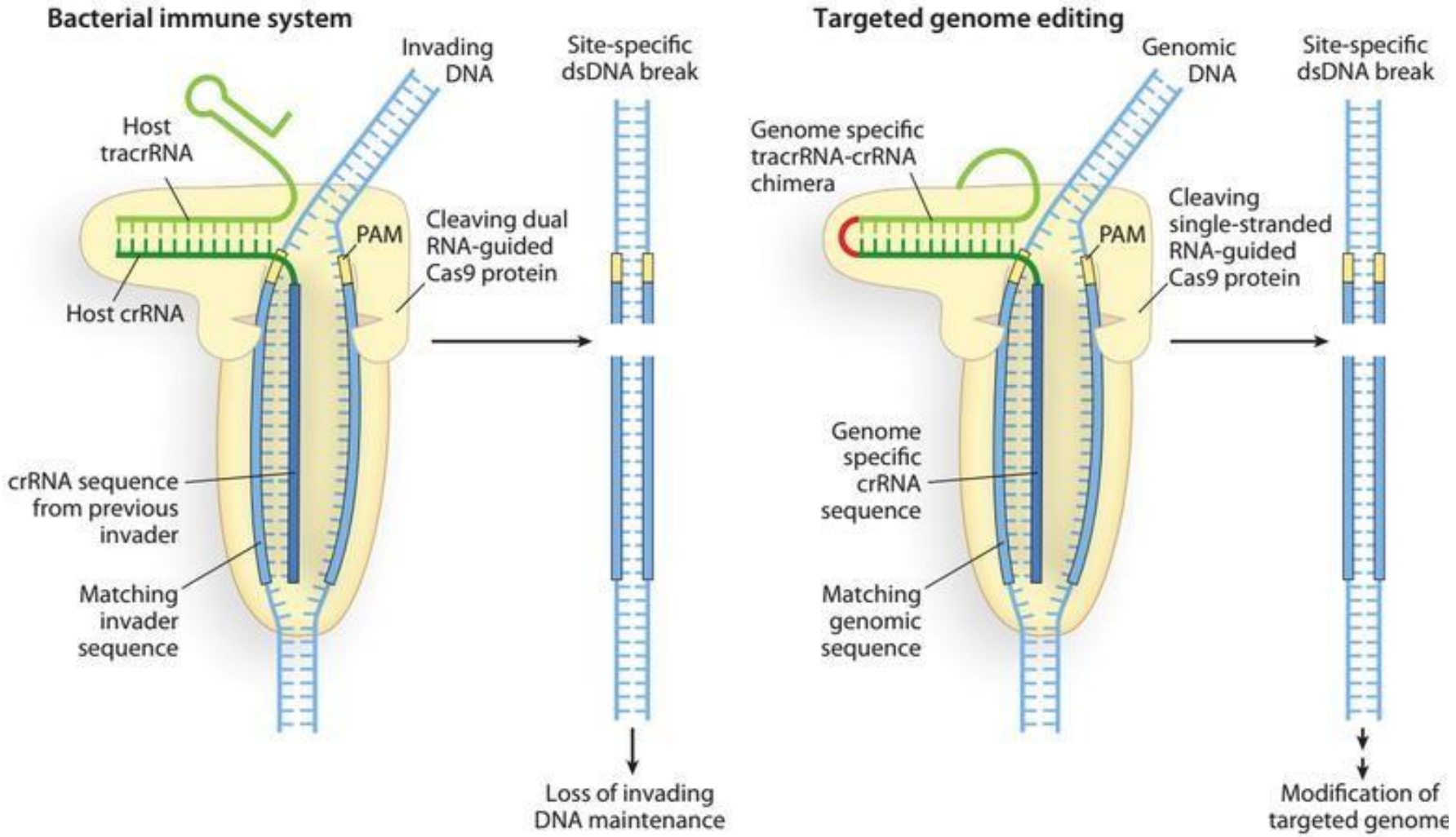
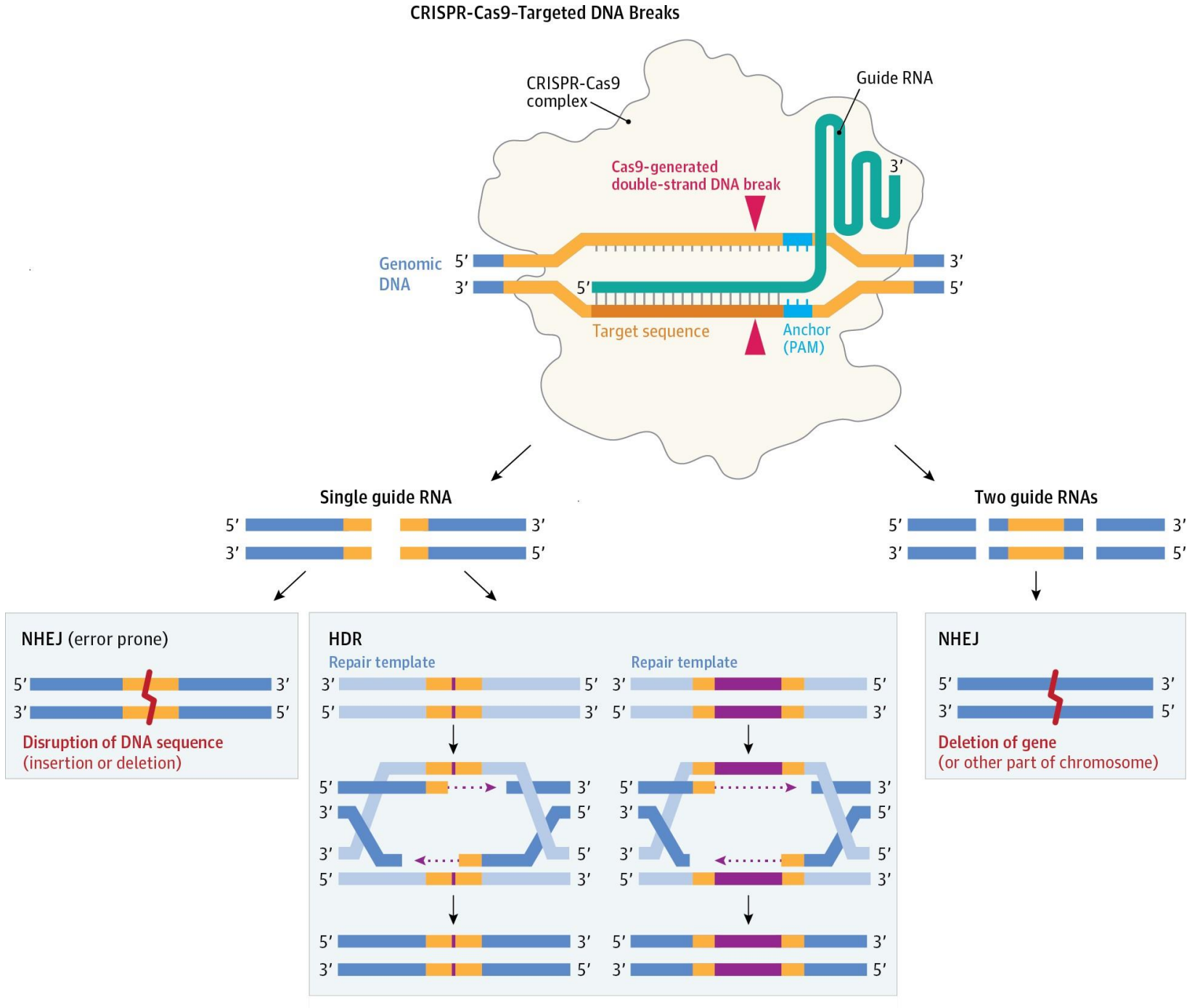


