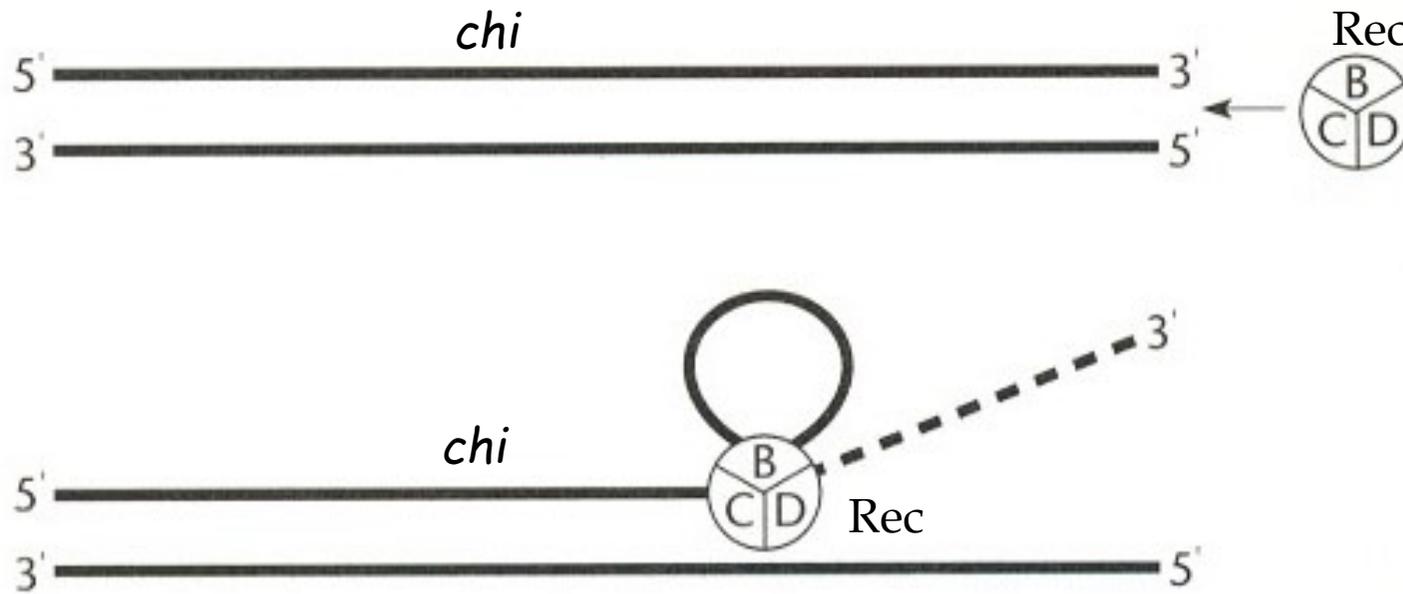
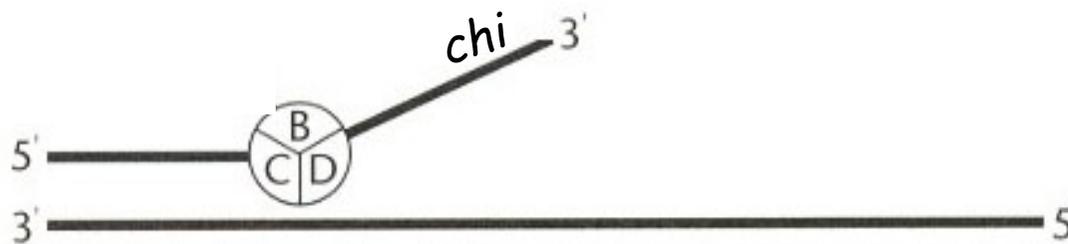


## Bases moleculares da recombinação:

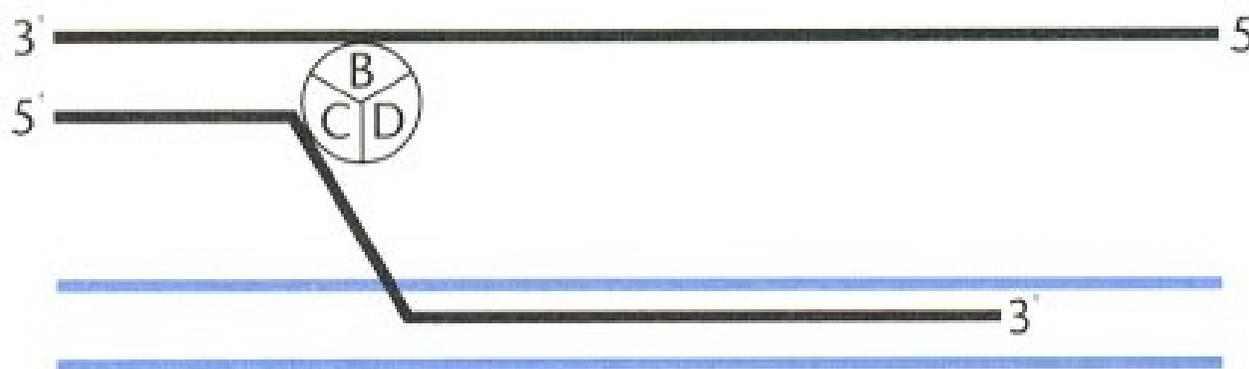
1. O principal complexo enzimático necessário para a recombinação é RecBCD
2. RecBCD tem atividade de exonuclease 3' a 5' e atividade de endonuclease.
3. O RecBCD carrega no DNA em uma extremidade ou em uma quebra na fita dupla.



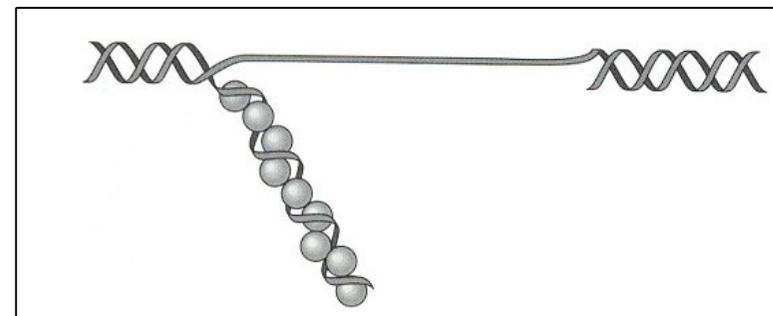
4. A recombinação rec é estimulada por sítios chi (GCTGTGTG) assimétricos
5. O RecBCD se move para dentro do DNA criando um loop que sua atividade de exonuclease degrada

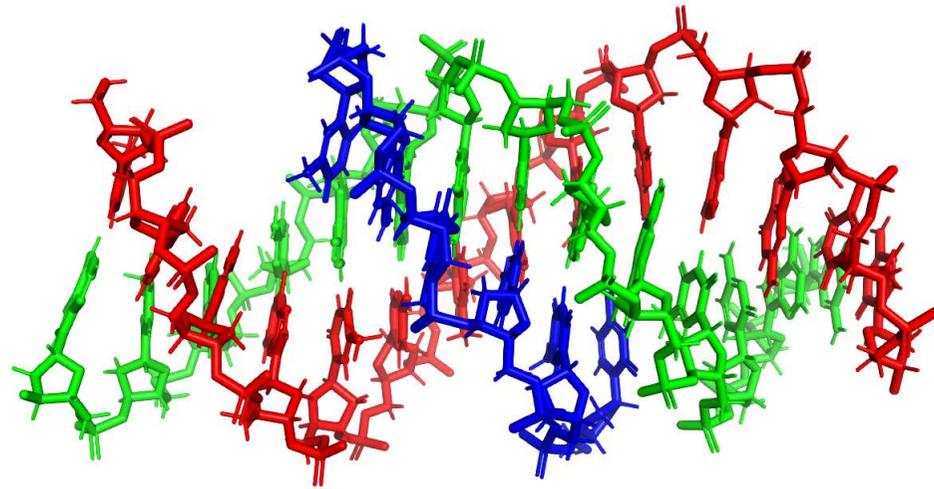
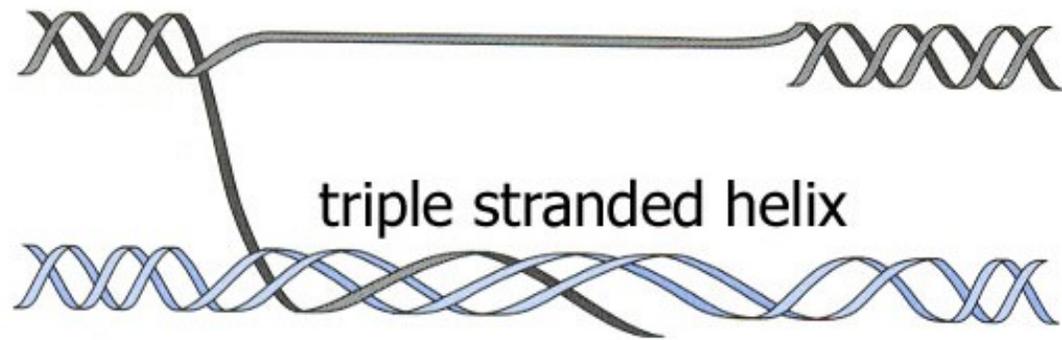


6. RecBCD encontra o sítio chi (na orientação correta), a atividade da exonuclease é inibida.
7. A extremidade 3' de fita simples estável é formada.
8. A recombinação é promovida no lado 5' do sítio chi.

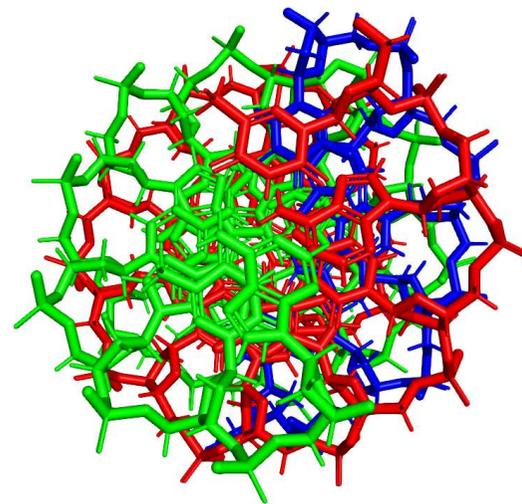
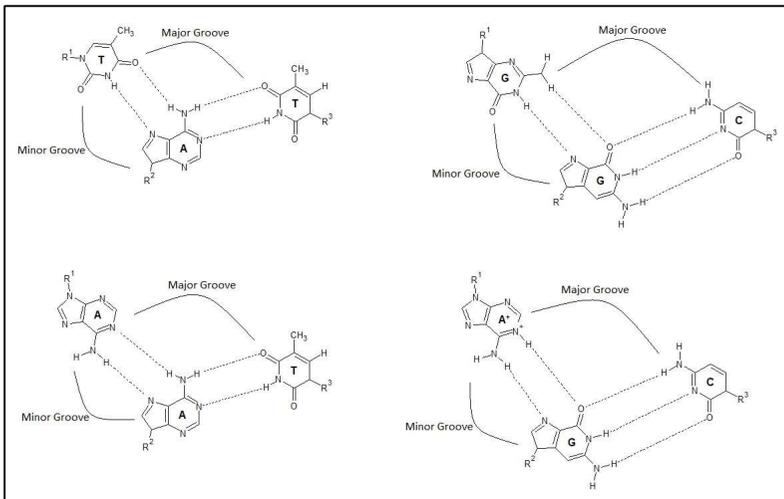


