

Engenharia de genomas  
(tecnologia CRISPR-Cas9)  
e  
RNA de interferência (RNAi)

**Prof. Eduardo Moraes Rego Reis**  
**Instituto de Química – USP**

**QBQ 1354**  
**Química noturno**

- **Engenharia de Genomas**

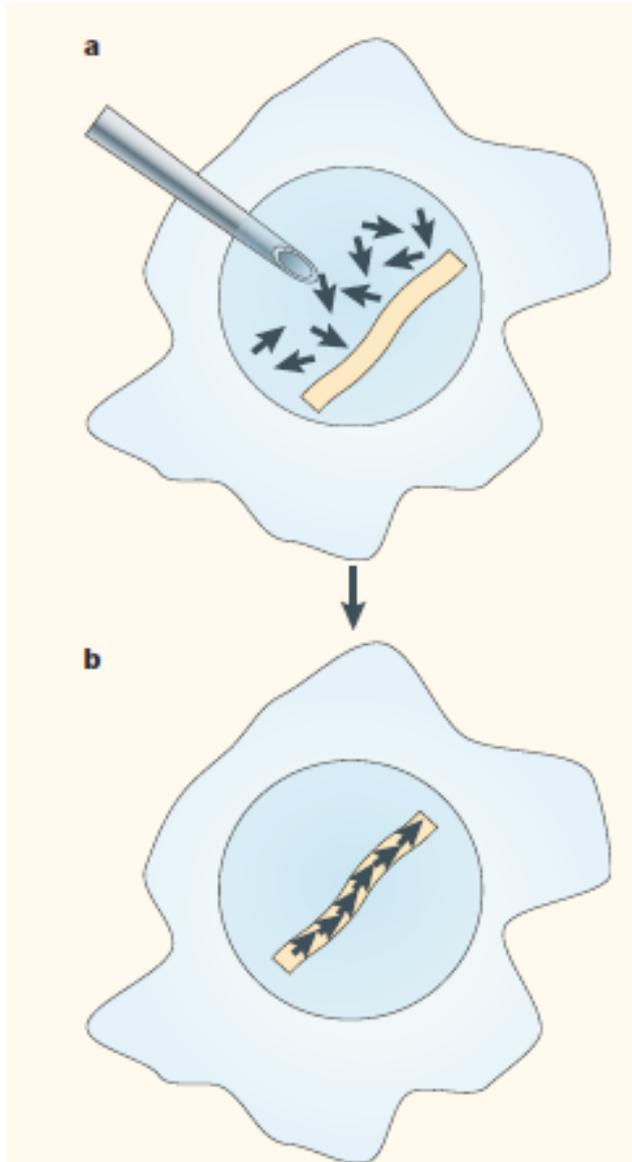
- Modificar ou editar diretamente a sequência de DNA (genoma) do organismo



# Qual o objetivo de modificar/editar genomas

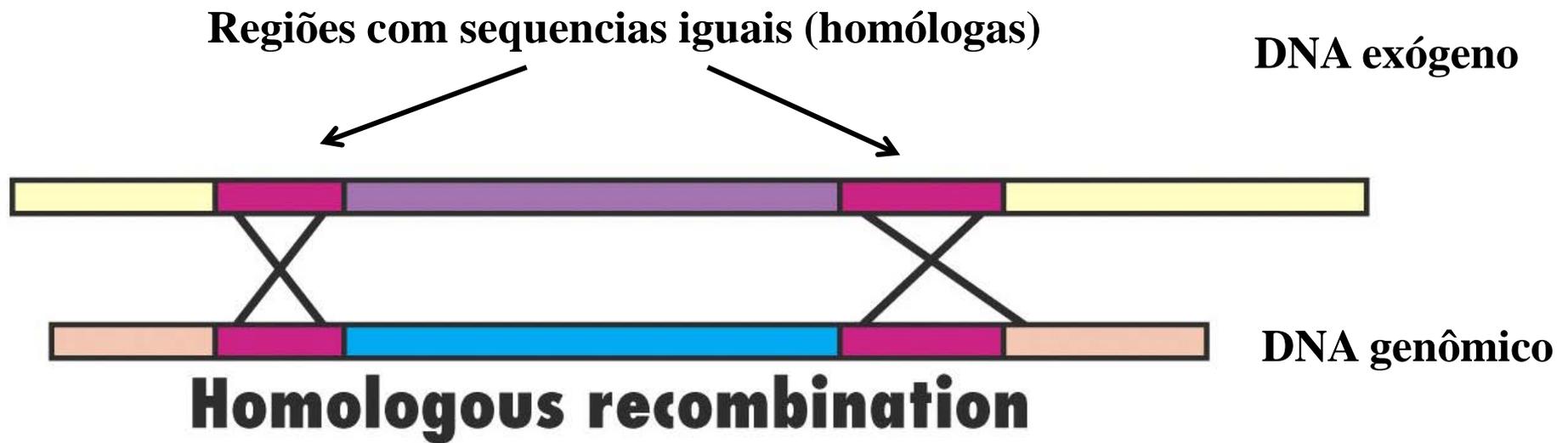
- Perturbação do fenótipo normal
- Investigar função de sequências no genoma (genes, promotores, elementos regulatórios)
- Potencial de aplicação terapêutica

Sabe-se que:

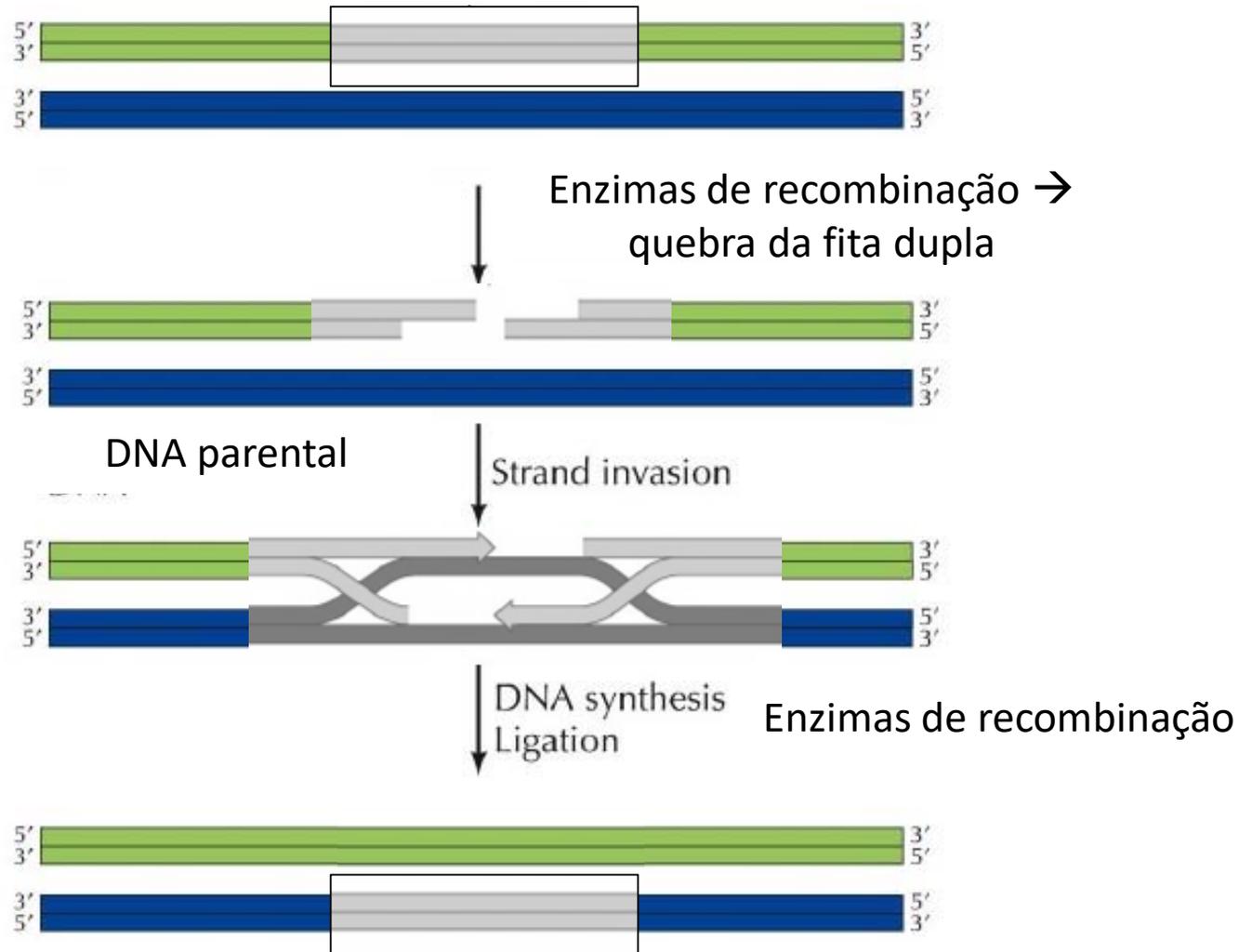


Injeção de DNA exógeno (ex: plasmídeo linearizado) diretamente no núcleo de células em cultura resulta na formação de concatâmeros e integração no genoma (descoberta de 1977-1980)