Image by H. Adam Steinberg, artforscience.com

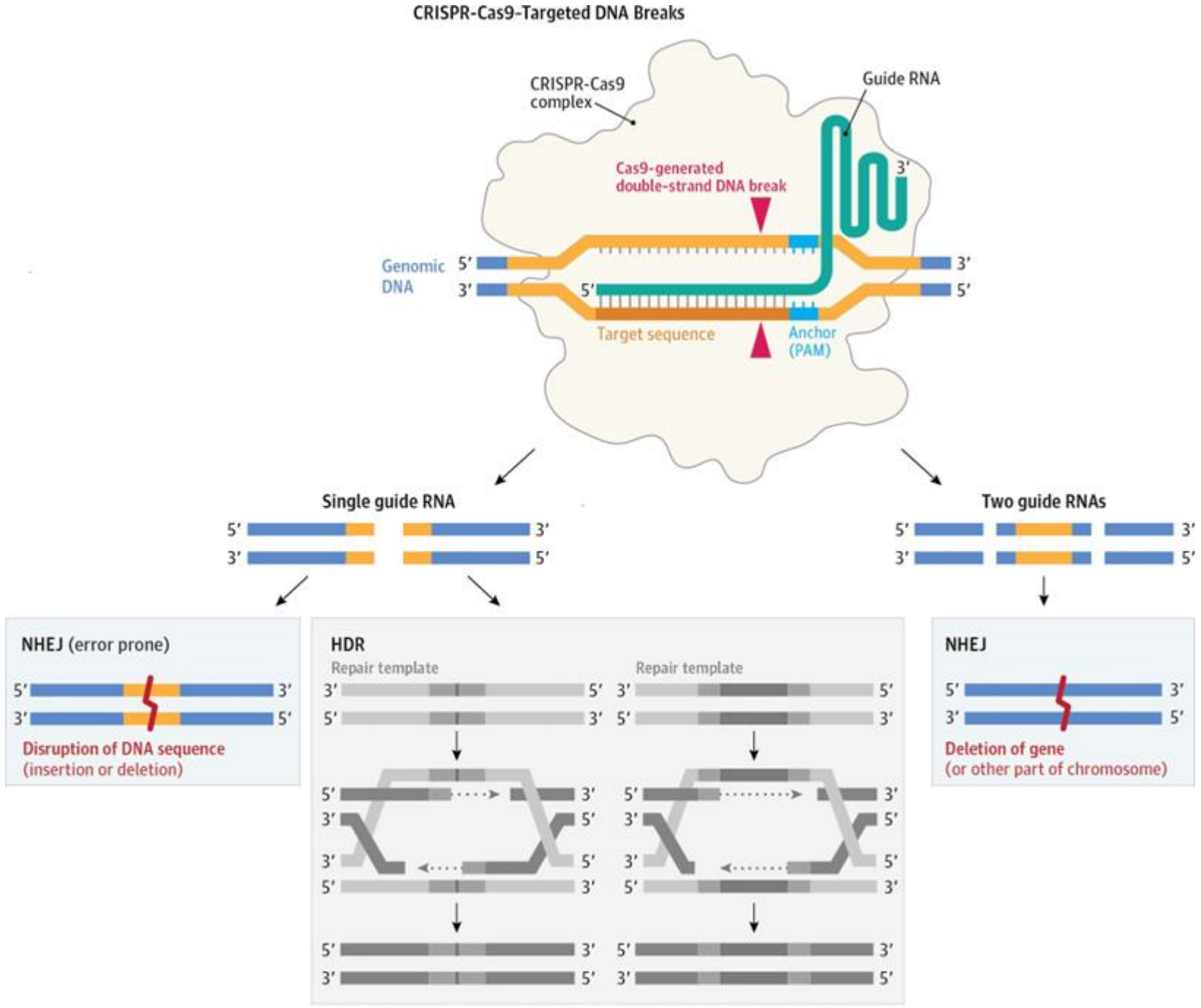
Edição gênica CRISPR

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat

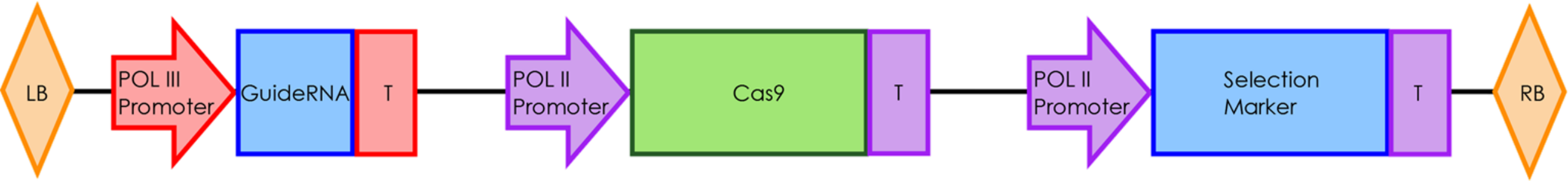


Edição gênica CRISPR

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat

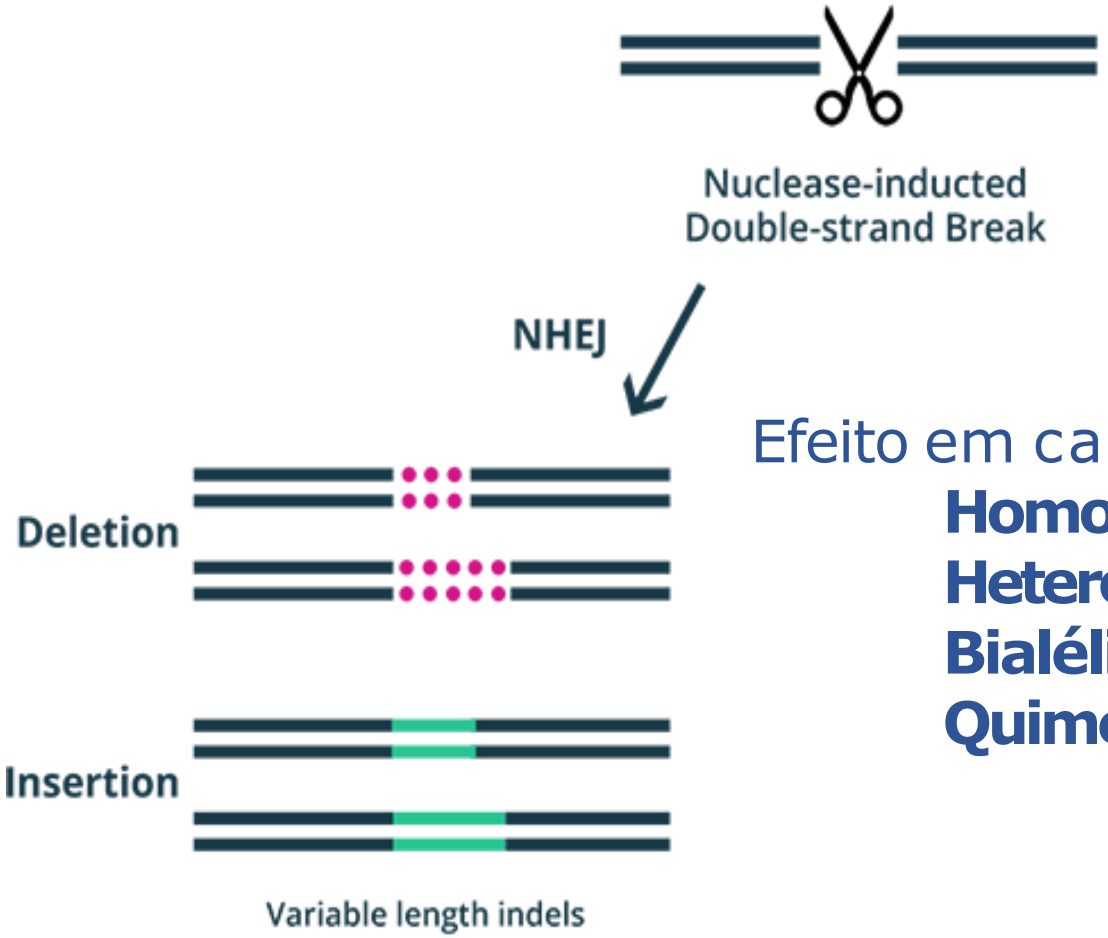


Edição gênica
CRISPR-Cas9 - Vetor



POL Ⅱ – transcrição de RNAs que codificam proteínas
POL Ⅲ – transcrição de RNAs funcionais (tRNA, alguns snRNAs, 5S rRNA)
T - Terminador