9. O ssDNA forma uma hélice de cadeia tripla.
10. RecA estabiliza a fita ssDNA



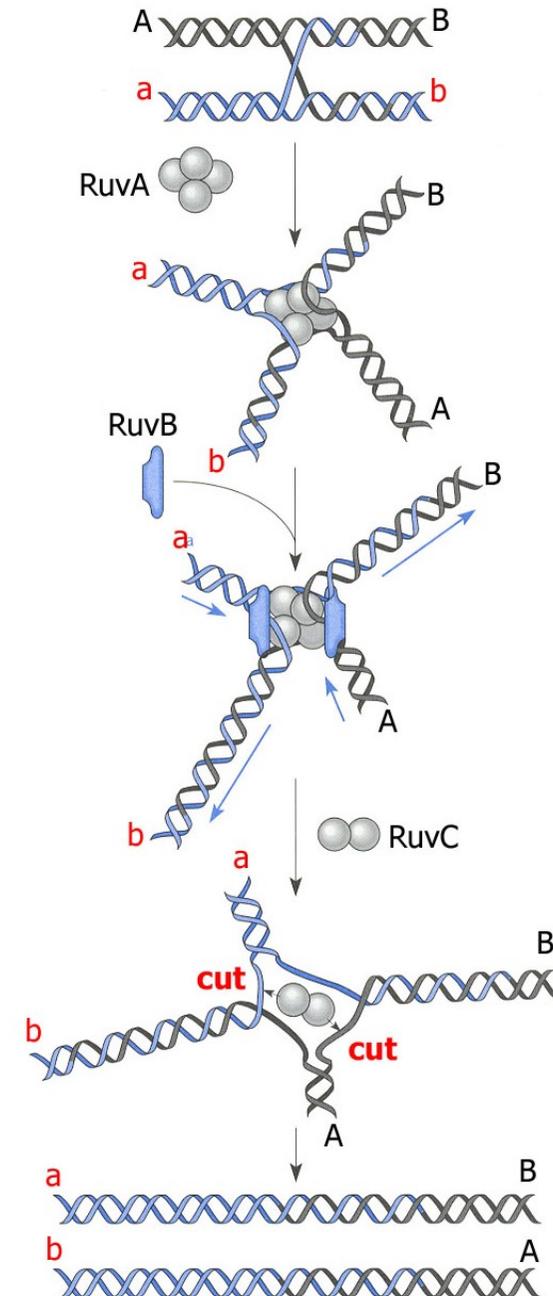


## Pareamento de Hoogstein



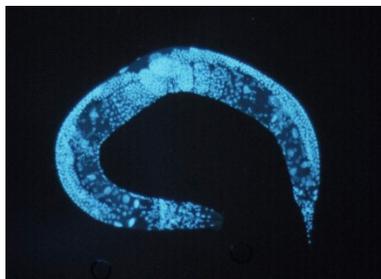
## As Proteínas RuvABC e Migração de Junções Holliday

1. A migração aumenta o comprimento dos heteroduplexes, permitindo a isomerização das Junções Holliday.
2. RuvA se liga e estabiliza a Junção Holliday
3. RuvB então se liga ao complexo RuvA/DNA
4. RuvAB e hidrólise de ATP impulsionam a migração da Junção Holliday
5. A isomerização provavelmente não requer proteínas ou energia.
6. RuvC se liga “resolve” Junções Holliday ao separar os dois fios cruzados.



## RNAs de interferência

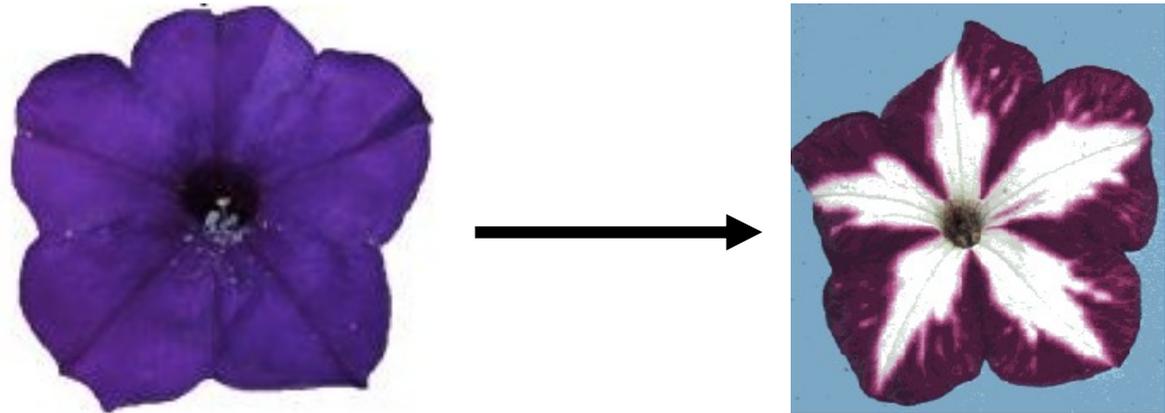
- ▣ RNA de interferência é um fenômeno em que dsRNA reprimem a síntese protéica pela degradação do mRNA.
- ▣ A degradação ocorre quando pequenos fragmentos de RNA poderão parear com outros mRNA em regiões internas complementares .
- ▣ O RNAi tem sido utilizado no estudo de perda de função de diversos organismos *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila*. Além disso, permite um screening genético verificando perda gênica e rápida interação com células de mamíferos.



## Fenômeno observado primeiro em petúnias

Tentativa de superexpressar Chalcona Sintetase (Pigmento de Antrocianina) em petúnias para tornar as flores mais escuras

Causou a perda de pigmento.



Chamado de co-supressão porque suprimiu a expressão de ambos genes: endógeno e transgene.

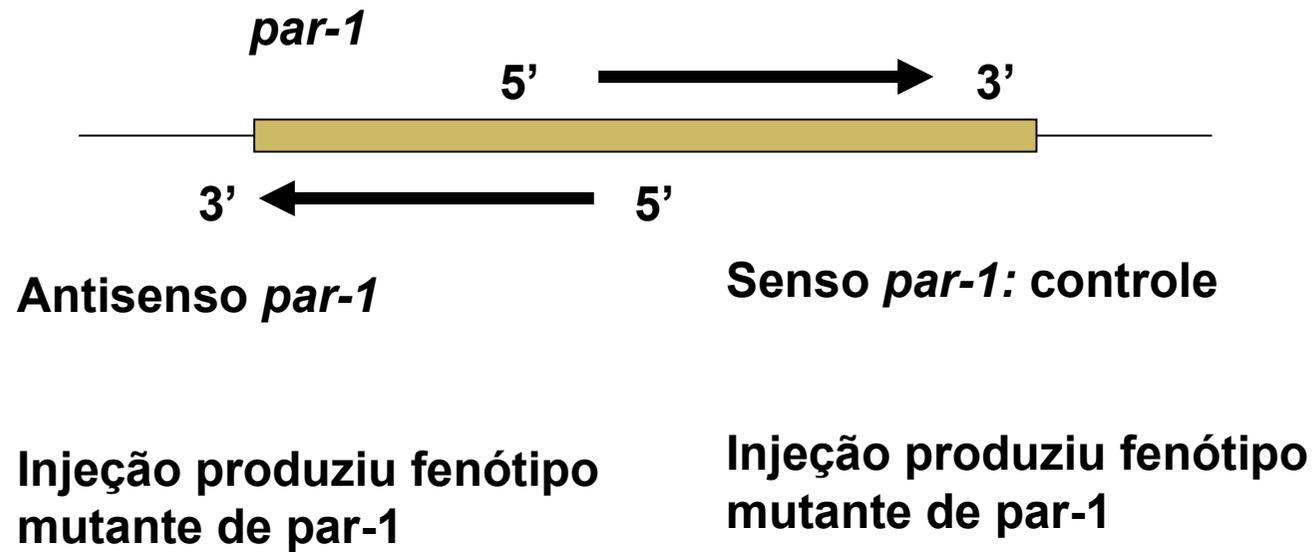
Dois mecanismos podem explicar o fenômeno mediado pelo transgêneo:

- Silenciamento gênico transcricional
- Silenciamento gênico pós-transcricional

mRNA é feito, mas degradado

Em 1995 Guo e Kemphues quiseram mostrar que haviam clonado o gene *par-1* de *Caenorhabditis elegans* (necessário para divisão normal do zigoto).

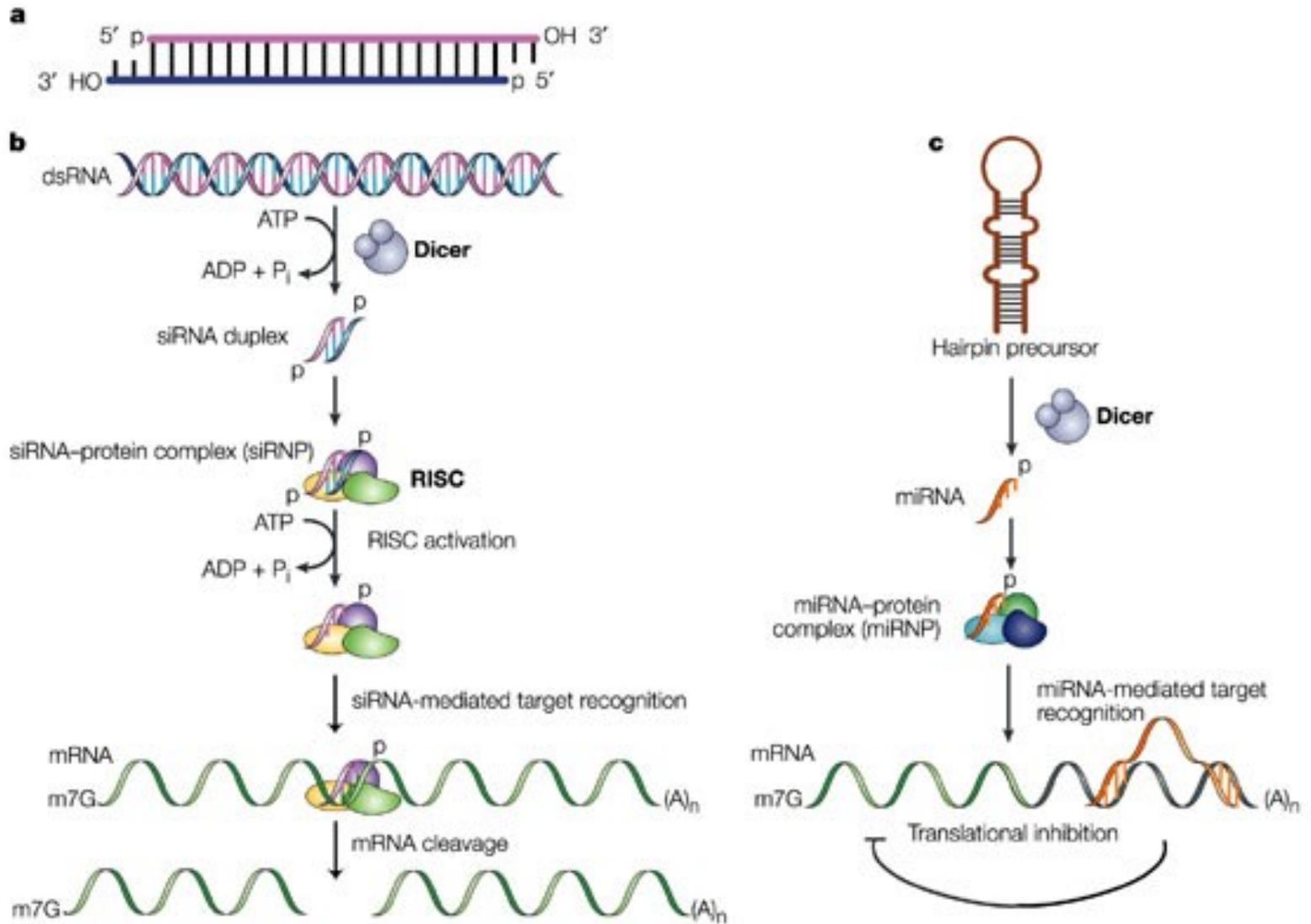
Usaram RNA antisense.



Em 1998 Andy Fire e Craig Mello mostraram que injeção de RNA dupla fita (dsRNA) é mais eficiente do que ssRNA (RNA fita simples).