A integração ocorre por recombinação homóloga

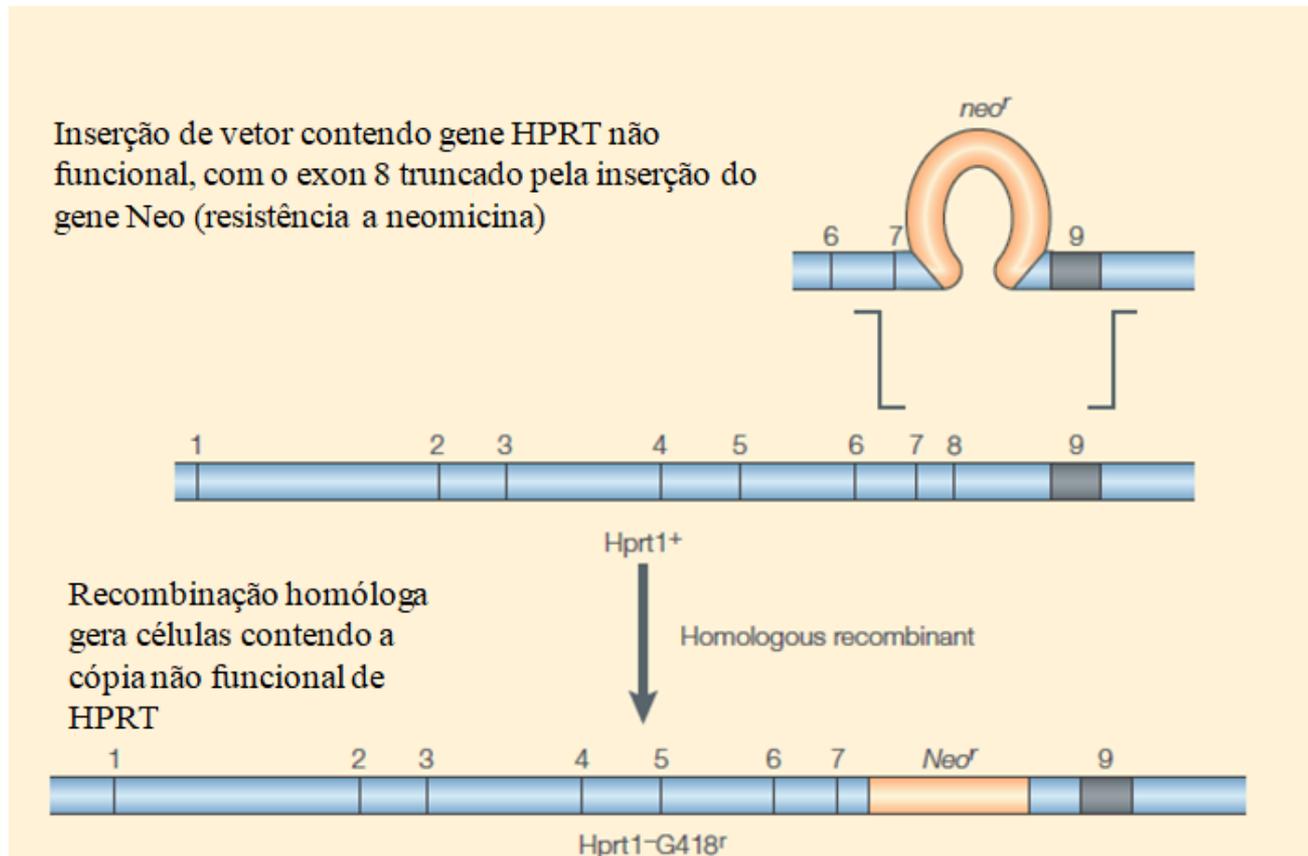


# Inserção de uma sequência por recombinação homóloga das sequências "flanqueadoras"

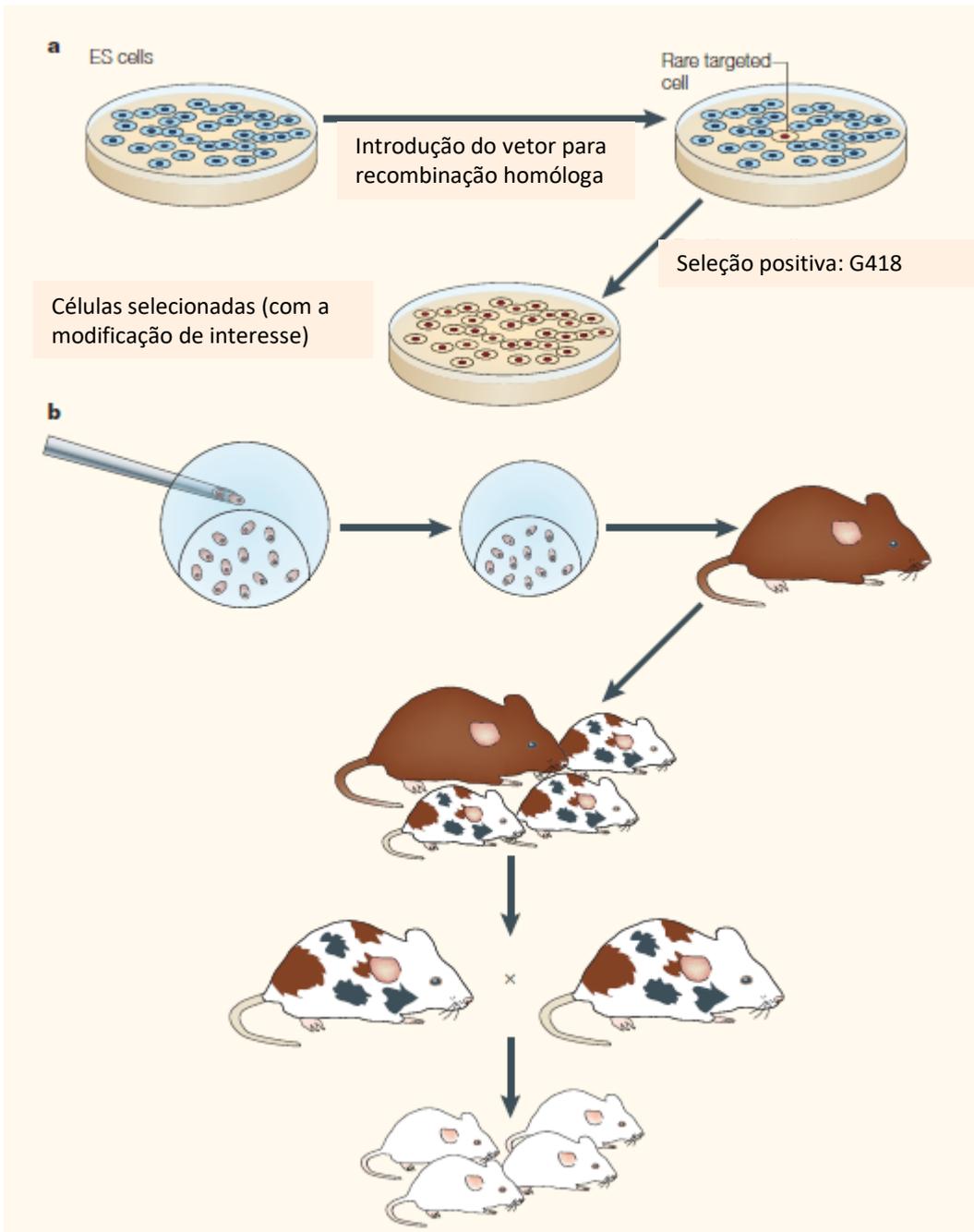


# Inativação de um gene-alvo pela inserção de um gene de resistência ( $neo^r$ ) por recombinação homóloga

- G418 é um análogo do antibiótico neomicina
- Seleção das células com nocaute do gene: células resistentes a G418 → seleção positiva



# Obtenção de camundongos nocaute



a. Seleção de **células-tronco embrionárias (ESC)** com a alteração genômica gerada por recombinação homóloga

b. Injeção das células ES em blastocistos e implantação em fêmeas receptoras

c. Quimeras contendo a modificação genômica

d. Cruzamentos para obtenção de animais homozigóticos quanto a alteração desejada



Camundongos transgênicos: Ainda são as melhores opções para o estudo de doenças genéticas

# The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007



Photo: U. Montan

**Mario R. Capecchi**

Prize share: 1/3



Photo: U. Montan

**Sir Martin J. Evans**

Prize share: 1/3



Photo: U. Montan

**Oliver Smithies**

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007 was awarded jointly to Mario R. Capecchi, Sir Martin J. Evans and Oliver Smithies *"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"*.

# Tipos de modificação/edição de genomas:

- *Knock out (KO)*: gene retirado/ inativado
- *Knock in (KI)*: gene trocado por um gene modificado (mesmo gene porém com alguma mutação)
- “Genome-editing”: alteração direta na sequência genômica

“**Knock in**”: troca da sequência do gene alvo por uma sequência desse mesmo gene porém com alguma modificação (mutação)