Edição gênica
CRISPR-Cas9



Efeito em cada cromossomo homólgo pode ser diferente

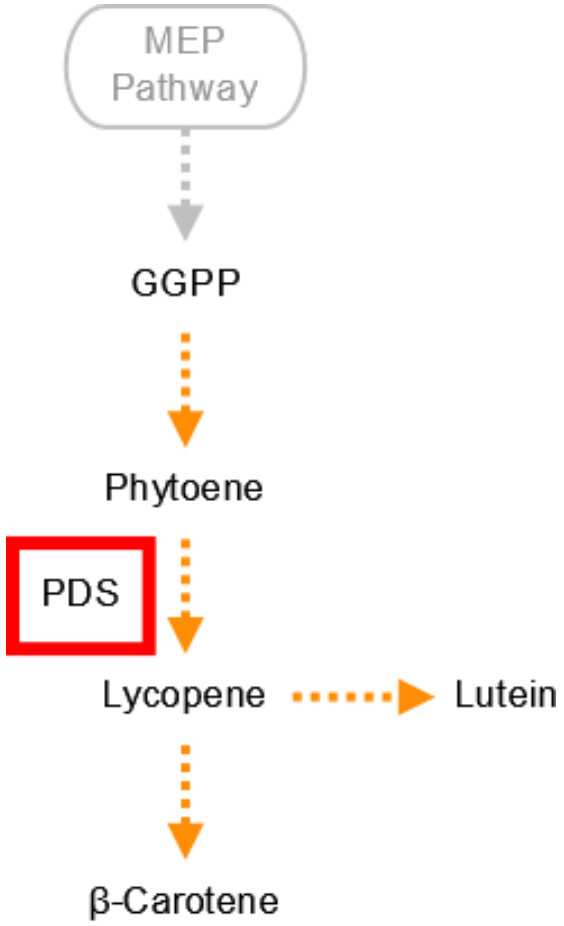
Homozigota = edições iguais (Editada/Editada)

Heterozigota = WT/Editada

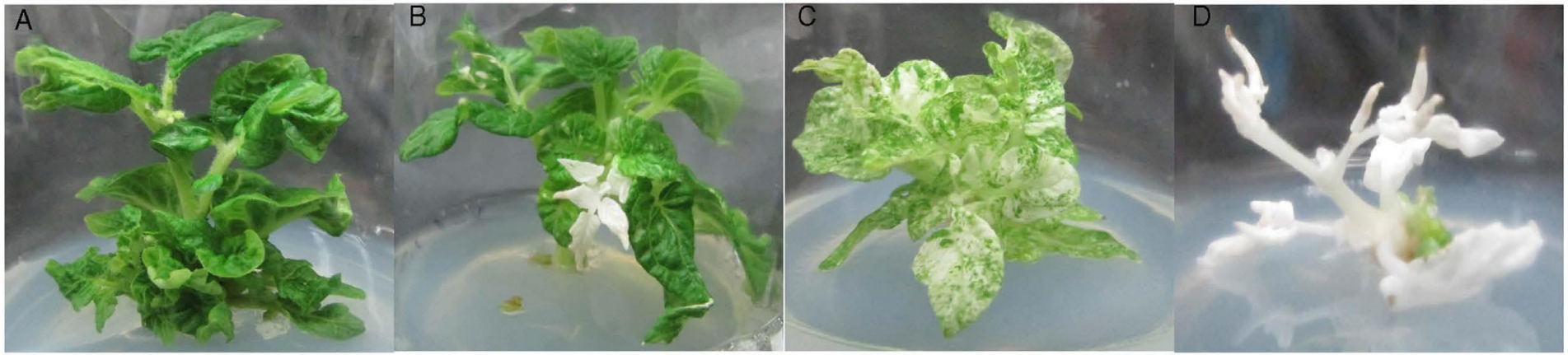
Bialélica = edições diferentes (Editada/Editada*)

Quimera = edições posterior ao início da regeneração (População mista de células)

Edição gênica CRISPR-Cas9

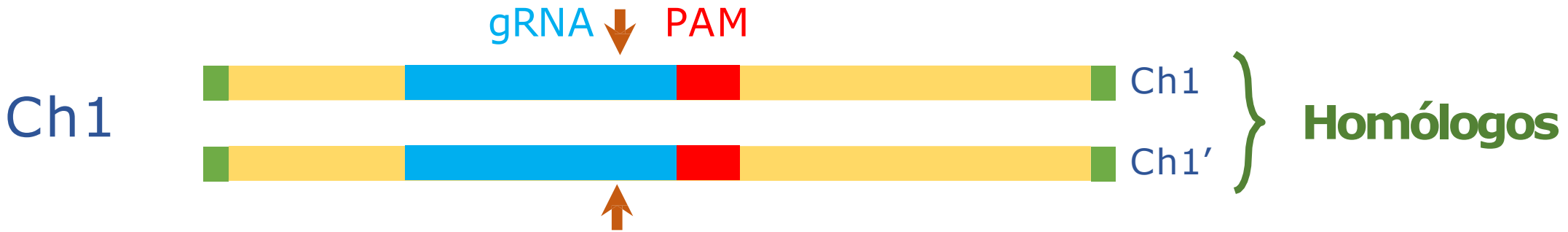


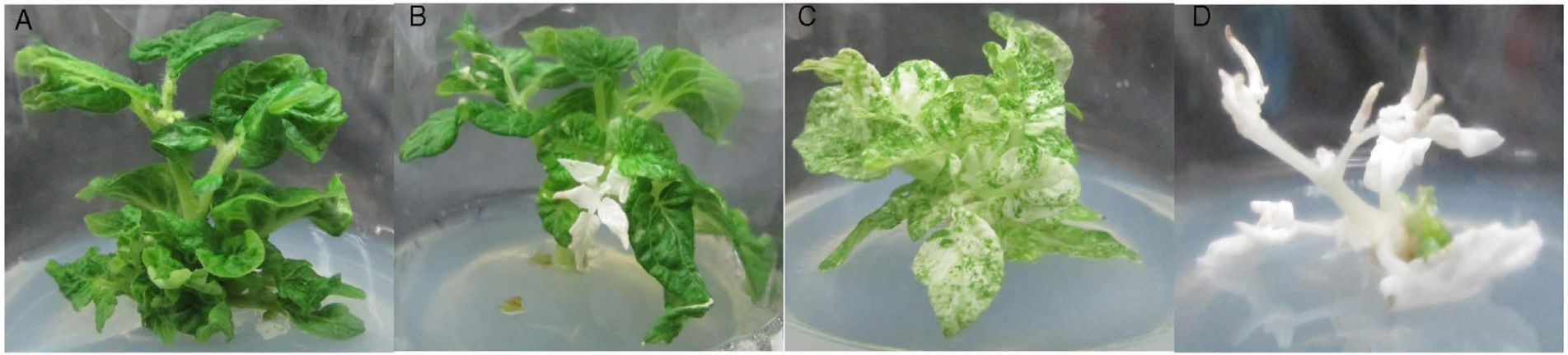
Target gene	sites	No. of examed lines	Zygosity[$]			
			Homozygote	Biallele	Chimera	WT[#]
SlPDS	sgRNA1	21	0	0	15(71.4%)	6(28.6%)
SlPDS	sgRNA2	7	0	1 (14.3%)	6 (85.7%)	0



Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., ... & Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. Scientific reports, 6, 24765.