Table 1 Effects of sense, antisense and mixed RNAs on progeny of injected animals				
Gene	segment	Size (kilobases)	Injected RNA	F <sub>1</sub> phenotype
<i>unc-22</i>				<i>unc-22</i> -null mutants: strong twitchers <sup>2a</sup>
<i>unc22A*</i>	Exon 21-22	742	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22B</i>	Exon 27	1,033	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type Wild type Strong twitchers (100%)
<i>unc22C</i>	Exon 21-22†	785	Sense + antisense	Strong twitchers (100%)
<i>fem-1</i>				<i>fem-1</i> -null mutants: femal (no sperm) <sup>3</sup>
<i>fem1A</i>	Exon 10†	531	Sense Antisense Sense + antisense	Hermaphrodite (98%) Hermaphrodite (>98%) Female (72%)
<i>fem1B</i>	Intron 8	556	Sense + antisense	Hermaphrodite (>98%)
<i>unc-54</i>				<i>unc-54</i> -null mutants: paralysed <sup>11</sup>
<i>unc54A</i>	Exon 6	576	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (100%) Wild type (100%) Paralysed (100%)§
<i>unc54B</i>	Exon 6	651	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (100%) Wild type (100%) Paralysed (100%)§
<i>unc54C</i>	Exon 1-5	1,015	Sense + antisense	Arrested embryos and larvae (100%)
<i>unc54D</i>	Promoter	567	Sense + antisense	Wild type (100%)
<i>unc54E</i>	Intron 1	369	Sense + antisense	Wild type (100%)
<i>unc54F</i>	Intron 3	386	Sense + antisense	Wild type (100%)
<i>hh-1</i>				<i>hh-1</i> -null mutants: lumpy-dumpy larvae <sup>16</sup>
<i>hh1A</i>	Exons 1-6	1,033	Sense Antisense Sense + antisense	Wild type (<2% lpy-dpy) Wild type (<2% lpy-dpy) Lpy-dpy larvae (>90%)
<i>hh1B</i>	Exons 1-2	438	Sense + antisense	Lpy-dpy larvae (>80%)
<i>hh1C</i>	Exons 4-6	299	Sense + antisense	Lpy-dpy larvae (>80%)
<i>hh1D</i>	Intron 1	697	Sense + antisense	Wild type (<2% lpy-dpy)
<i>myo-3</i> -driven GFP transgenes†				
<i>myo-3::NLS::gfp::lacZ</i>				
<i>gfpG</i>	Exons 2-5	730	Sense Antisense Sense + antisense	Makes nuclear GFP in body muscle Nuclear GFP-LacZ pattern of parent strain Nuclear GFP-LacZ pattern of parent strain Nuclear GFP-LacZ absent in 98% of cells
<i>lacZL</i>	Exon 12-14	830	Sense + antisense	Nuclear GFP-LacZ absent in >95% of cells
<i>myo-3::Mtls::gfp</i>				
<i>gfpG</i>	Exons 2-5	730	Sense Antisense Sense + antisense	Makes mitochondrial GFP in body muscle Mitochondrial-GFP pattern of parent strain Mitochondrial-GFP pattern of parent strain Mitochondrial-GFP absent in 98% of cells
<i>lacZL</i>	Exon 12-14	830	Sense + antisense	Mitochondrial-GFP pattern of parent strain

# Mecanismo geral de RNAi



# Aplicações

## ▣ Técnicas de BioMol:

- ▣ RNAs sintéticos podem ser introduzidos em culturas celulares podendo suprimir genes específicos de interesse.
- ▣ Efetivo em baixas cópias e altamente específico.

## ▣ Medicina:

- ▣ Utilizado nas terapias anti-virais em herpes tipo II
- ▣ inibição da expressão de oncogenes (divisão celular)
- ▣ redução da expressão de receptores protéicos contra HIV
- ▣ silenciamento da hepatite A e B
- ▣ doenças genéticas

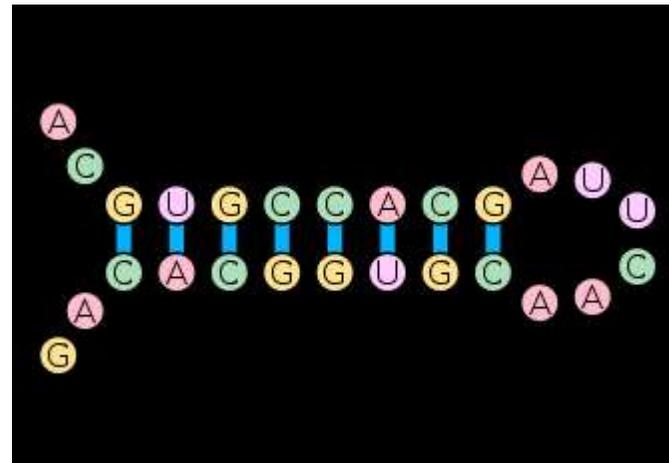
## ▣ Biotecnologia

- ▣ Diminuição da expressão de genes de plantas que não tenham um interesse econômico como toxicidade ou baixa produção.

## Tipos de RNAs de interferência

- ▣ Existem dois tipos de RNAi :
- ▣ **miRNA ou microRNA:** são produtos da transcrição gênica em eucariotos com cerca de 70 pb, que possuem regiões internas autocomplementares , capazes de se parear formando um *hairpin* (grampo de cabelo).

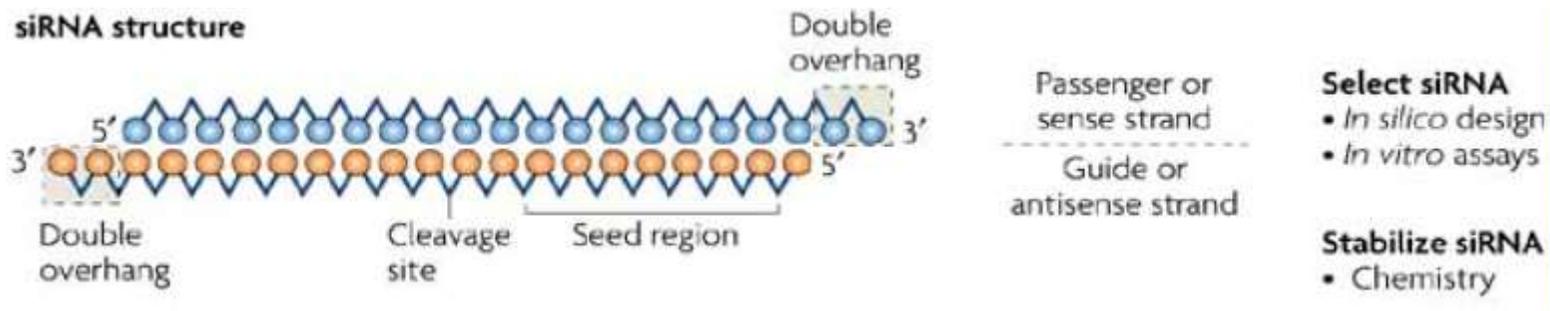
Funções: conversão de Adenosina-> inosina



- ▣ **siRNA ou *small interfering* RNA:** são derivados de longas moléculas de RNA dupla fita de origem exógena (como aquelas provenientes de vírus de RNA).