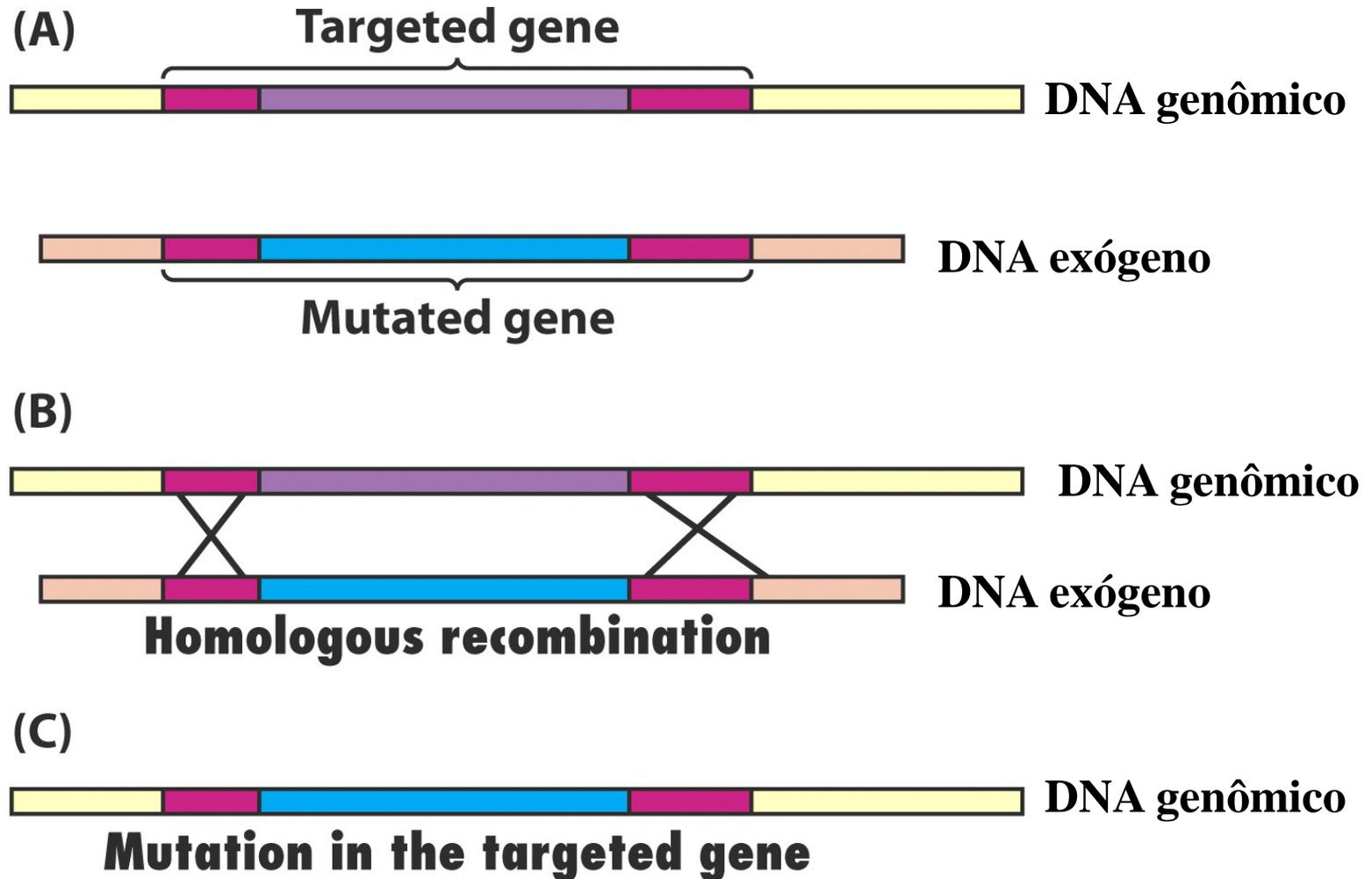
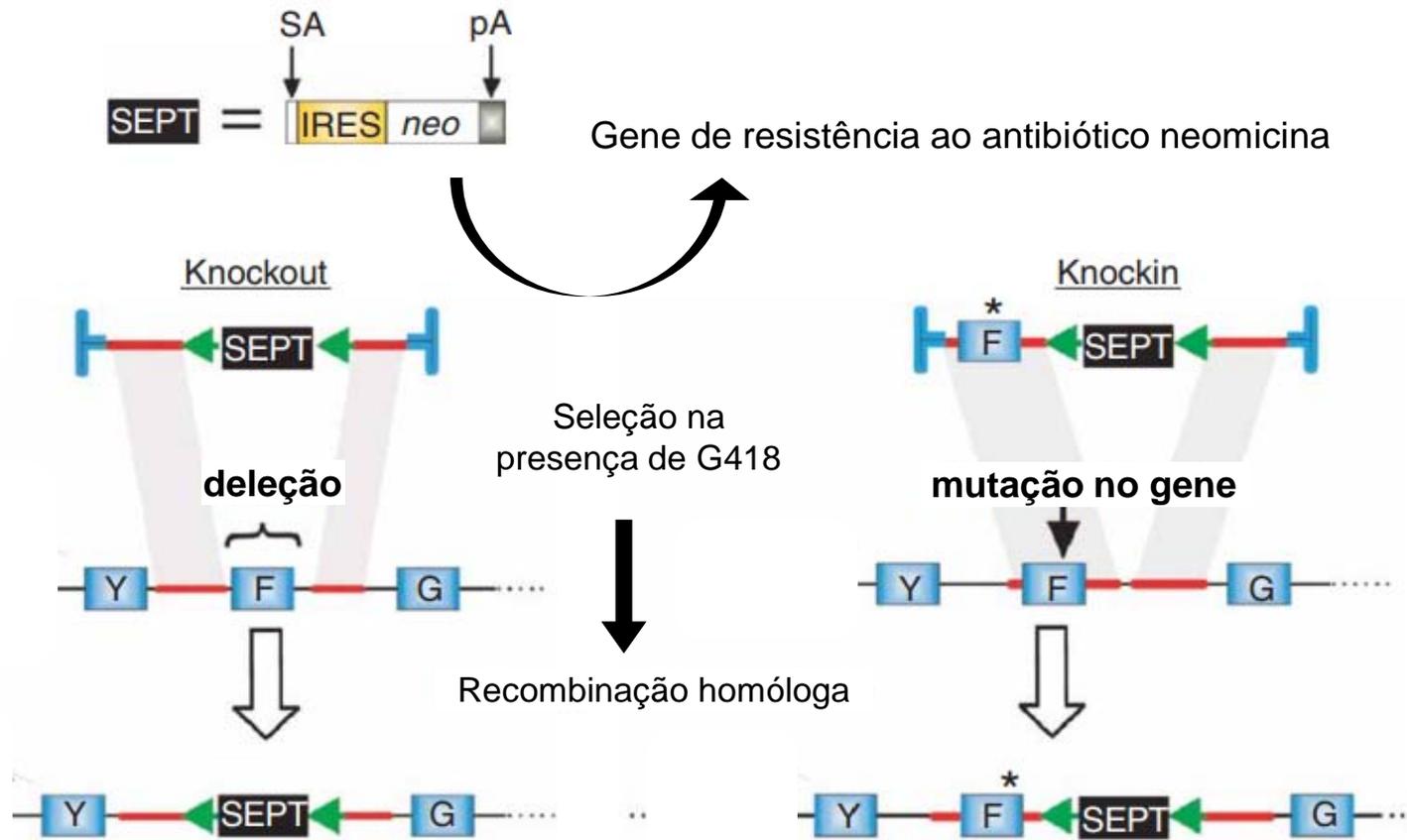


Figure 5-34  
*Biochemistry, Sixth Edition*  
© 2007 W. H. Freeman and Company

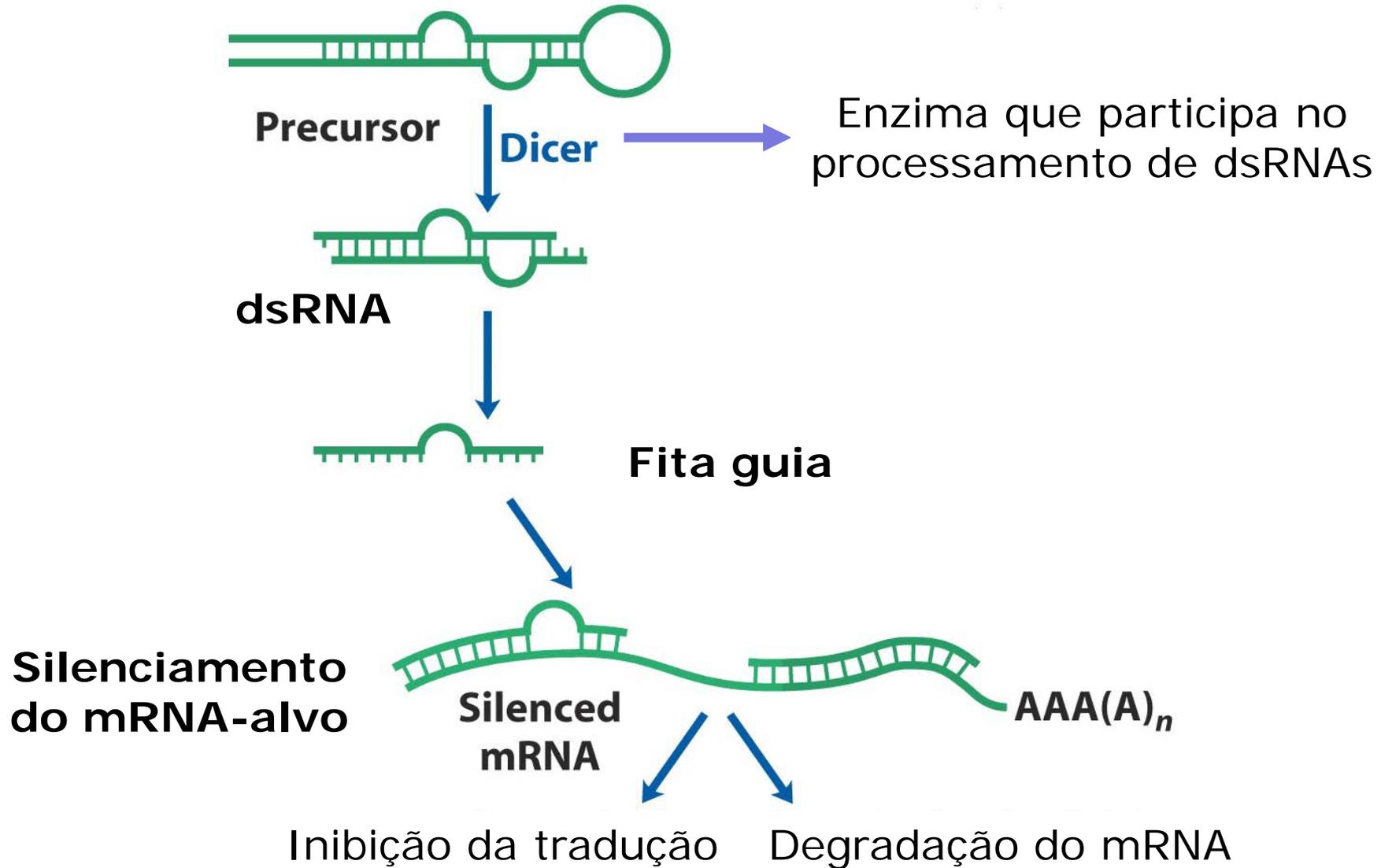
# Recombinação homóloga pode ser usada para “knockin” ou “knockout”