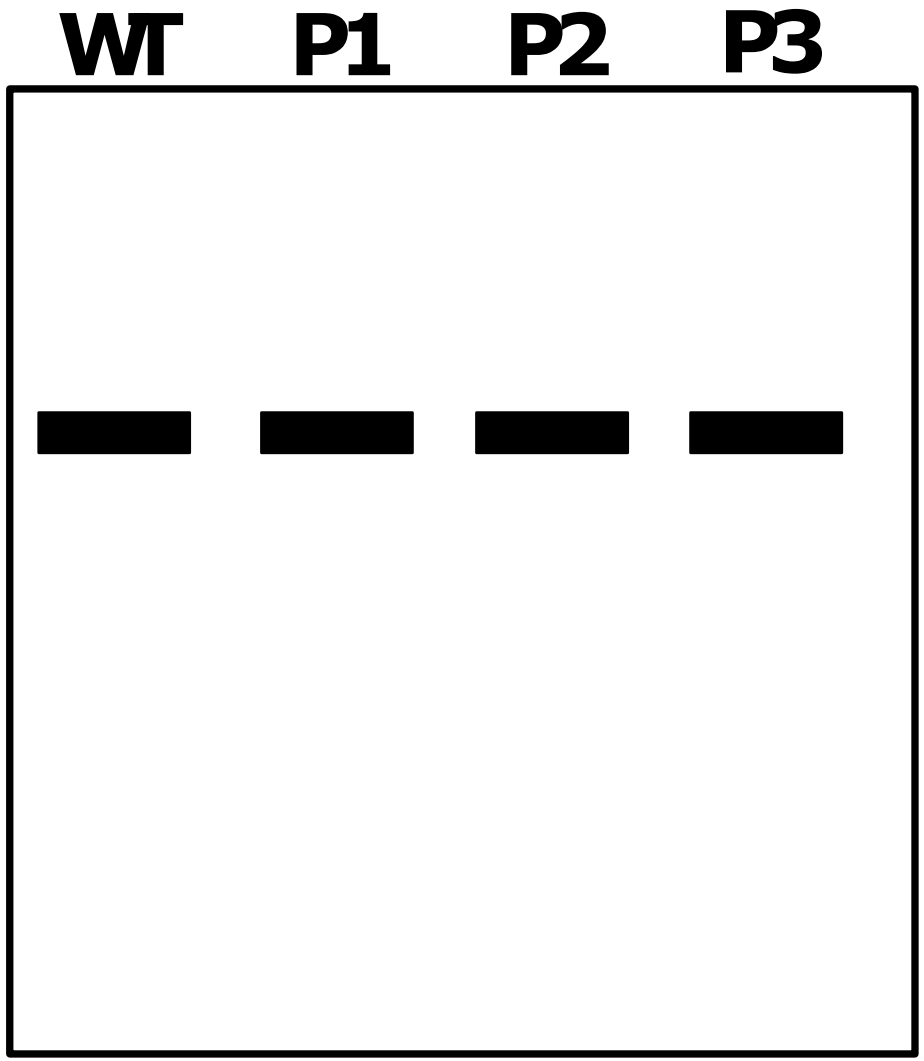
Edição gênica
CRISPR-Cas9





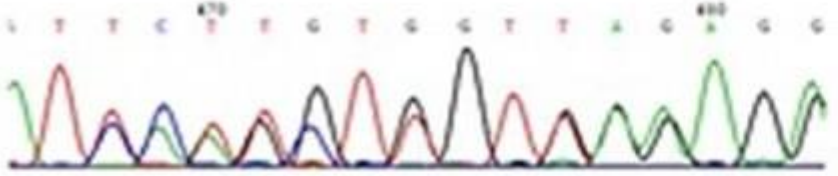
Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., ... & Lu, G. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. Scientific reports, 6, 24765.

Edição gênica
CRISPR-Cas9



Edição gênica
CRISPR-Cas9

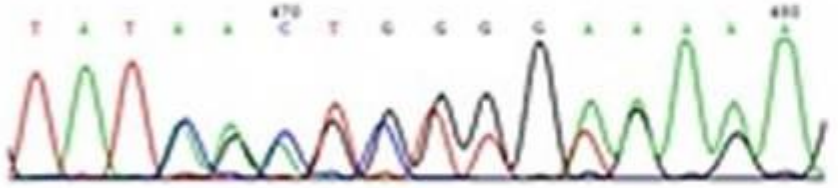
Planta1 (P1)



GAAAGACAAGATGCTATGTATCAAGCTGGTGAAAGA +1
GAAAGACAAGATGCTATGTATC-AGCTGGTGAAAGA WT

Homólogos

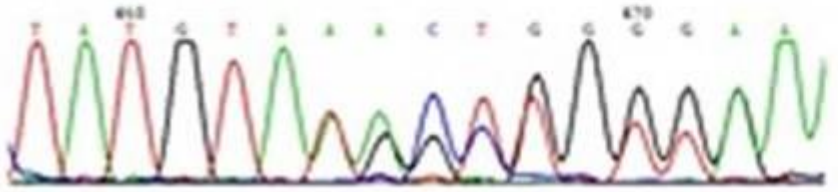
Planta2 (P2)



GAAAGACAAGATGCTATGTATCAAGCTGGTGAAAGA +1
GAAAGACAAGATGCTATGTAT--AGCTGGTGAAAGA -1

Homólogos

Planta3 (P3)