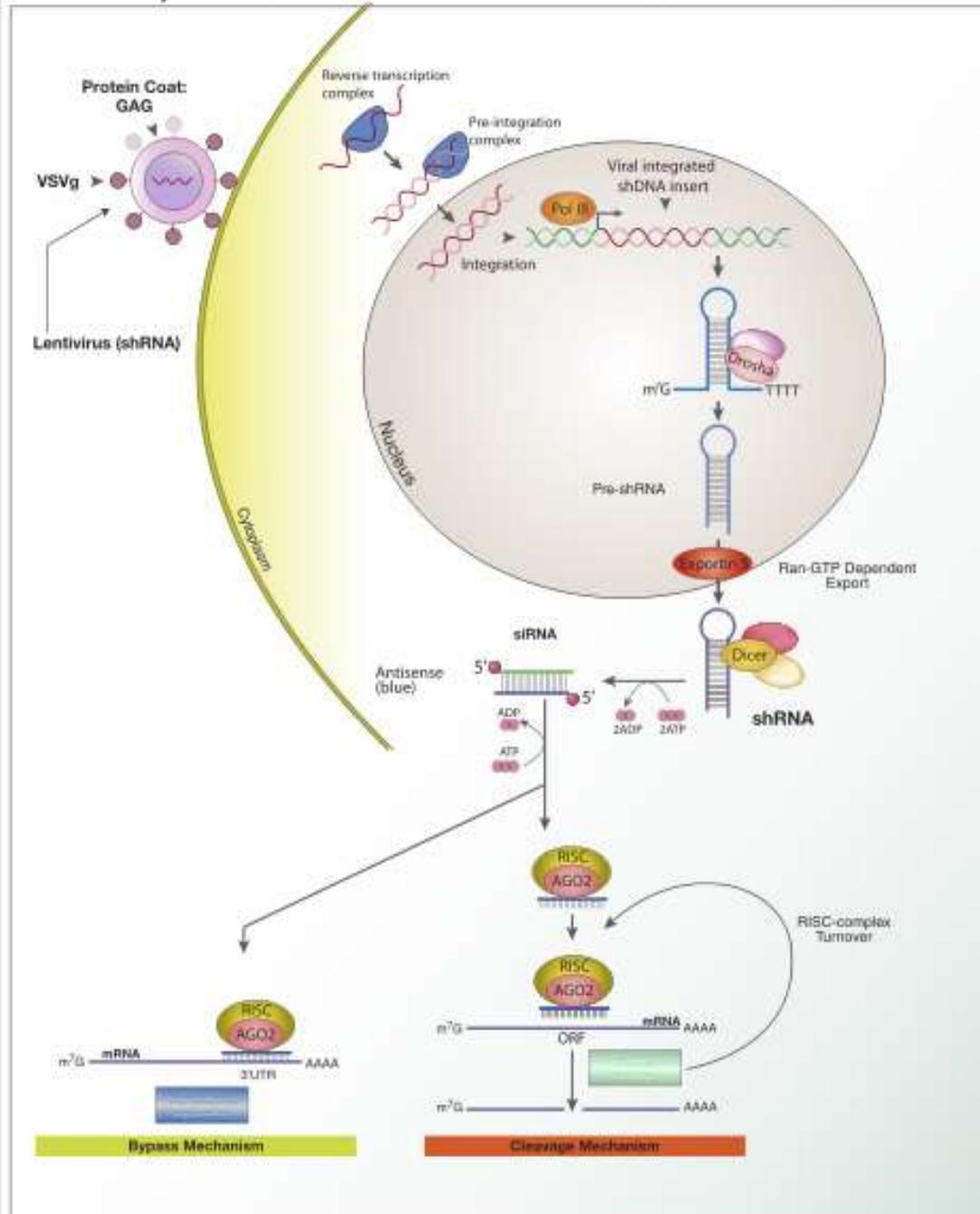
## Mecanismo molecular de ação

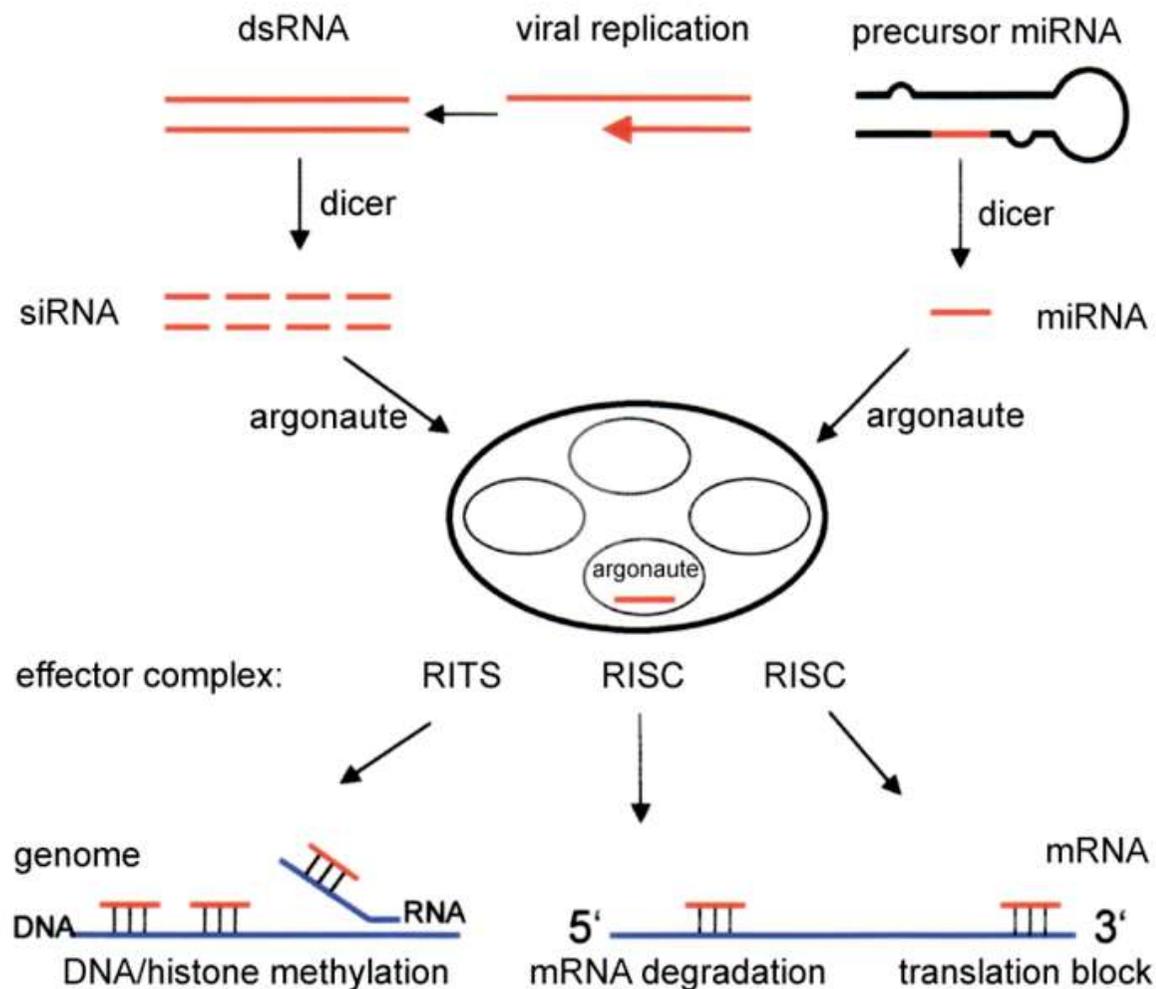
1. O RNA dupla fita é reconhecido pela RNase III - DICER gerando fragmentos de 21-23 nucleotídeos.
2. São geradas duas moléculas RNAss : *passenger* e fita guia. A *passenger* é degradada e o RNAss guia é incorporada ao complexo ribonucleoprotéico conhecido como RISC (*RNA-induced silencing complex*), a qual encontra fitas complementares de mRNA específicos, as quais degradam o RNAm alvo no centro de sua seqüência.



O mecanismo melhor estudado é o pós-transcricional, onde após o pareamento da do RNAi ao RNAm é induzida clivagem pela Argonauta, um componente catalítico do complexo RISC.

Lentiviral Delivery of shRNAs and the Mechanism of RNAi Interference in Mammalian Cells.





A enzima *Dicer* corta RNA de dupla fita, de modo a formar siRNA ou miRNA.

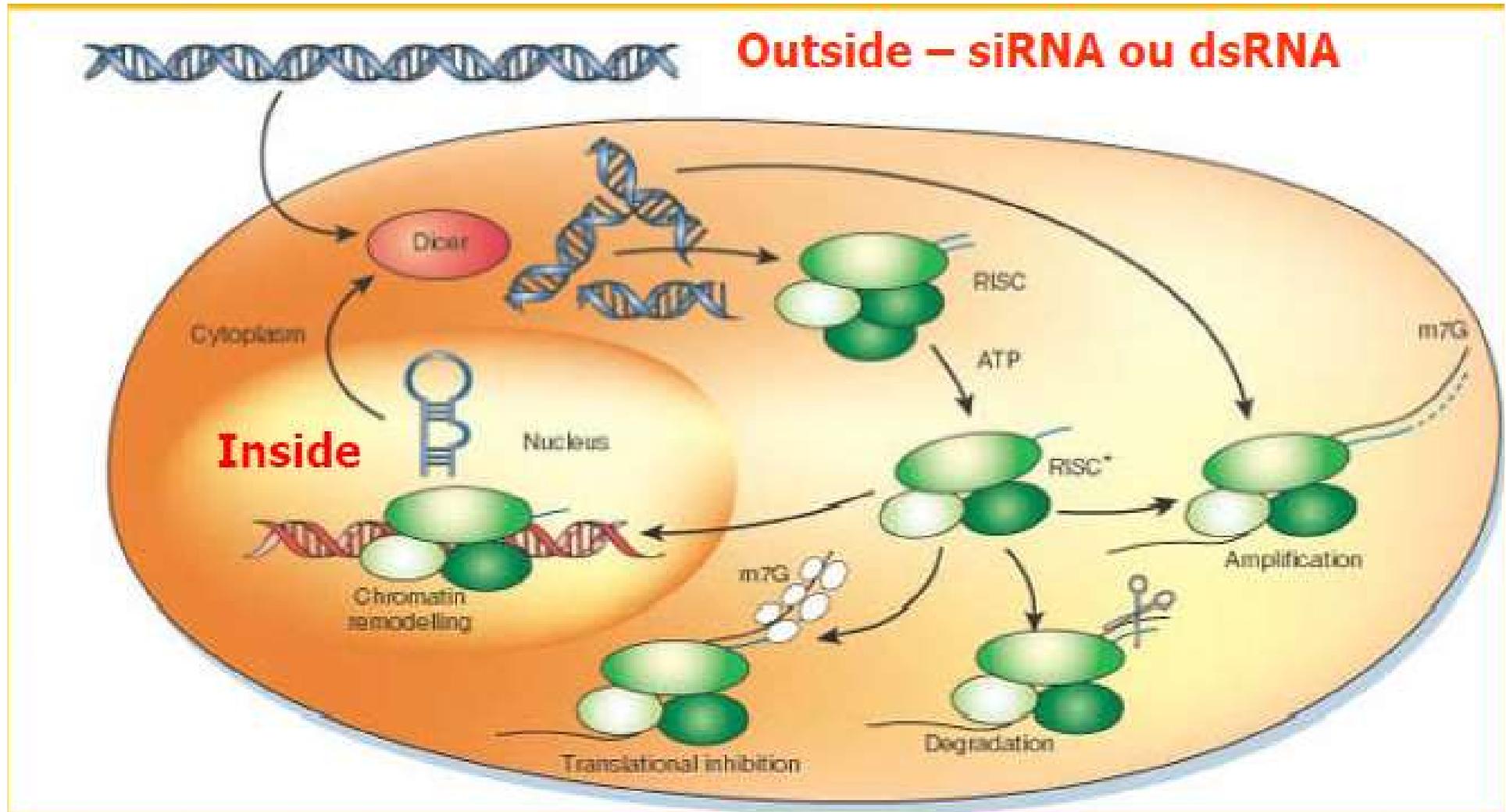
Estes RNAs processados são incorporados no complexo RISC, o qual tem como alvo moléculas de RNA mensageiro, onde atuam impedindo o processo de tradução

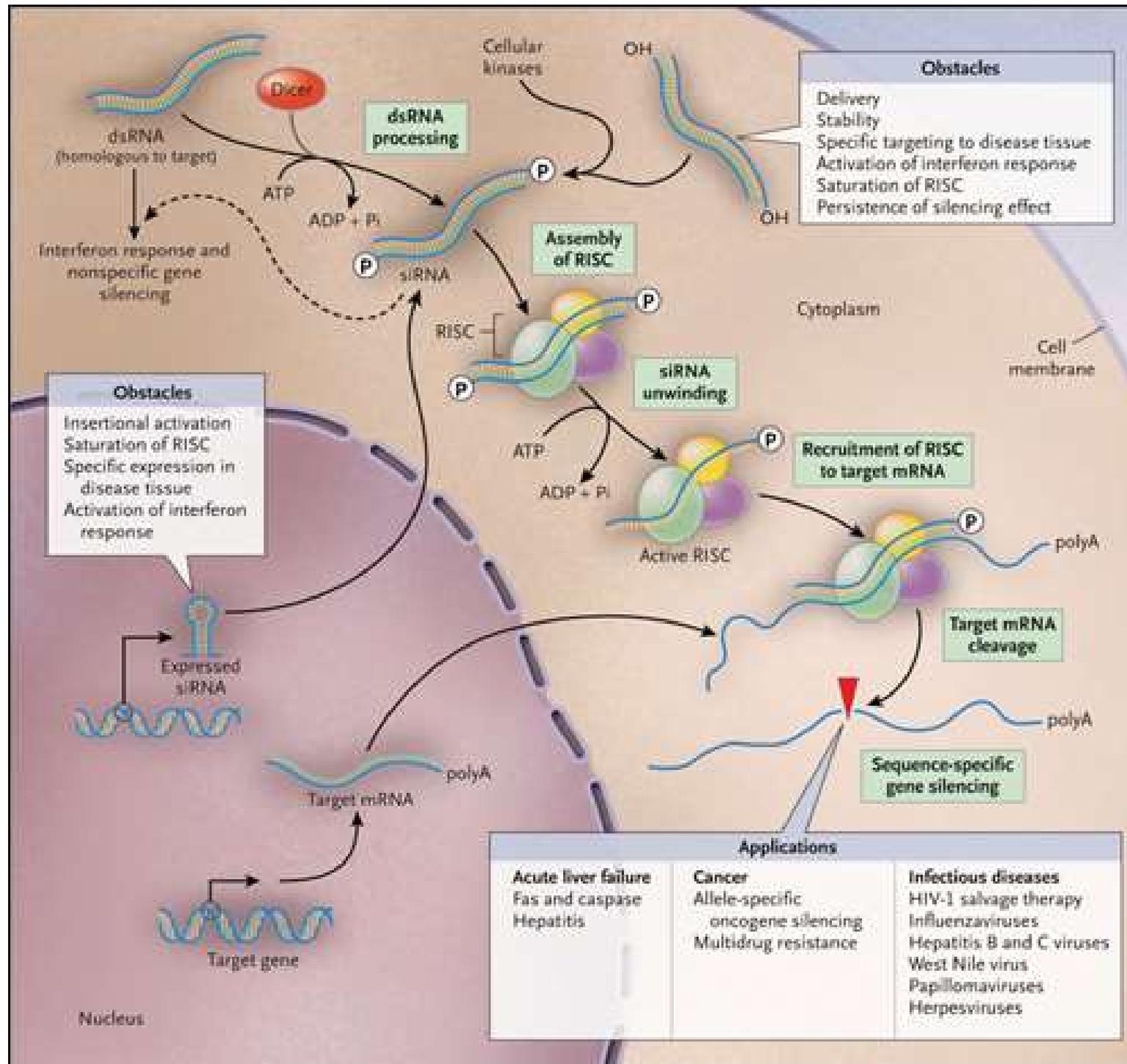
## RNA exógeno e RNA endógeno

- RNA exógeno - genoma RNA viral: o RNA é rapidamente importado pra dentro da célula e clivado em pequenos fragmentos pela DICER.
- RNA endógeno: o transcrito primário produzido no núcleo na forma de grampo, onde é levado ao citoplasma pela DICER.