Outro método para “inativar” a  
expressão de um gene?

Interferência por pequenos RNAs (RNAi)

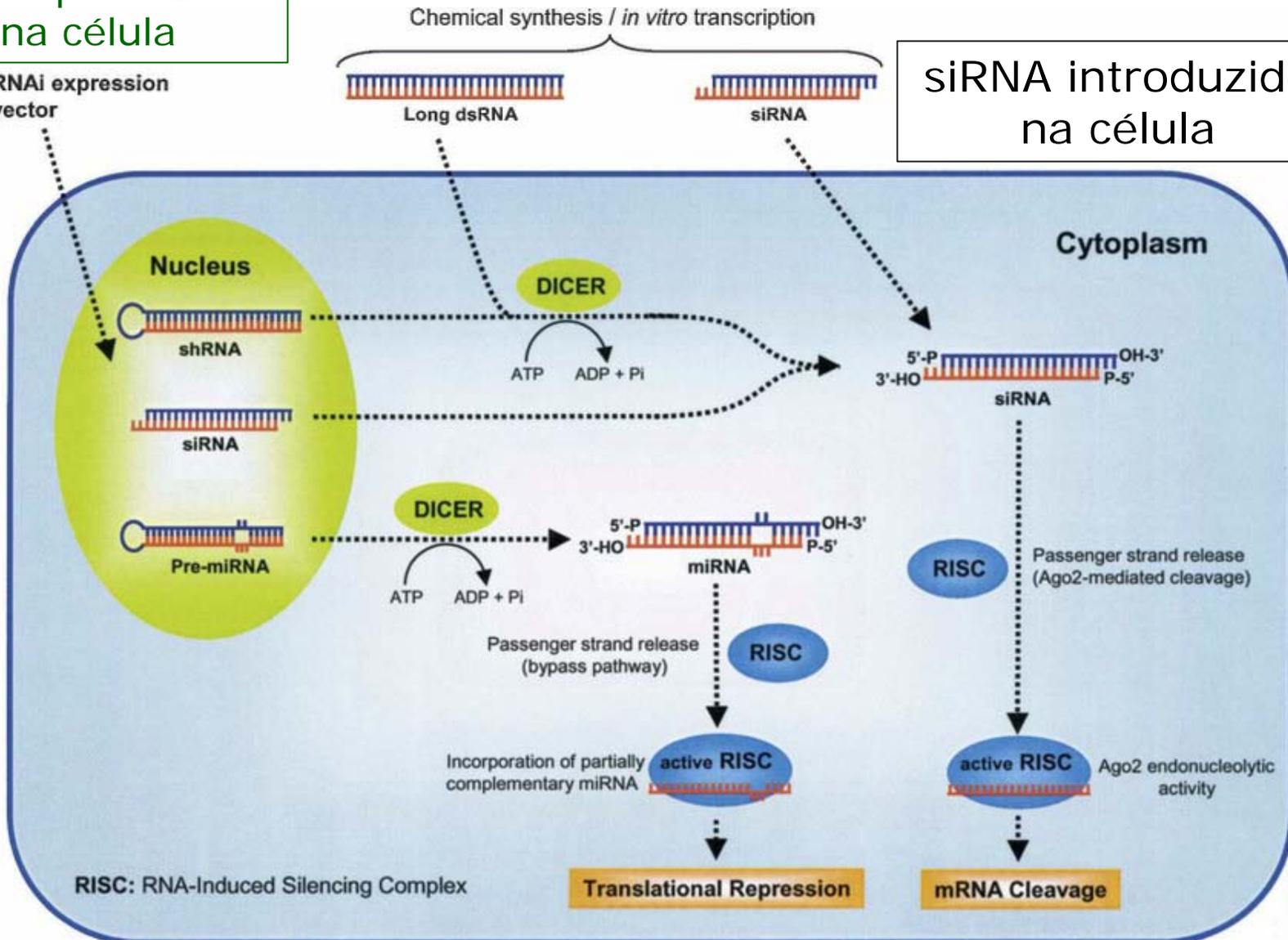
Moléculas de **RNA dupla fita (dsRNA)** são processadas dentro da célula em pequenos RNAs complementares a mRNAs (“small interfering RNAs” – siRNAs) que promovem o silenciamento da expressão gênica