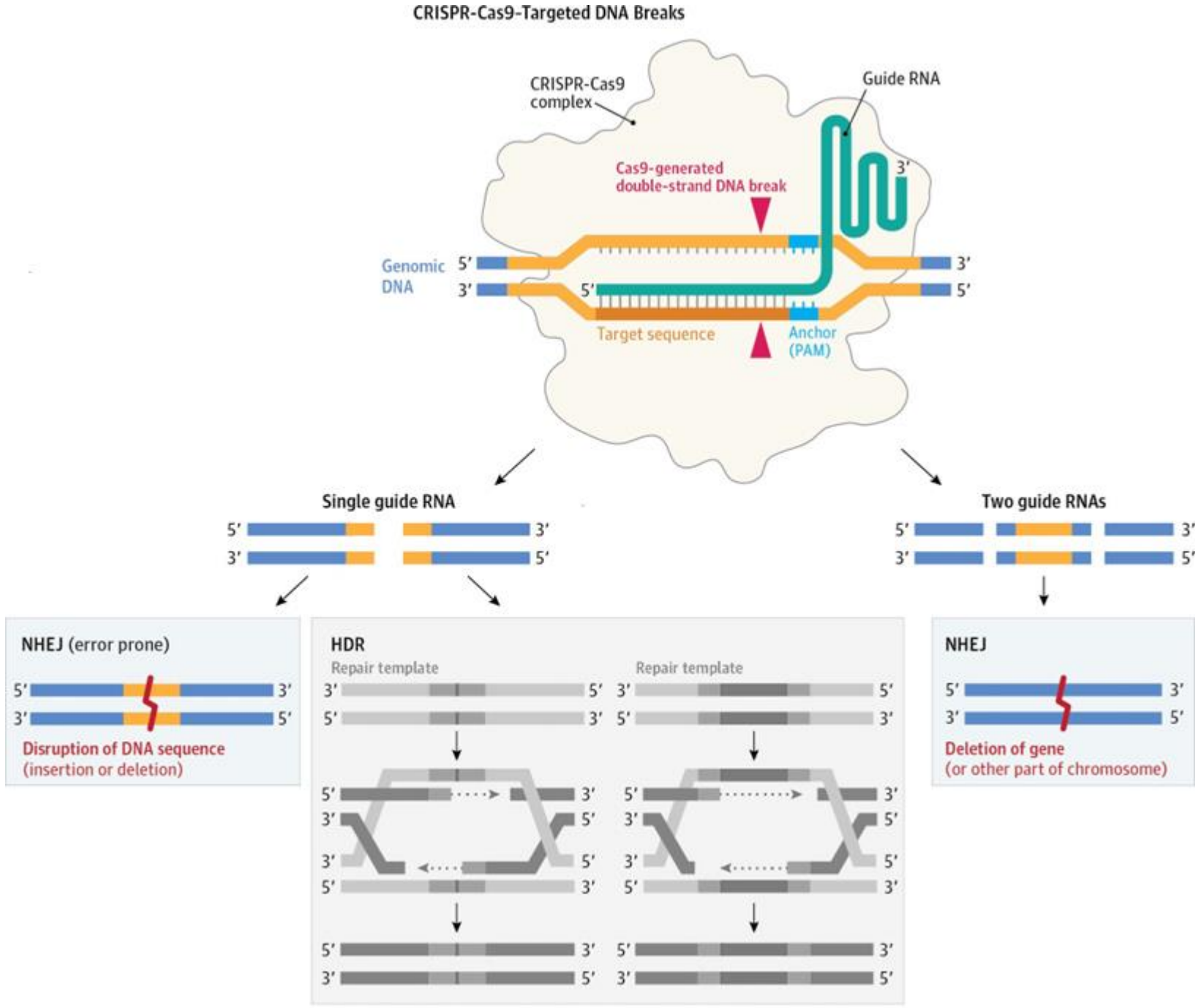


GAAAGACAAGATGCTATGTAT--AGCTGGTGAAAGA -1
GAAAGACAAGATGCTATGTA---AGCTGGTGAAAGA -2

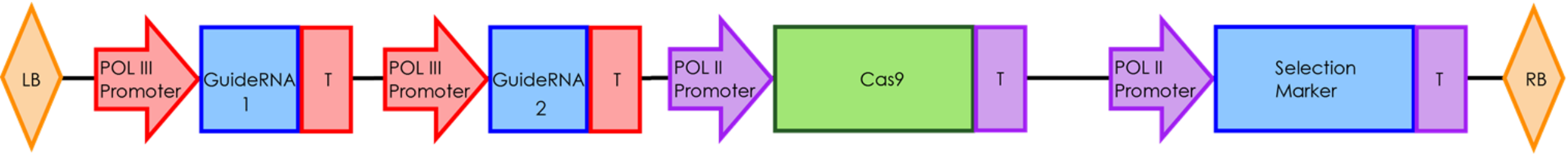
Homólogos

Edição gênica CRISPR

Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat



Edição gênica
CRISPR-Cas9 - Vetor

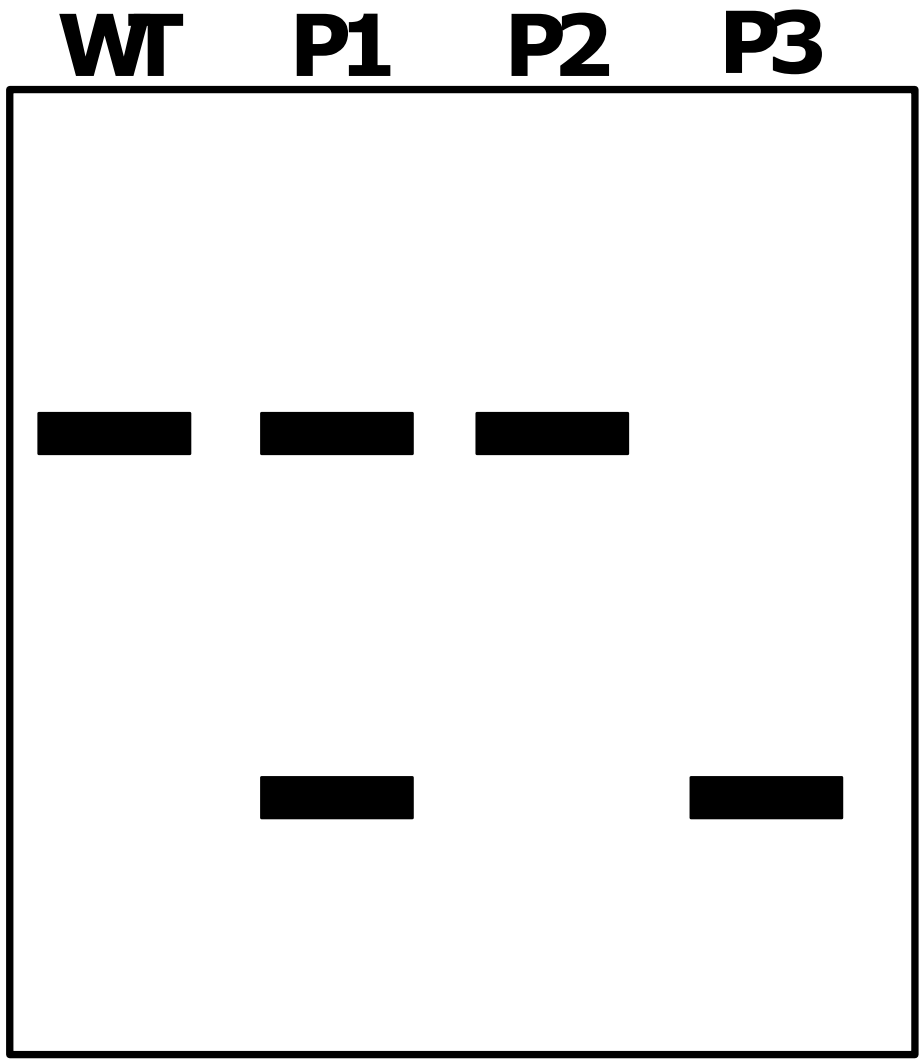


POL Ⅱ – transcrição de RNAs que codificam proteínas
POL Ⅲ – transcrição de RNAs funcionais (tRNA, alguns snRNAs, 5S rRNA)
T - Terminador

Edição gênica
CRISPR-Cas9

Edição gênica
CRISPR-Cas9

Edição gênica
CRISPR-Cas9

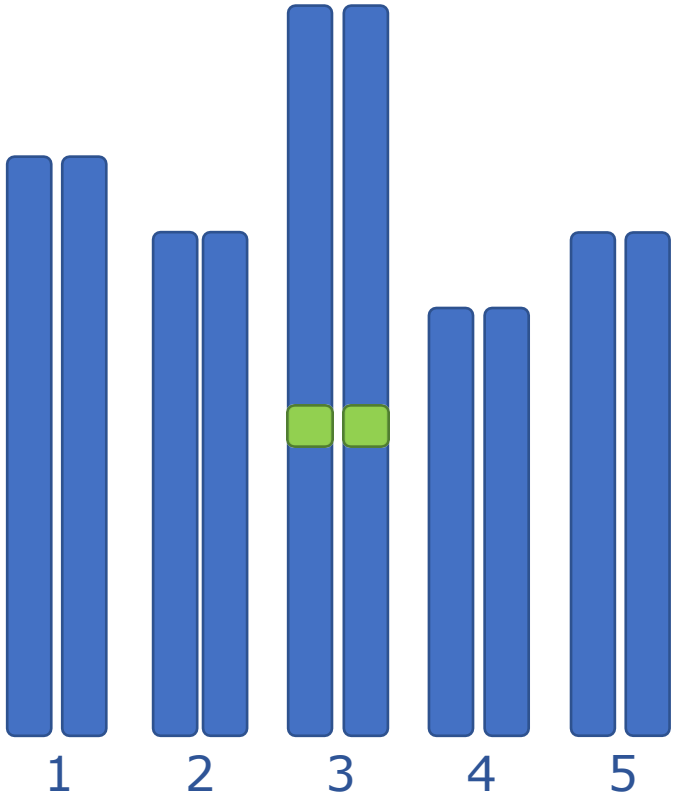


Quais são certamente editadas?

Quais são certamente homozigotas?