**Assim, ambos os RNAs exógeno e endógenos são convertido ao complexo RISC.**

# RNA exógeno e RNA endógeno





**Obstacles**

- Delivery
- Stability
- Specific targeting to disease tissue
- Activation of interferon response
- Saturation of RISC
- Persistence of silencing effect

**Obstacles**

- Insertional activation
- Saturation of RISC
- Specific expression in disease tissue
- Activation of interferon response

**Applications**

<p><b>Acute liver failure</b> Fas and caspase Hepatitis</p>	<p><b>Cancer</b> Allele-specific oncogene silencing Multidrug resistance</p>	<p><b>Infectious diseases</b> HIV-1 salvage therapy Influenzaviruses Hepatitis B and C viruses West Nile virus Papillomaviruses Herpesviruses</p>
---	--	---

**Definição de terapia gênica:**

**“transferência de material genético novo para células de um indivíduo resultando em benefício terapêutico”**

**Há vinte anos a Terapia Genética, como capacidade de intervir na saúde humana, era tida como a**

**5ª Revolução da Medicina!!!**

**(Vacinas, esterilização, antibióticos e anestésias)**

## **Alvos da Terapia Gênica:**

### **Doenças genéticas clássicas:**

**Imunodeficiência (adenosina desaminase)**

**Fibrose cística (Regulador CF de Cl)**

**Hemofilias A e B (Fatores VIII e IX)**

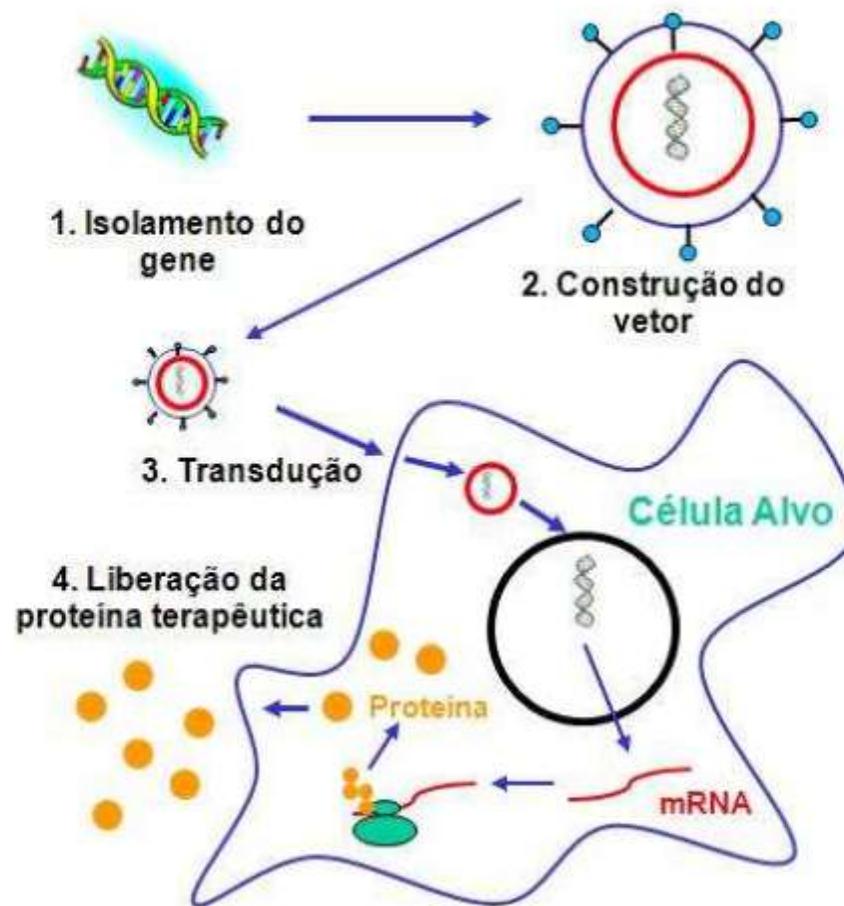
### **Doenças genéticas adquiridas:**

**Câncer,**

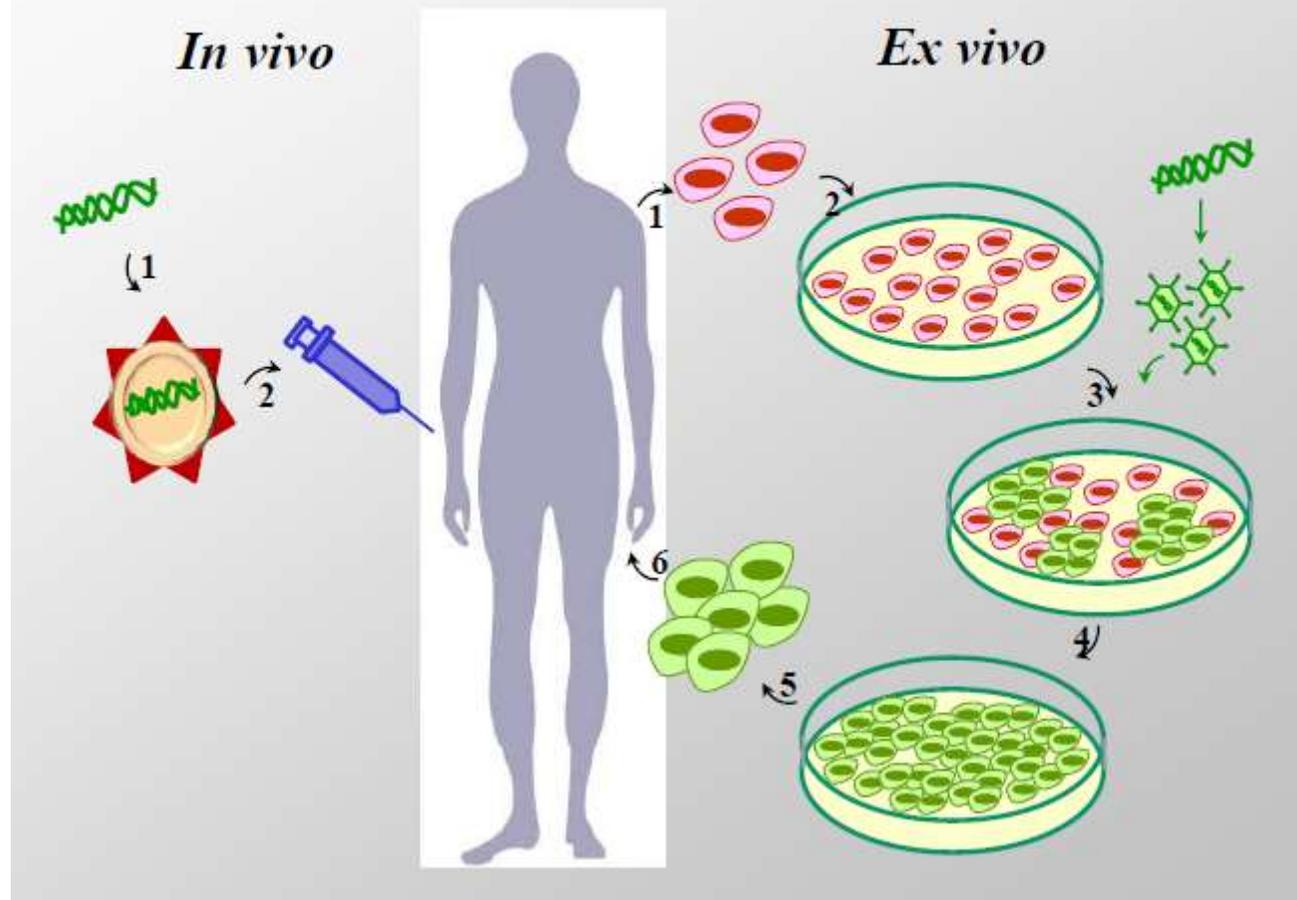
**AIDS**

**infecções com outros vírus (gripe- H1N1, dengue)**

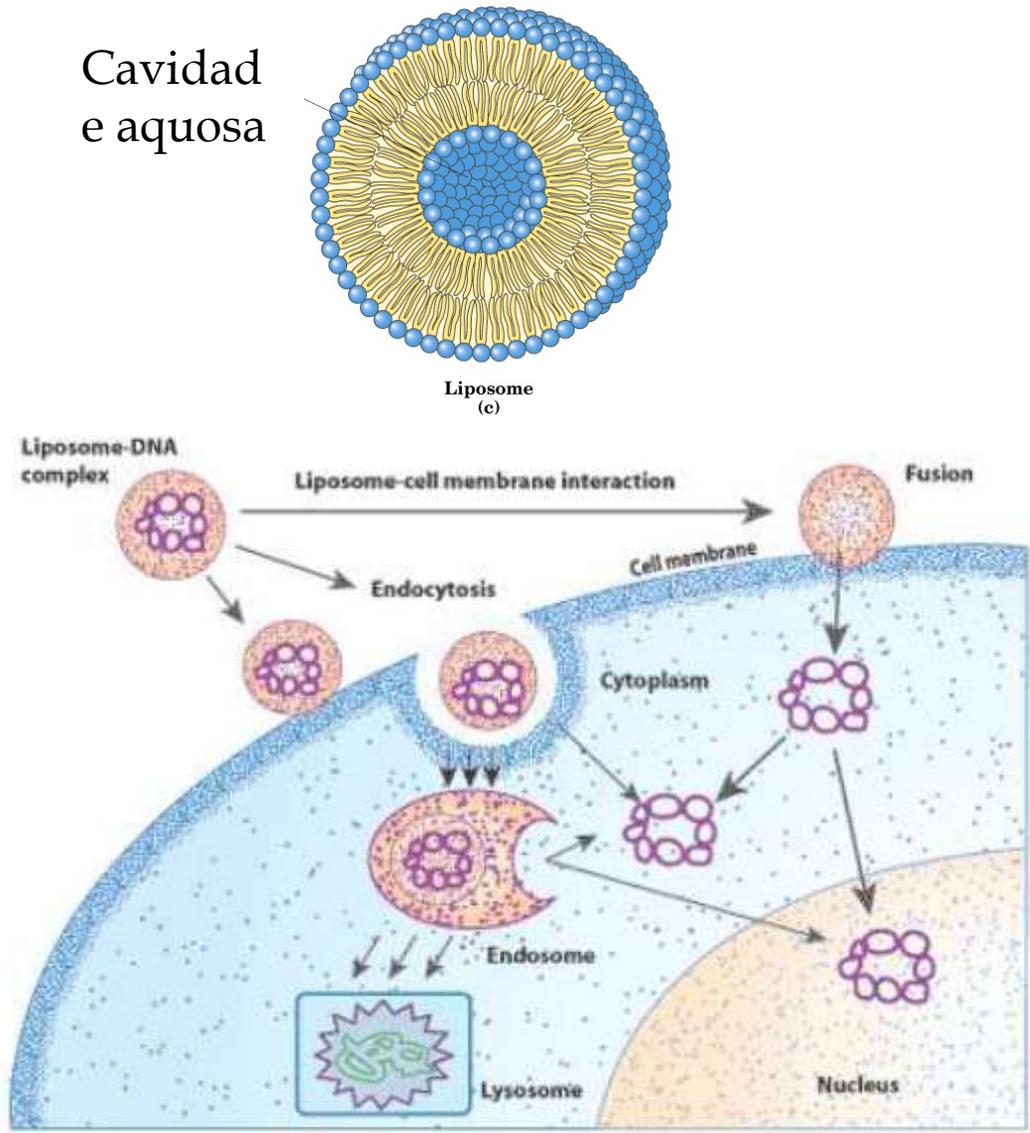
# Terapia Gênica... Introduzindo material genético dentro das células:



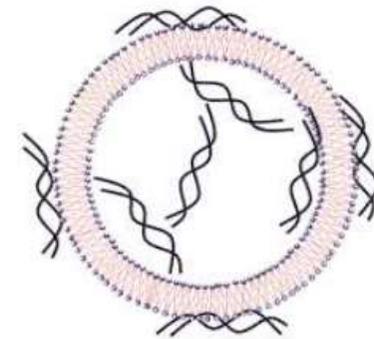
# Estratégias de terapia gênica



# Estratégia para introdução de DNA em células: Lipossor

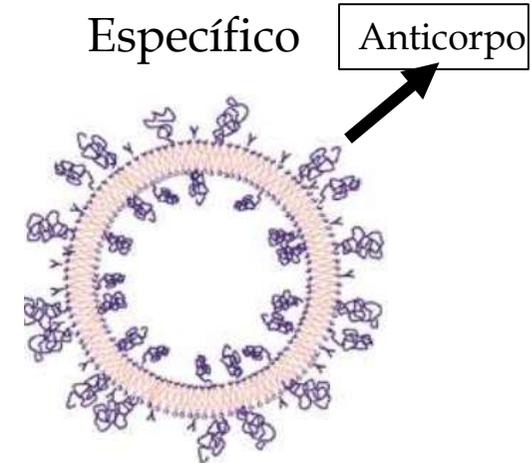


Inespecífico



Específico

Anticorpo



# Terapia gênica: Gene de Adenosina deaminase (ADA)



# Terapia gênica: Gene de Adenosina deaminase (ADA)

1990 equipe liderada pelo Dr. French Anderson-

Terapia *ex vivo* - linfócitos de duas crianças



**Resultados:**

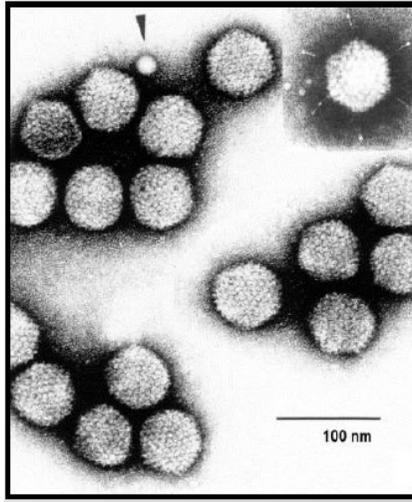
**As crianças começam a recuperar o sistema imunológico**

**← Ashanti de Silva →**

**Projeto similar foi feito para 10 crianças X-linked SCID, com recuperação do sistema imunológico!**



# Estratégia para introdução de DNA em células: Adenoví

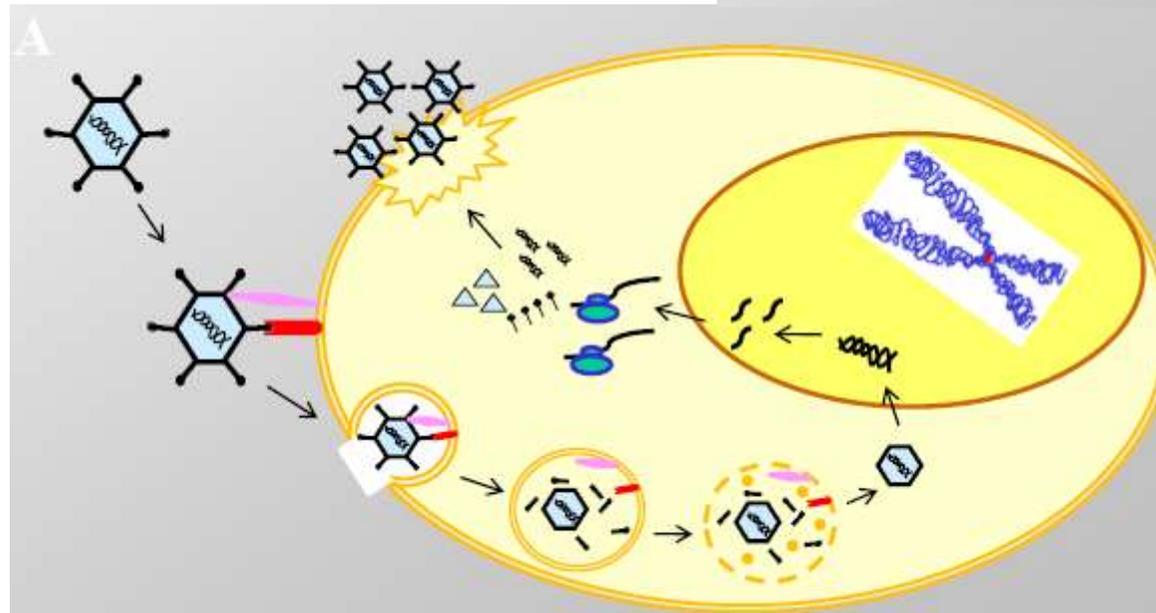


## Vantagens dos adenovírus recombinantes:

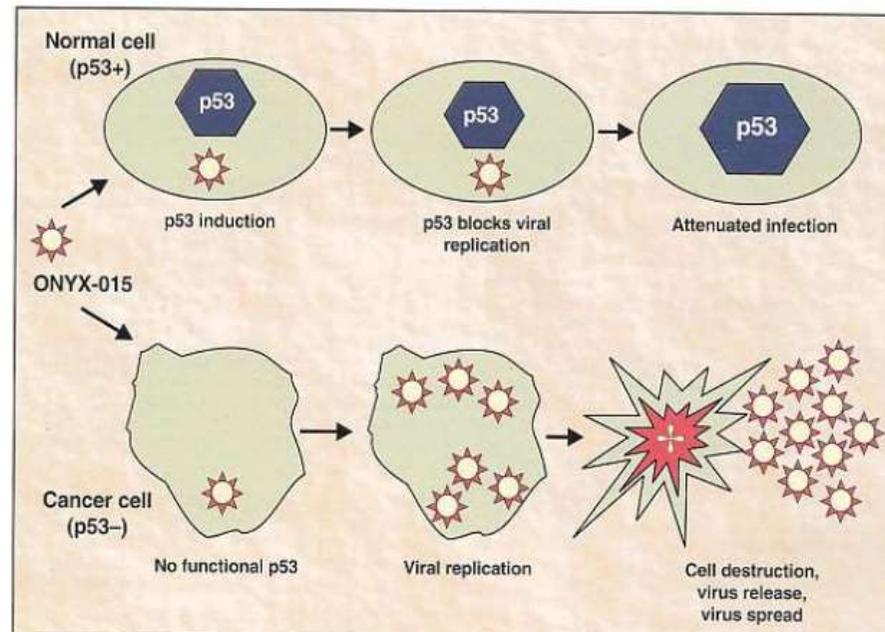
- \*Alto título viral.
- \*Infecta uma grande variedade de células.
- \*Se mantém epissomal (não integra no genoma celular).

## Desvantagens:

- Expressão Transiente (qual é o problema?)
- Forte resposta imune!
- Permite apenas uma aplicação (se tanto).



# Gendicine: primeiro remédio de terapia gênica aprovado para uso clínico. China, 2004



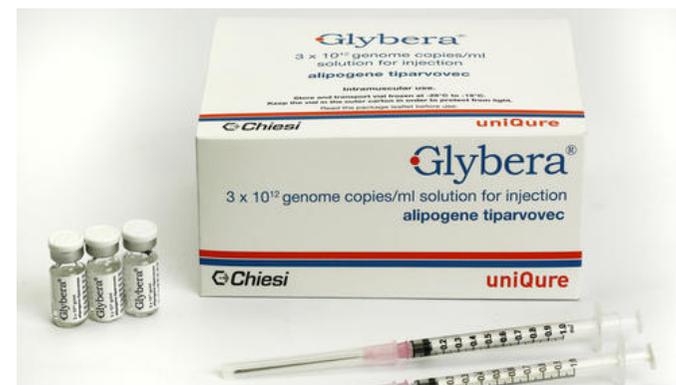
**Como é a terapia: o p53 ajuda no processo de morte da célula tumoral, aumentando a eficiência do tratamento.**

# Glybera: primeiro remédio de terapia gênica aprovado para uso clínico no ocidente

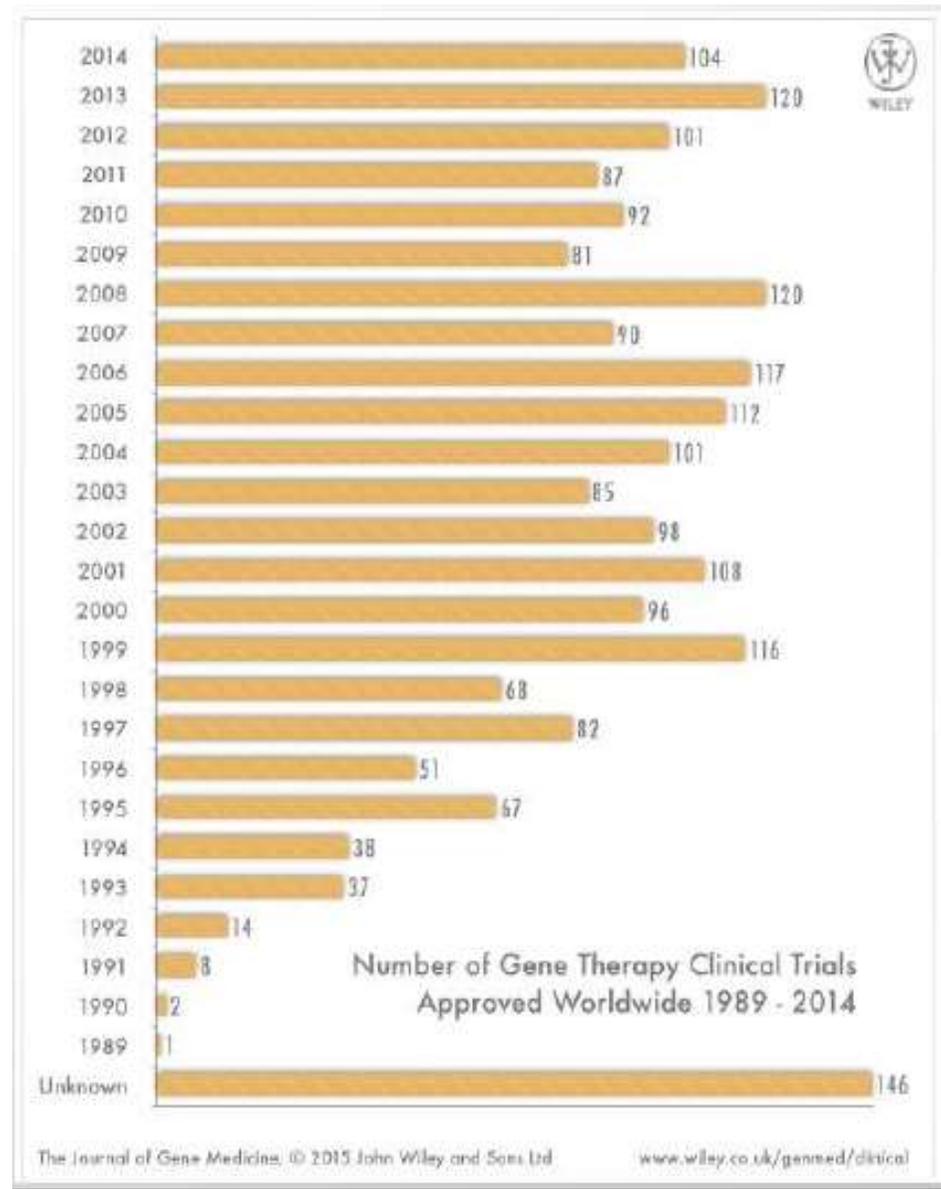
Na cura de “lipoprotein lipase deficiency” (LPLD)!!

A ausência dessa lipase (LPL) causa aumento de gordura no sangue, causando episódios de pancreatite aguda.

Como é a terapia: rAAV carregando o gene LPL, sendo aplicado (série de injeções) no músculo da perna..... Pacientes têm melhoras rápidas no nível de gordura e menor frequência de pancreatite.