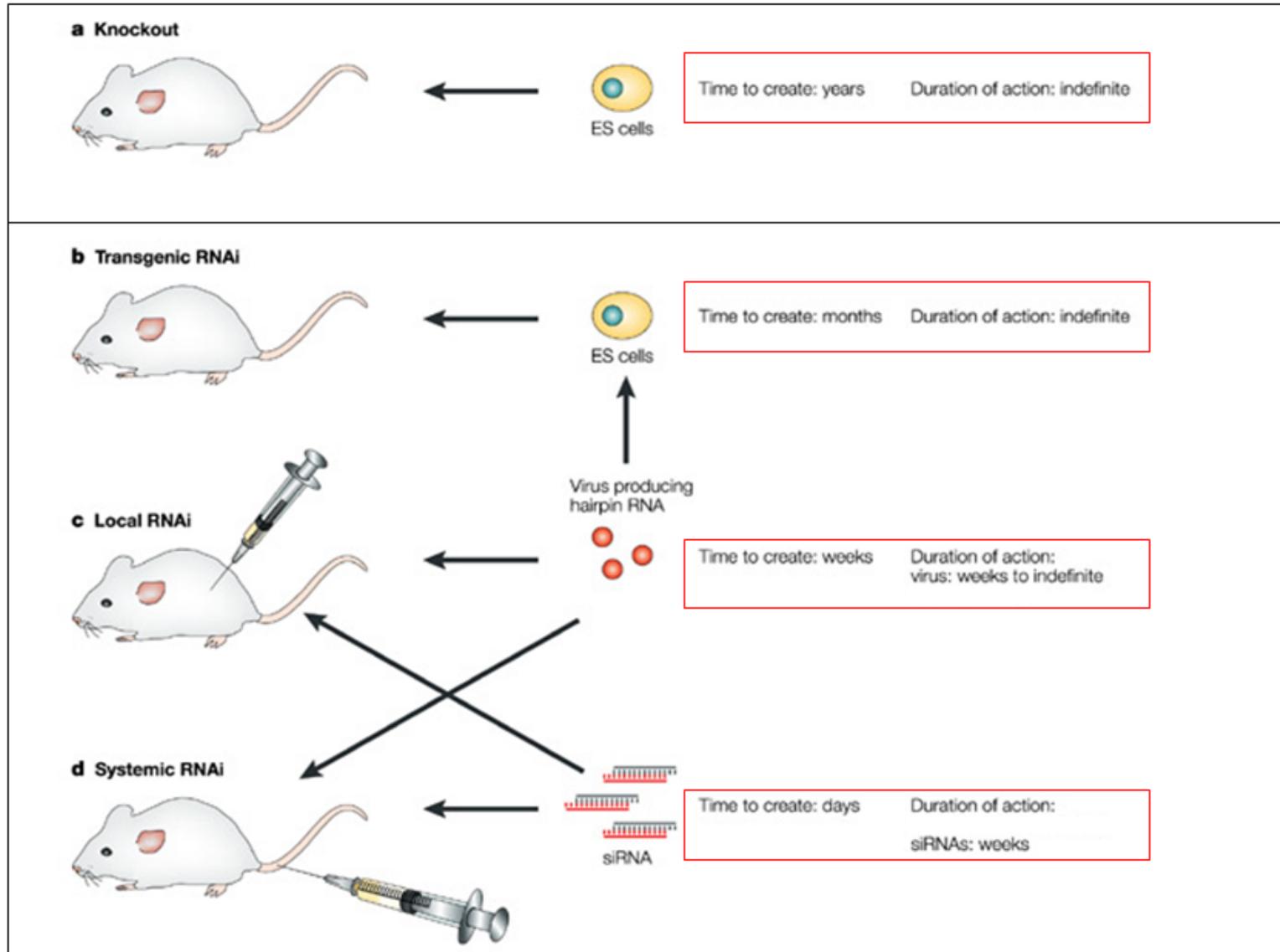
# siRNAs endógenos ou exógenos podem ser usados para silenciar (“knock down”) genes utilizando a maquinaria de RNAi

siRNA produzido na célula

siRNA introduzido na célula



RNAi é uma alternativa mais rápida para testar o efeito biológico da perda de função de um gene



# Edição de genomas

Manipulação direta da sequência do DNA em dois passos:

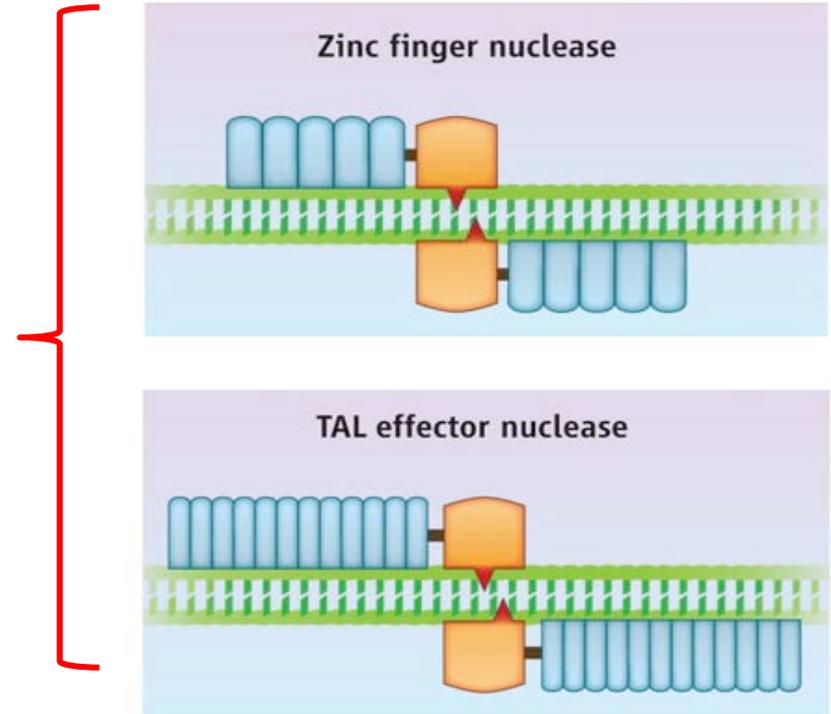
Passo 1: Enzimas **nucleases** são direcionadas para sequência-alvo e clivam a dupla-fita de DNA

Passo 2: Mecanismos de recombinação/reparo de DNA concluem a edição do genoma

# Como direcionar endonucleases para digerir e editar locais específicos do genoma ?

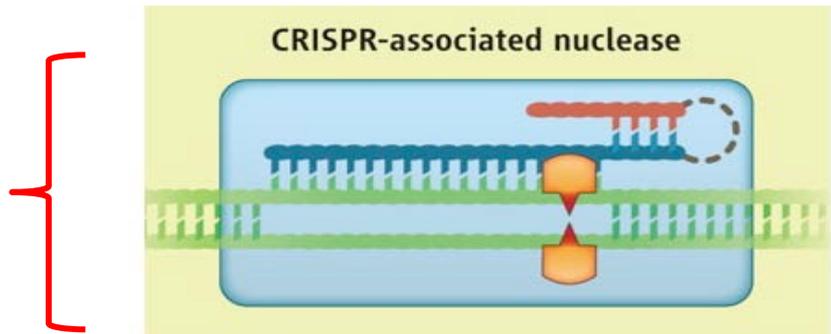
## Nuclease guiada por proteínas para a sequência-alvo

Fusões proteicas contendo um domínio de ligação de DNA específico e domínio com atividade endonuclease



## Nuclease guiada por RNA para sequência-alvo

Endonuclease (Cas9) guiada por pequenos RNAs guias complementares a trechos específicos do DNA