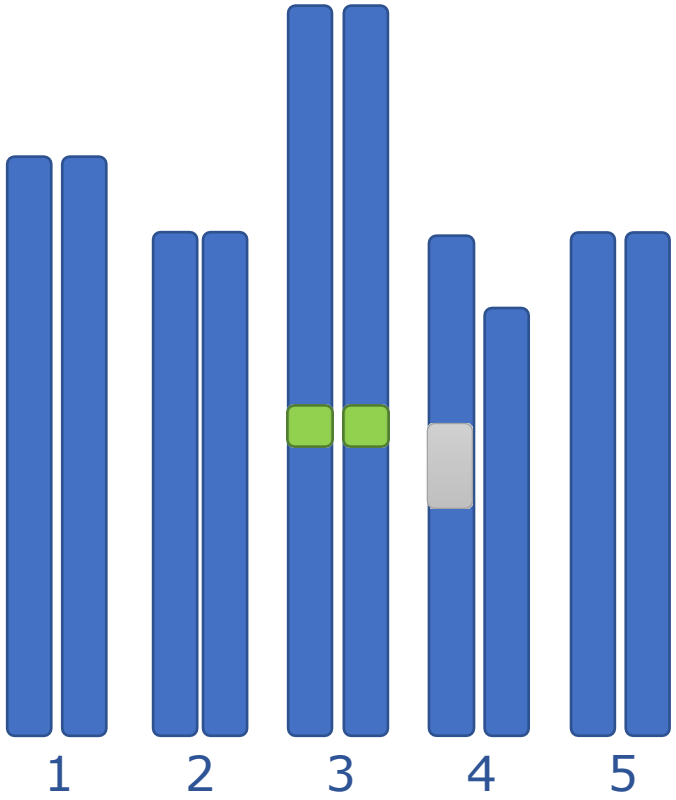
Edição gênica

CRISPR-Cas9

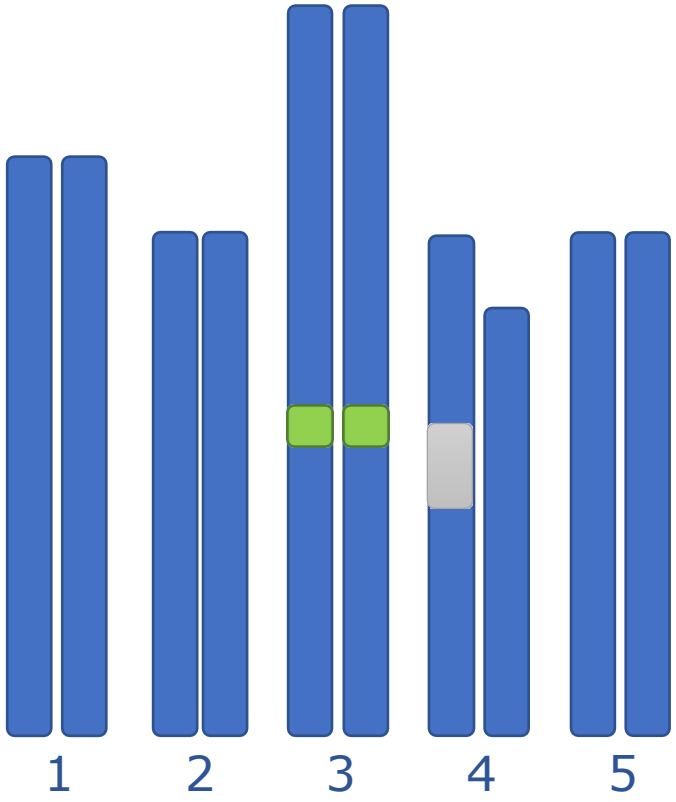


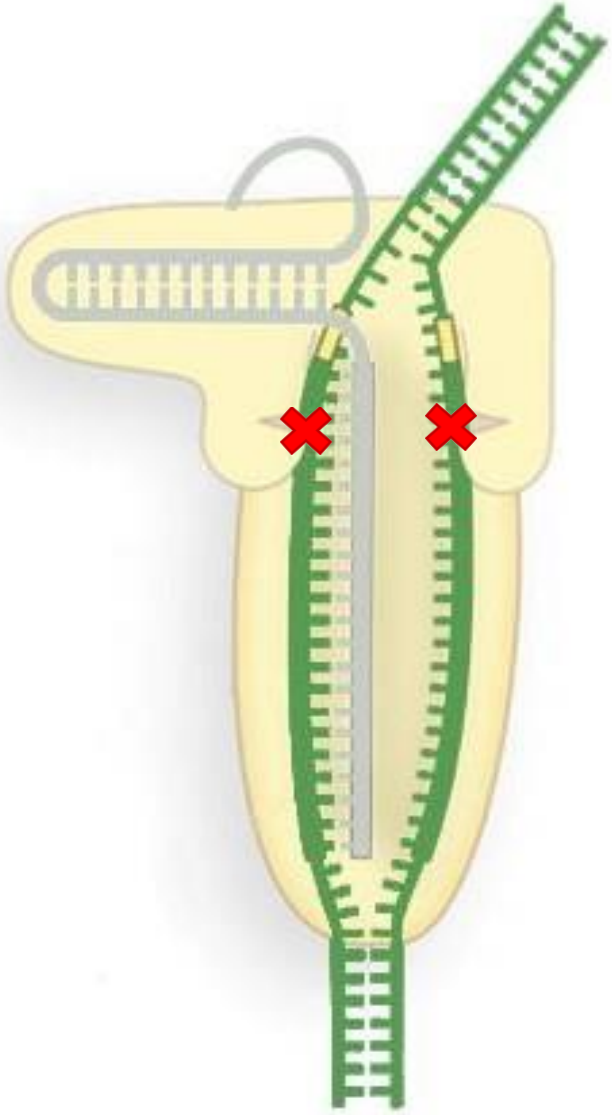
T-DNA

Edição gênica
CRISPR-Cas9

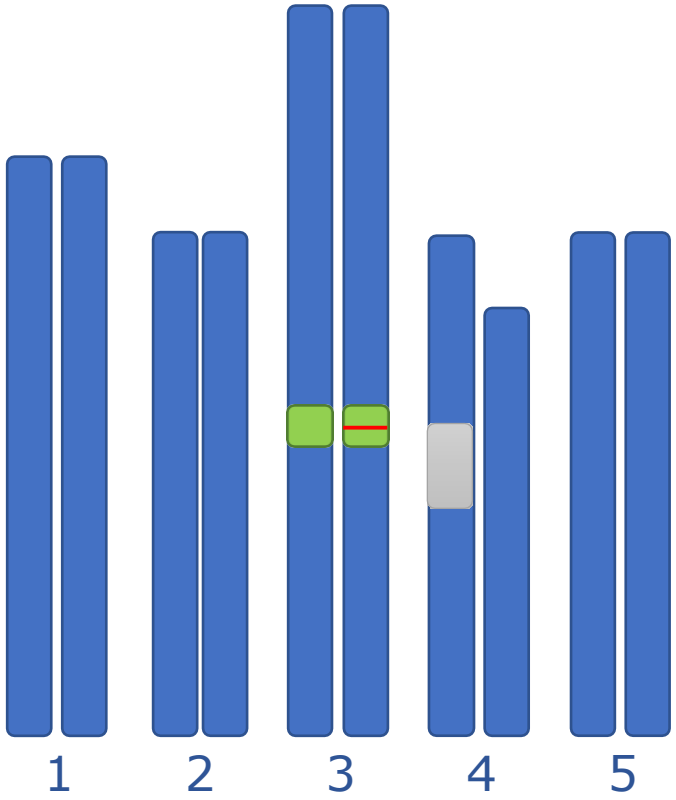


Edição gênica
CRISPR-Cas9



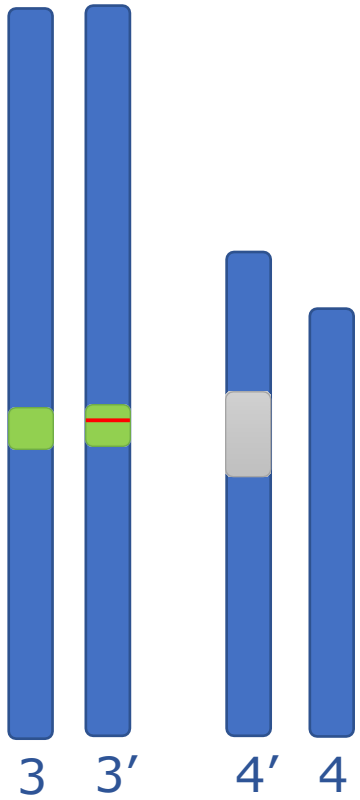


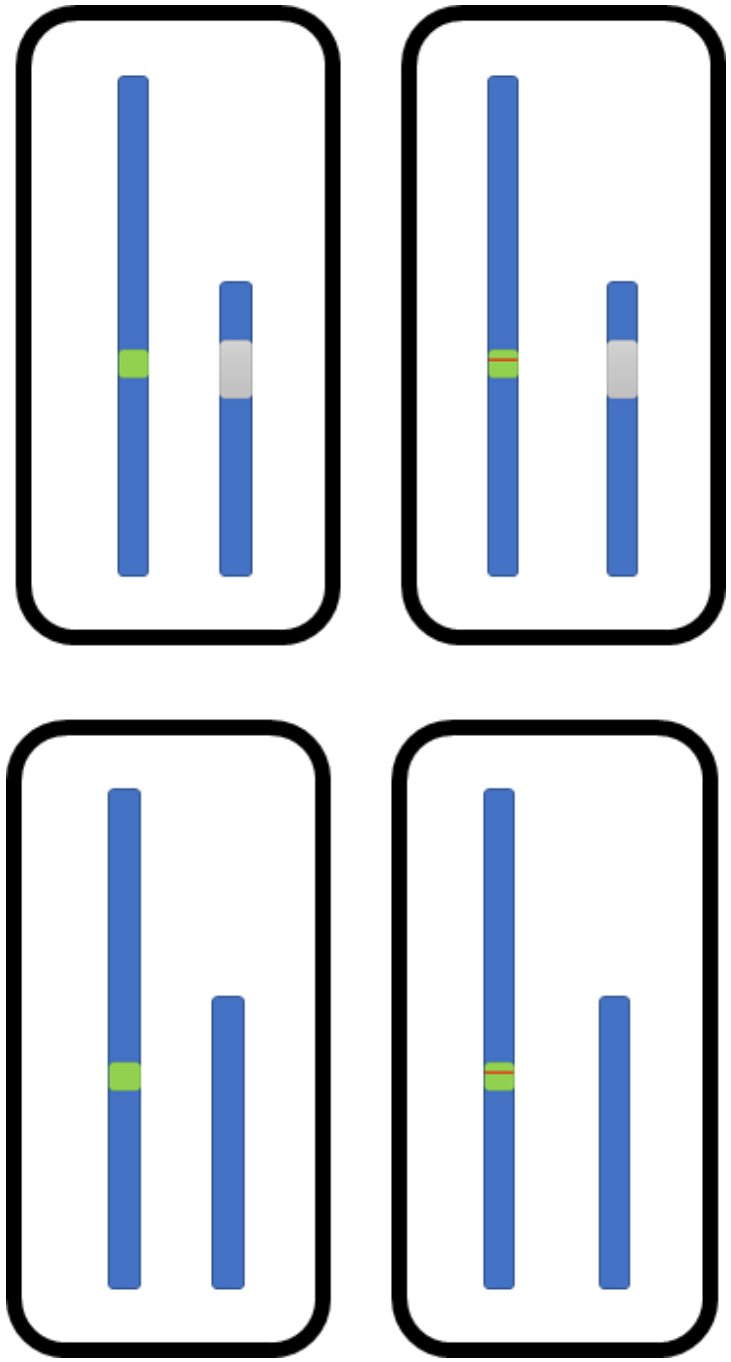
Edição gênica
CRISPR-Cas9



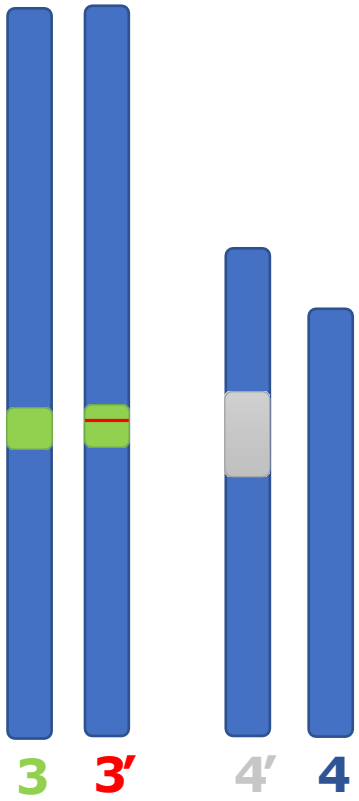
É necessário
manter o T-DNA?