# Evolução de ensaios clínicos de terapia gênica.



# A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity

Science 17 Aug 2012:

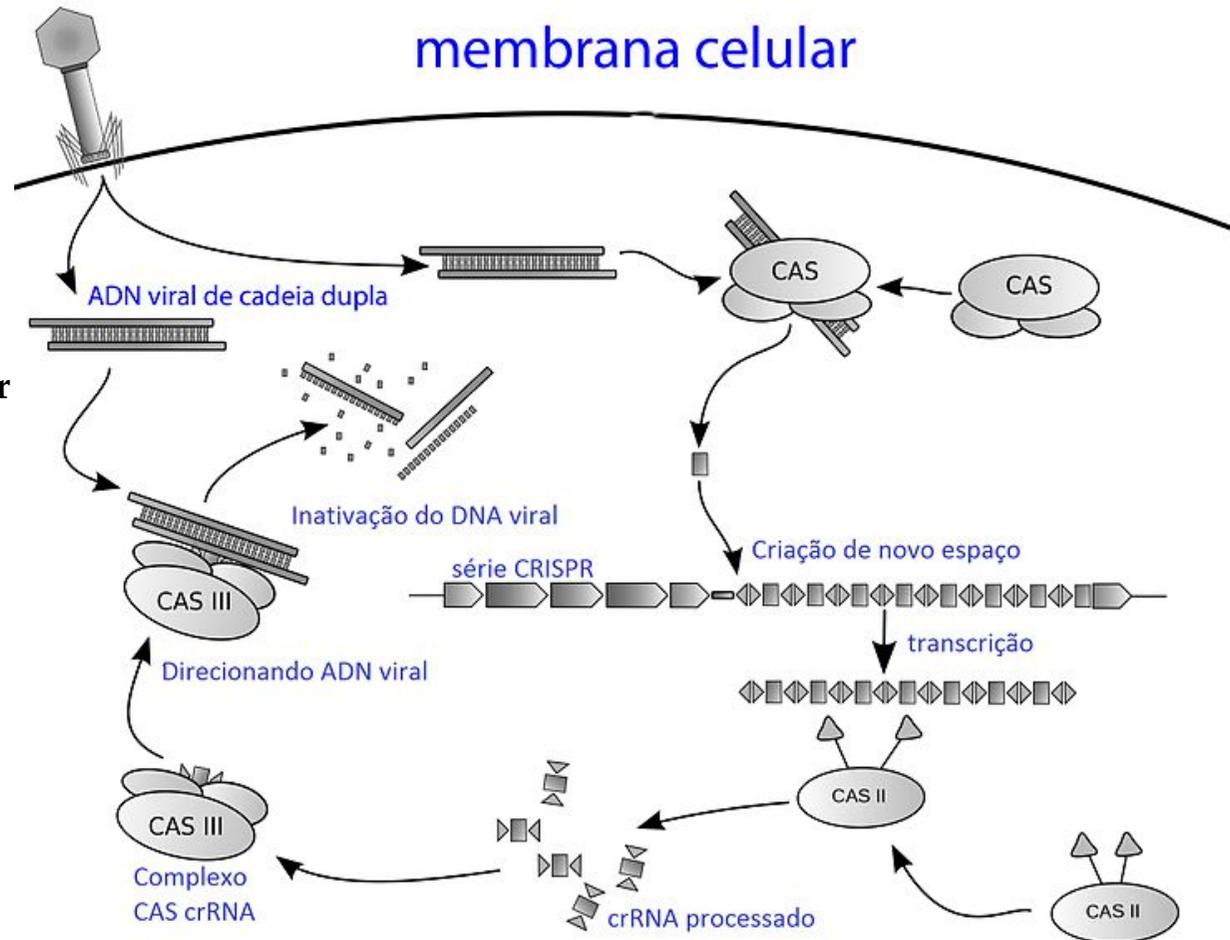
Martin Jinek<sup>1,2,\*</sup>, Krzysztof Chylinski<sup>3,4,\*</sup>, Ines Fonfara<sup>4</sup>, Michael Hauer<sup>2,†</sup>, Jennifer A. Doudna<sup>1,2,5,6,‡</sup>, Emmanuelle Charpentier<sup>4,‡</sup>



Emmanuelle Charpentier



Jennifer Doudna



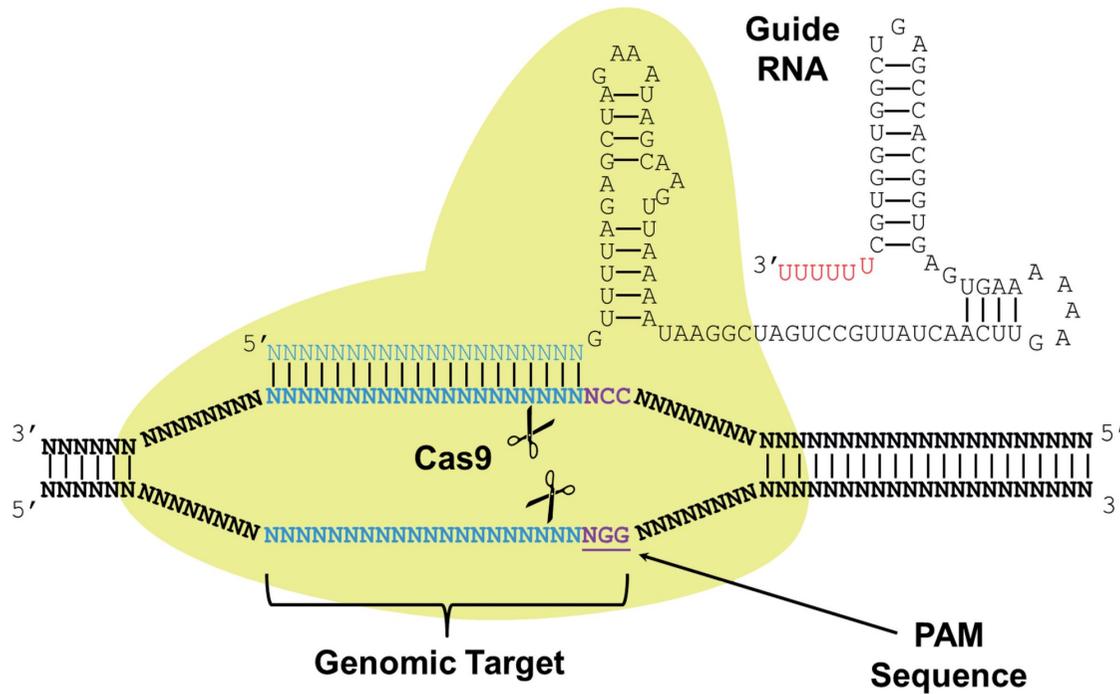
# Repetições CRISPR

*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

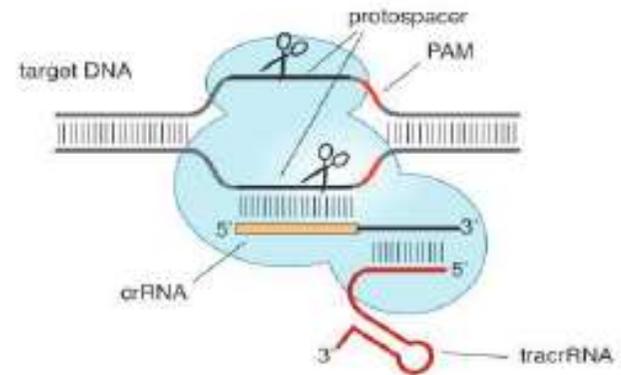
- CRIS-PRs são componentes de um sistema de defesa antiviral em bactéria
- Tamanhos das unidades de repetição varia de 24 a 47 pb.
- Cas9 gene (CRISPR-associated): sistema CRISPR da bactéria tipo II de *Streptococcus pyogenes*.
- Cas9 endonuclease forma complexo com o sítio alvo e o RNA guia

<https://www.youtube.com/watch?v=2pp17E4E-O8>

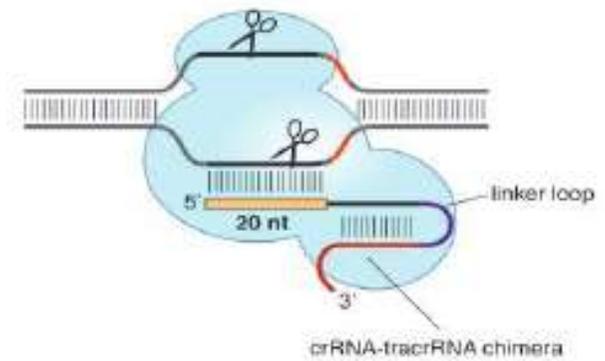
# Como funciona o CRISPR/Cas9?



Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex

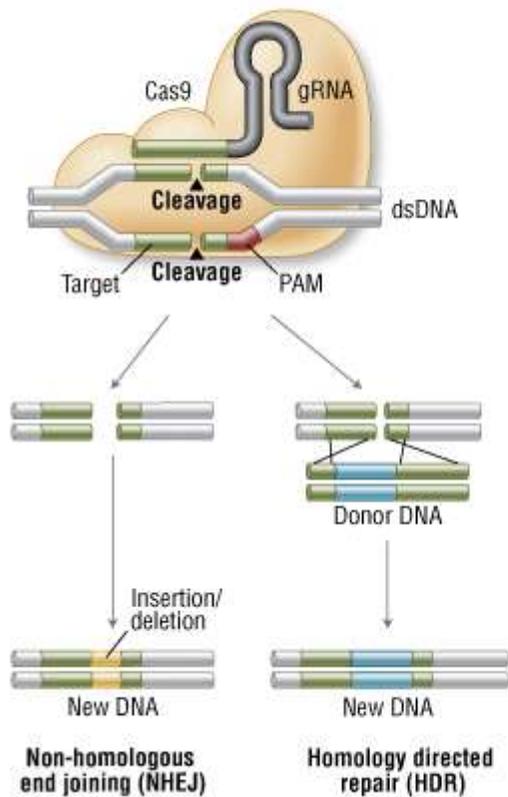


Cas9 programmed by single chimeric RNA

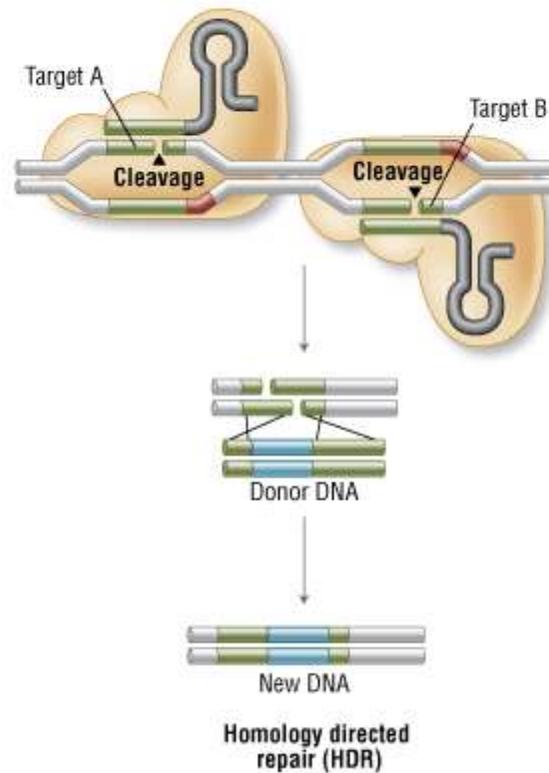


# Aplicações da técnica de CRISPR/Cas9?

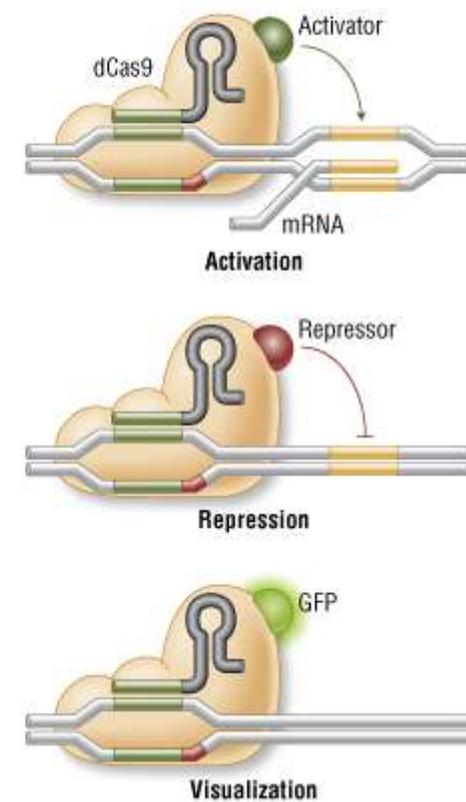
A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