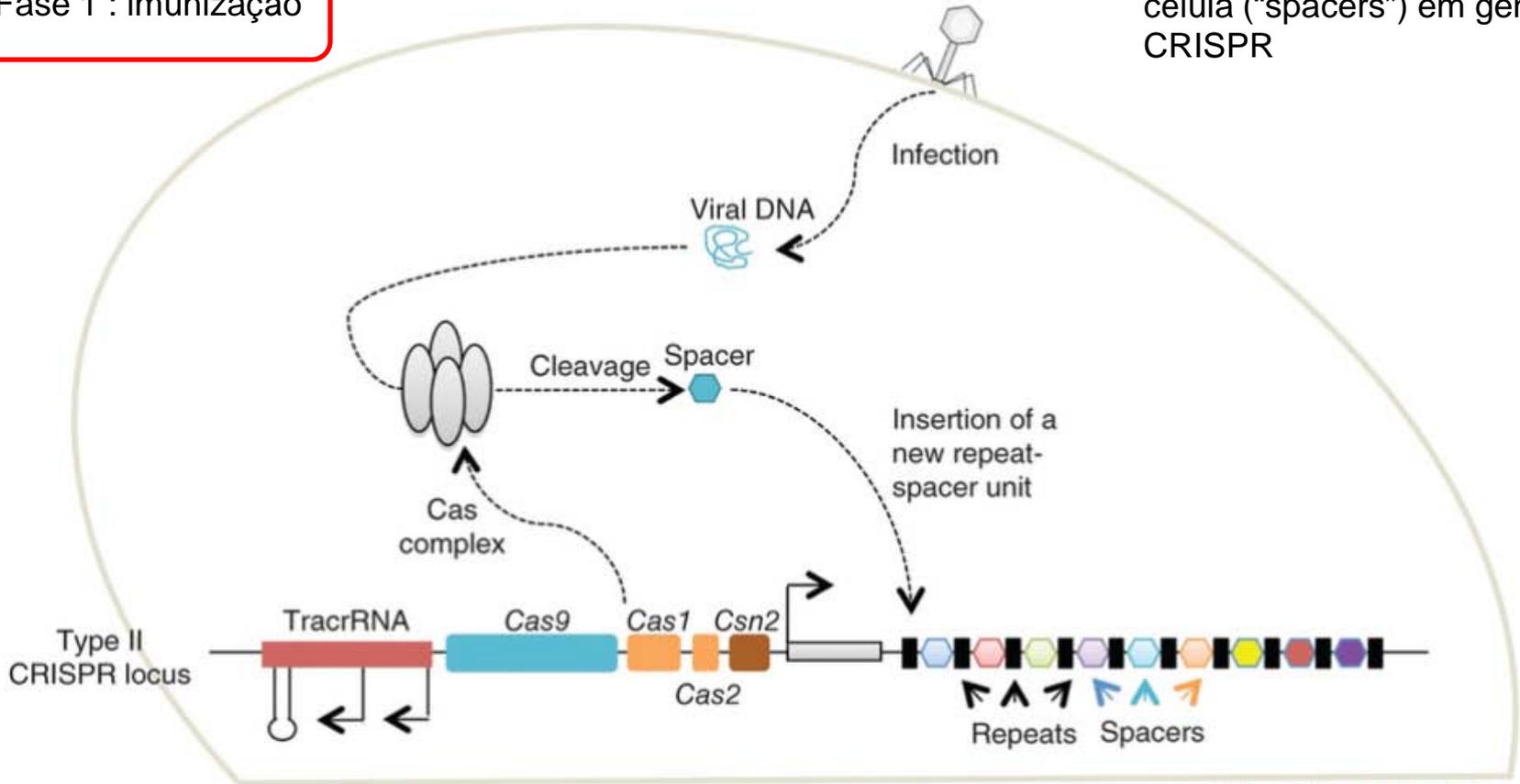
# CRISPR-Cas9: Uma nova e poderosa forma de editar (engenheirar) genomas

CRISPR: **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **P**alindromic **R**epeats  
Cas: **C**RISPR-**a**ssociated genes (endonuclease)

# CRISPR-CAS: Sistema de imunidade adaptativo e herdável de procariontos

Fragments of genetic material (DNA, cDNA) of virus infectants are incorporated into the genome in the cell ("spacers") in CRISPR genes