Edição gênica
CRISPR-Cas9

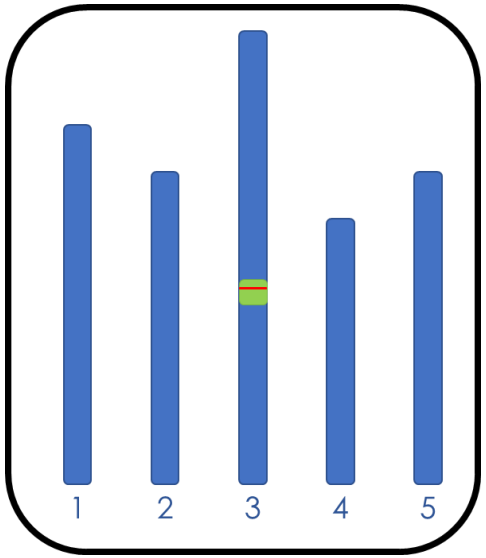




Edição gênica
CRISPR-Cas9



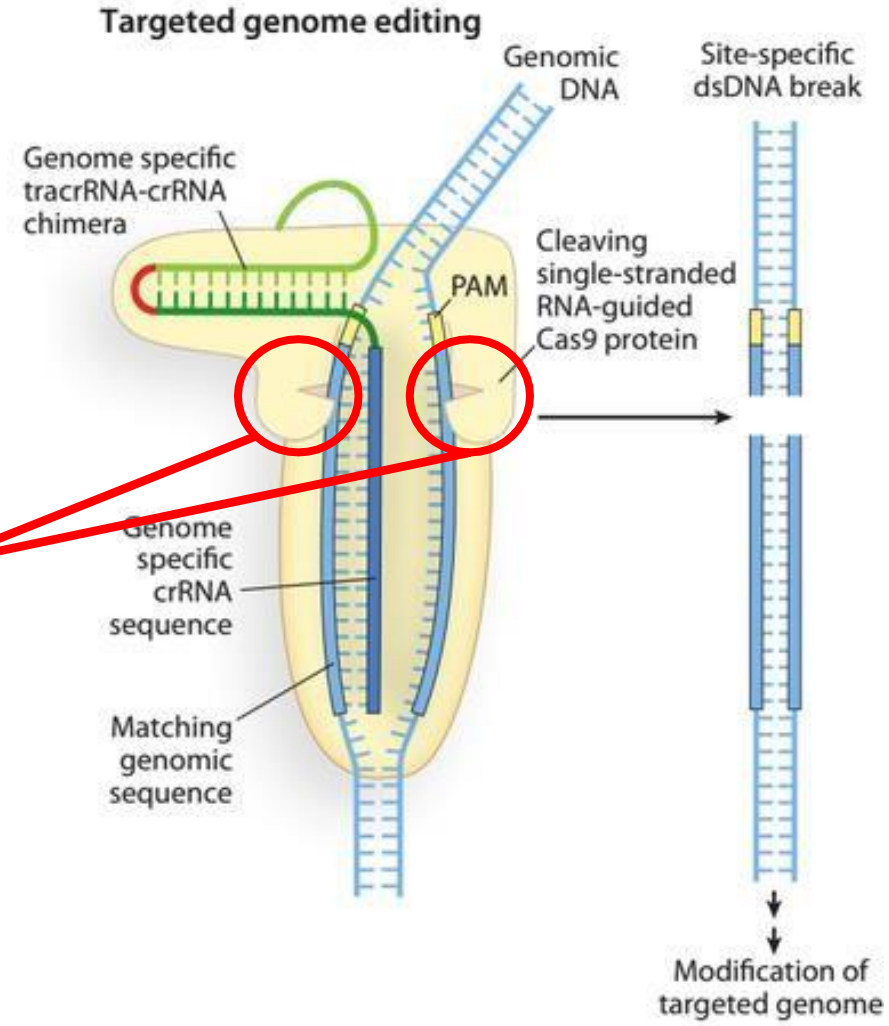
	3 4′	3 4	3′ 4′	3′ 4
3 4′	3 3 4′ 4′	3 3 4′ 4	3 3′ 4′ 4′	3 3′ 4′ 4
3 4	3 3 4′ 4	3 3 4 4	3 3′ 4′ 4	3 3′ 4 4
3′ 4′	3 3′ 4′ 4′	3 3′ 4′ 4	3′ 3′ 4′ 4′	3′ 3′ 4′ 4
3′ 4	3 3′ 4′ 4	3 3′ 4 4	3′ 3′ 4′ 4	3′ 3′ 4 4



Frequência 1:16

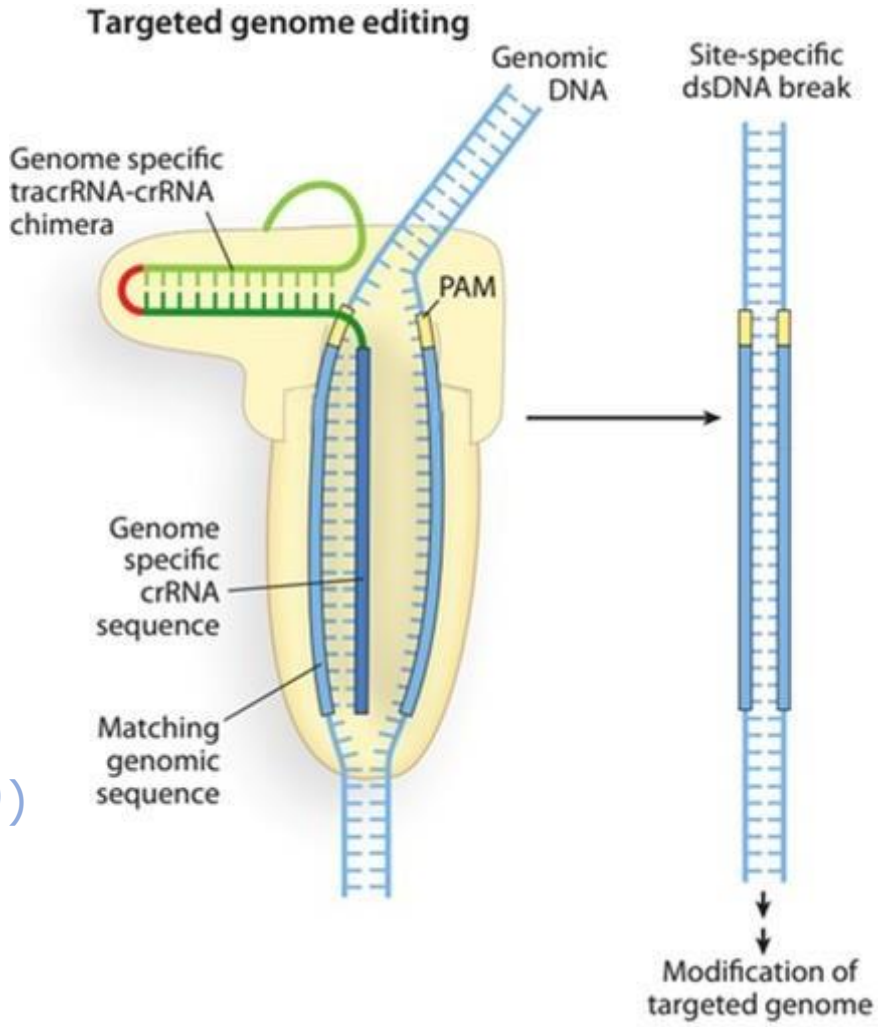
Edição gênica
CRISPR-Cas9
Além da edição