B. Genome Engineering By Double Nicking With Paired Cas9 Nickases



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



# Vantagens da técnica

- Simplicidade no desenho do alvo: formação do complexo ribonucleotídeo e não em proteína/DNA
- Eficiente
- Mutações podem ser introduzidas em múltiplos genes ao mesmo tempo.
- Interesse econômico em reduzir tempo e \$\$ em criar camundongos geneticamente modificados (2-3 anos, U\$100.000)

# Desvantagem da técnica

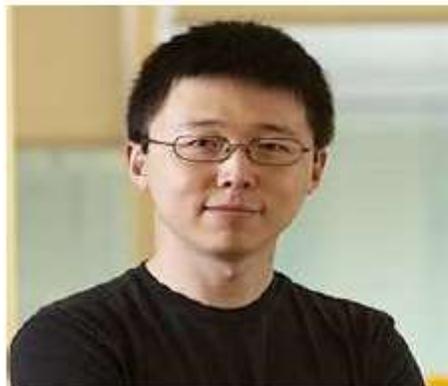
- Introdução de mutações a *loci* não-específicos homólogos semelhantes, mas não idênticos, aos sítios alvos.

# RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9



Le Cong,<sup>1,2\*</sup> F. Ann Ran,<sup>1,4\*</sup> David Cox,<sup>1,3</sup> Shuailiang Lin,<sup>1,5</sup> Robert Barretto,<sup>6</sup> Naomi Habib,<sup>1</sup> Patrick D. Hsu,<sup>1,4</sup> Xuebing Wu,<sup>7</sup> Wenyan Jiang,<sup>8</sup> Luciano A. Marraffini,<sup>8</sup> Feng Zhang<sup>1†</sup>

03 January 2013;



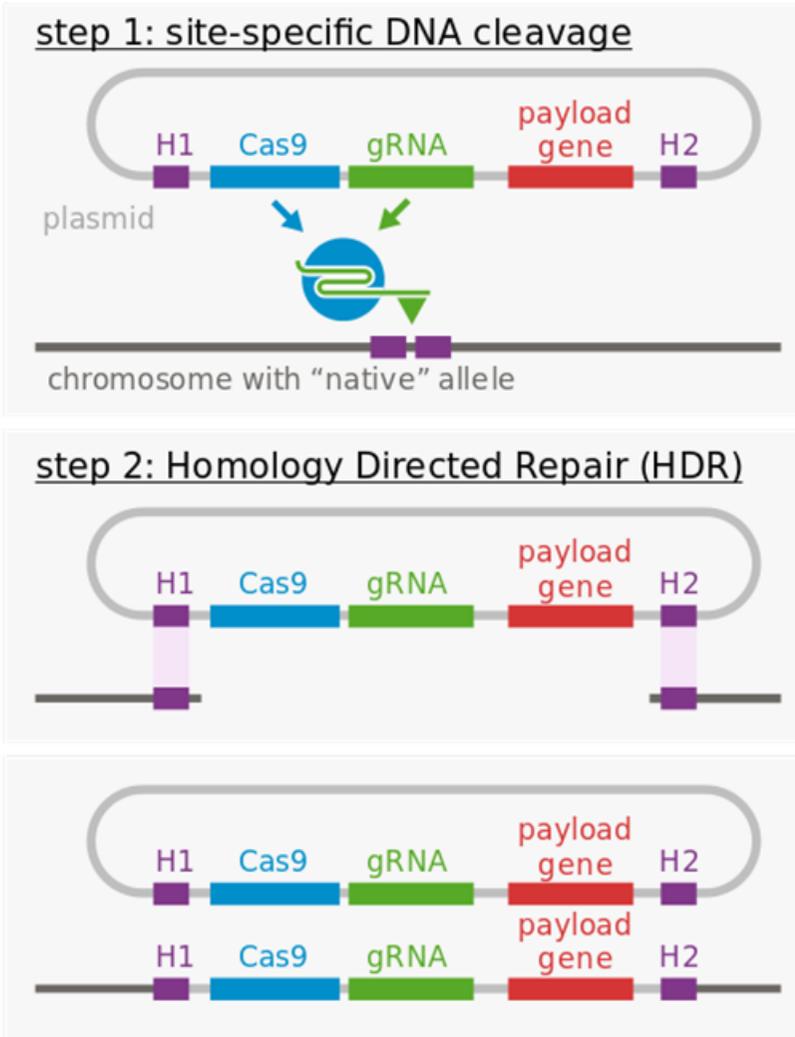
indels in human *EMX1* locus

WT	5' - . . GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG - AAGAAGGGGCTC . . - 3'
D1	GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG -- AGAAGGGGCTC
+1	GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG AAGAAGGGGCTC
D2	GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG --- GAAGGGGCTC
D3	GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG ---- AAGGGGCTC
D6	GGAGGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAG ----- GGCTC
m1, D6	GGAGGAAGGGCCTGAG C CCGAGCAGAAG ----- GGCTC

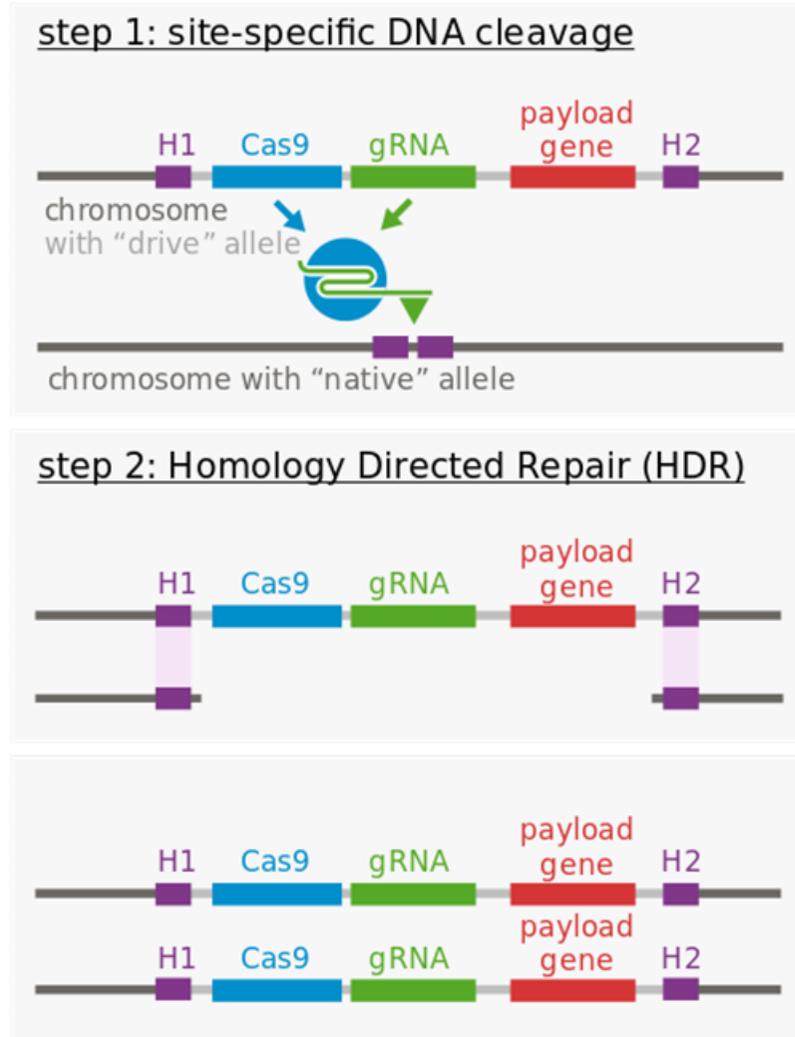


# CRISPR/Cas9 – Gene Drive

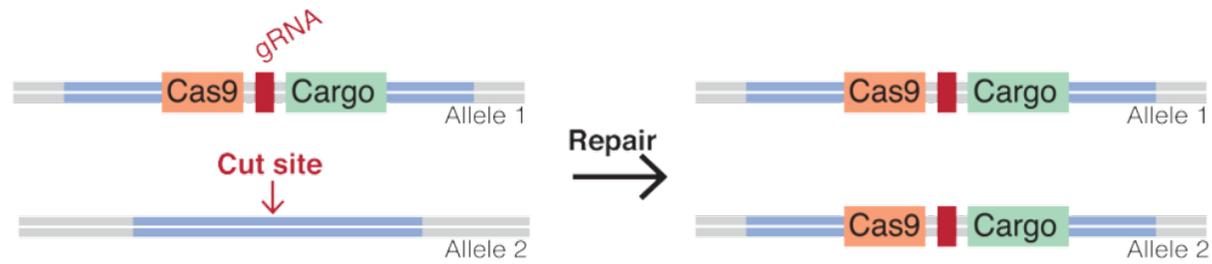
exogeneous insertion



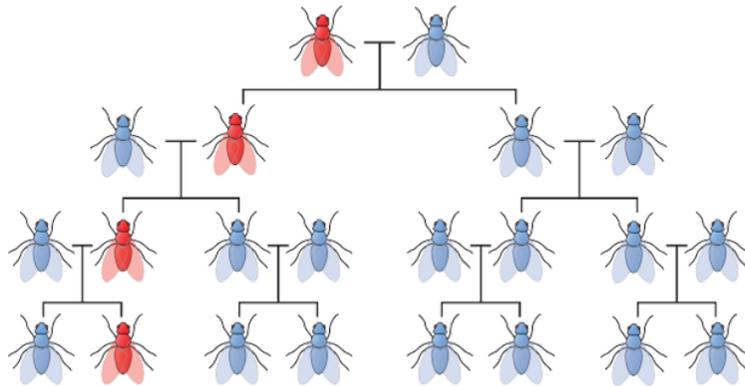
propagation after sexual reproduction



# CRISPR/Cas9 - Gene Drive

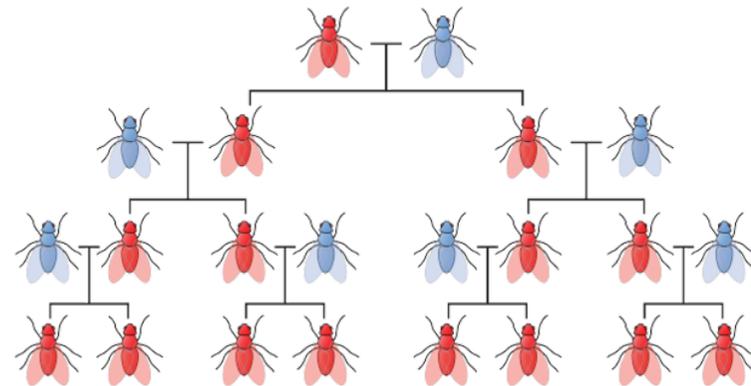


Normal inheritance



Altered gene does not spread

Gene drive inheritance



Altered gene is always inherited

## **CRISPR/CAS9**

**Problemas éticos....**

**Devemos usar em humanos? Todo e qualquer gene?**

**Em embriões humanos?**

**Plantas deixariam de ser transgênicas?**

**GENE DRIVEN em mosquitos?**

**Outros organismos?**