Domínios nickase

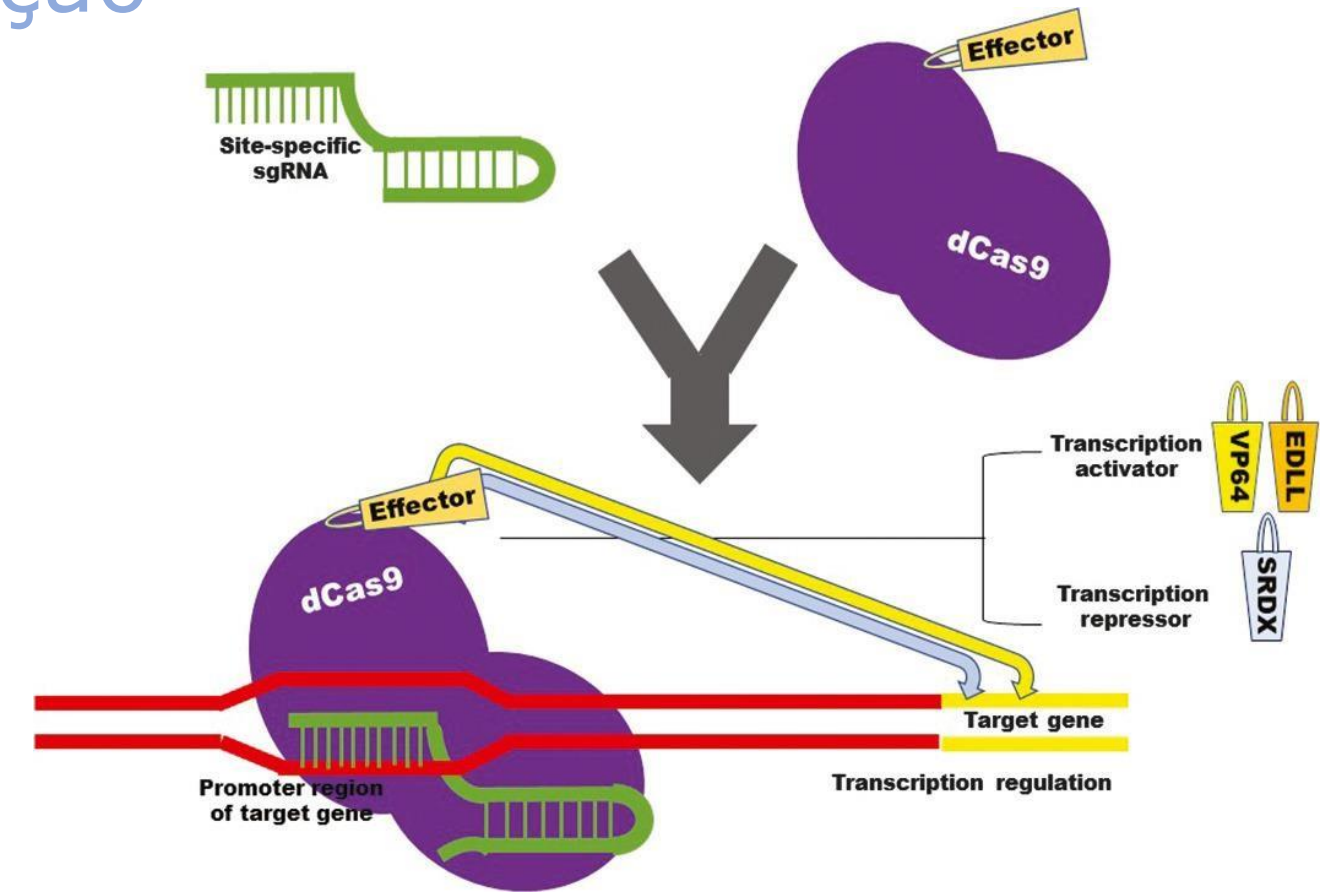


Edição gênica
CRISPR-Cas9
Além da edição

Dead-Cas9 (dCas9)

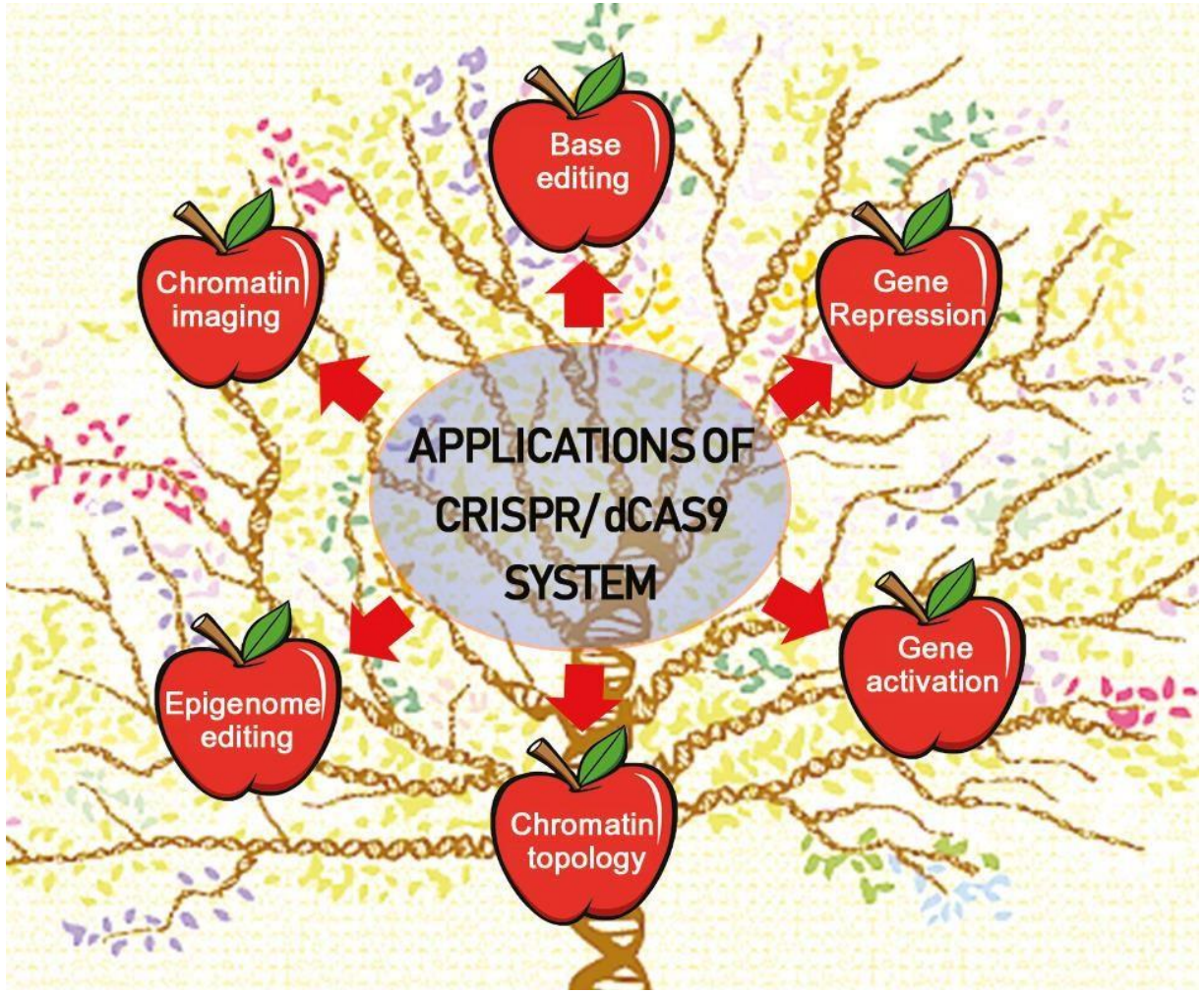


Edição gênica
CRISPR-Cas9
Além da edição



Moradpour, Mahdi, and Siti Nor Akmar Abdulah. "CRISPR/dCas9 Platforms in Plants: Strategies and Applications beyond Genome Editing." *Plant Biotechnology Journal* (2019).

Edição gênica
CRISPR-Cas9
Além da edição



Moradpour, Mahdi, and Siti Nor Akmar Abdulah. "CRISPR/dCas9 Platforms in Plants: Strategies and Applications beyond Genome Editing." *Plant Biotechnology Journal* (2019).