Fase 1 : imunização

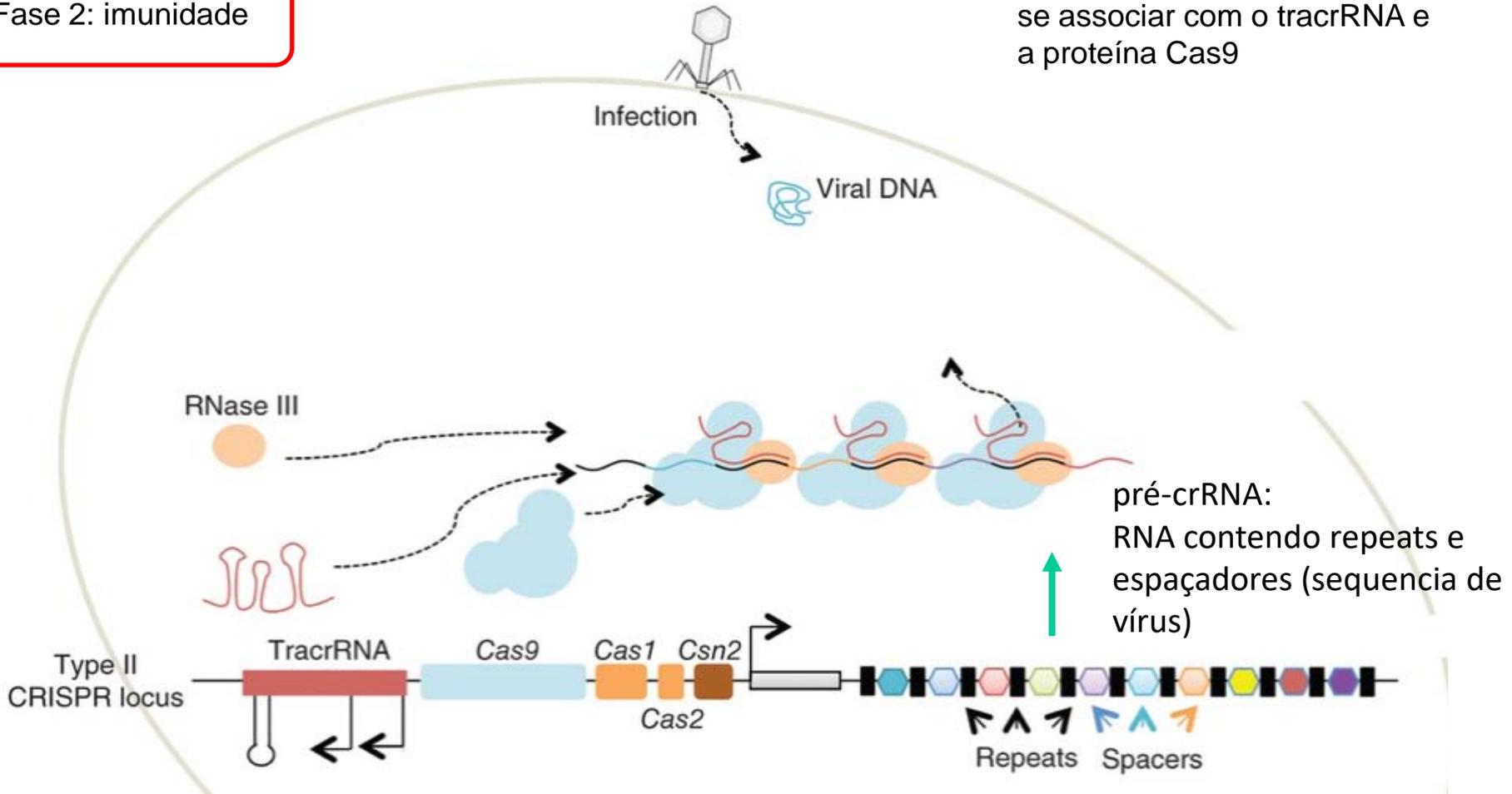


Mali et al. *Nature Methods* 2013

TracrRNA: transactivating RNA (importante para a fase de imunidade)

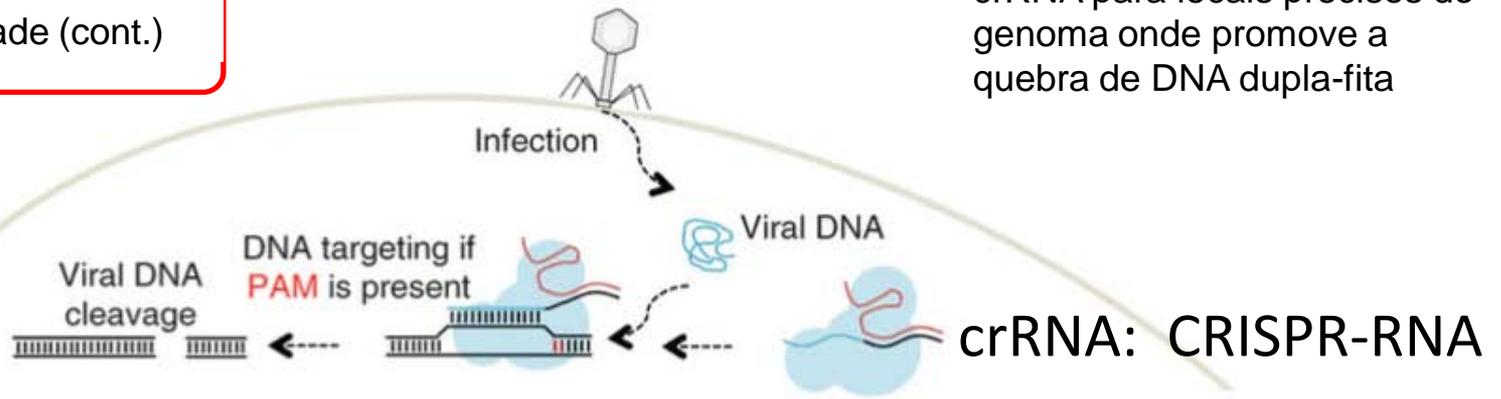
Fase 2: imunidade

Gene CRISPR é transcrito e processado em pequenos RNAs guias (cRNAs) que irão se associar com o tracrRNA e a proteína Cas9



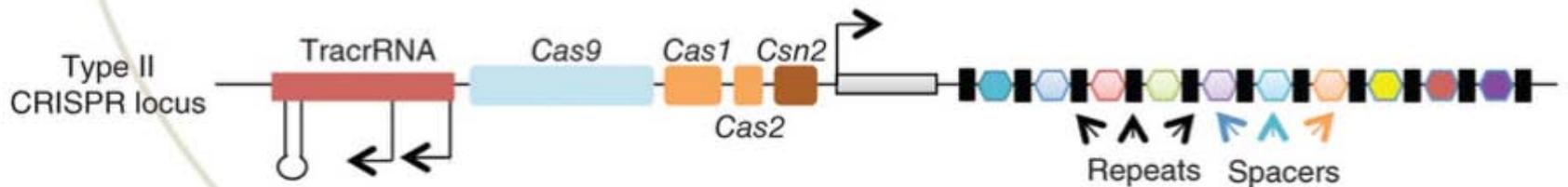
Fase 2: imunidade (cont.)

Cas9 é ativada e guiada pelo crRNA para locais precisos do genoma onde promove a quebra de DNA dupla-fita



crRNA: CRISPR-RNA

PAM=palindromic adjacent motif , presente no DNA alvo (ex: NGG)



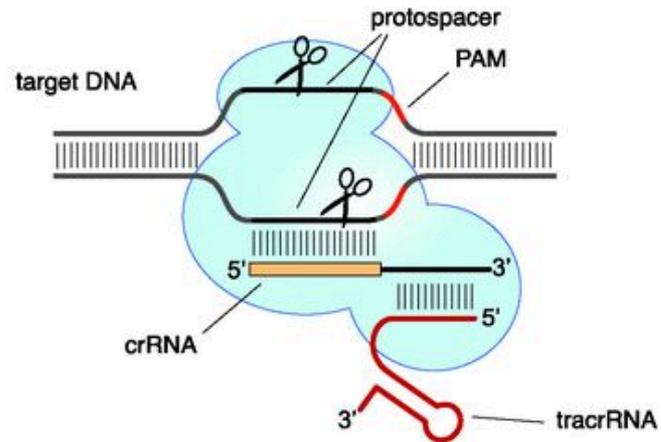
# Conhecimento do sistema CRISPR-Cas9 deu origem a uma poderosa ferramenta para manipulação e edição de genomas

- CRISPR RNAs (crRNAs) pareados com trans-activating RNAs (tracrRNA) são recrutados pela endonuclease Cas9.
- O crRNA guia o complexo para a clivagem do DNA em sítios específicos do genoma.

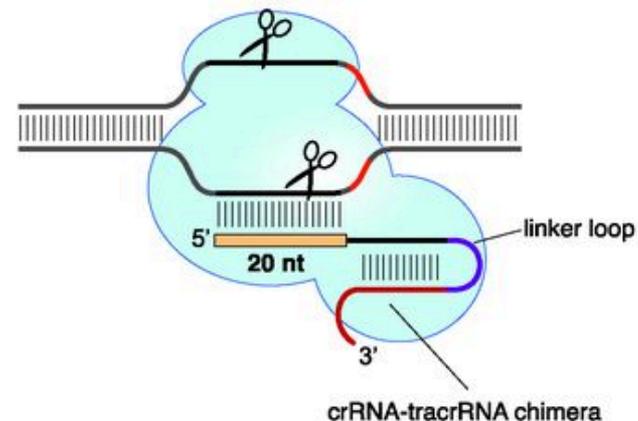
## **small guide RNAs (sgRNAs):**

RNAs sintéticos quiméricos contendo um trecho de 20 nt complementar ao DNA alvo e um trecho necessário para a formação do dsRNA e direcionamento de Cas9

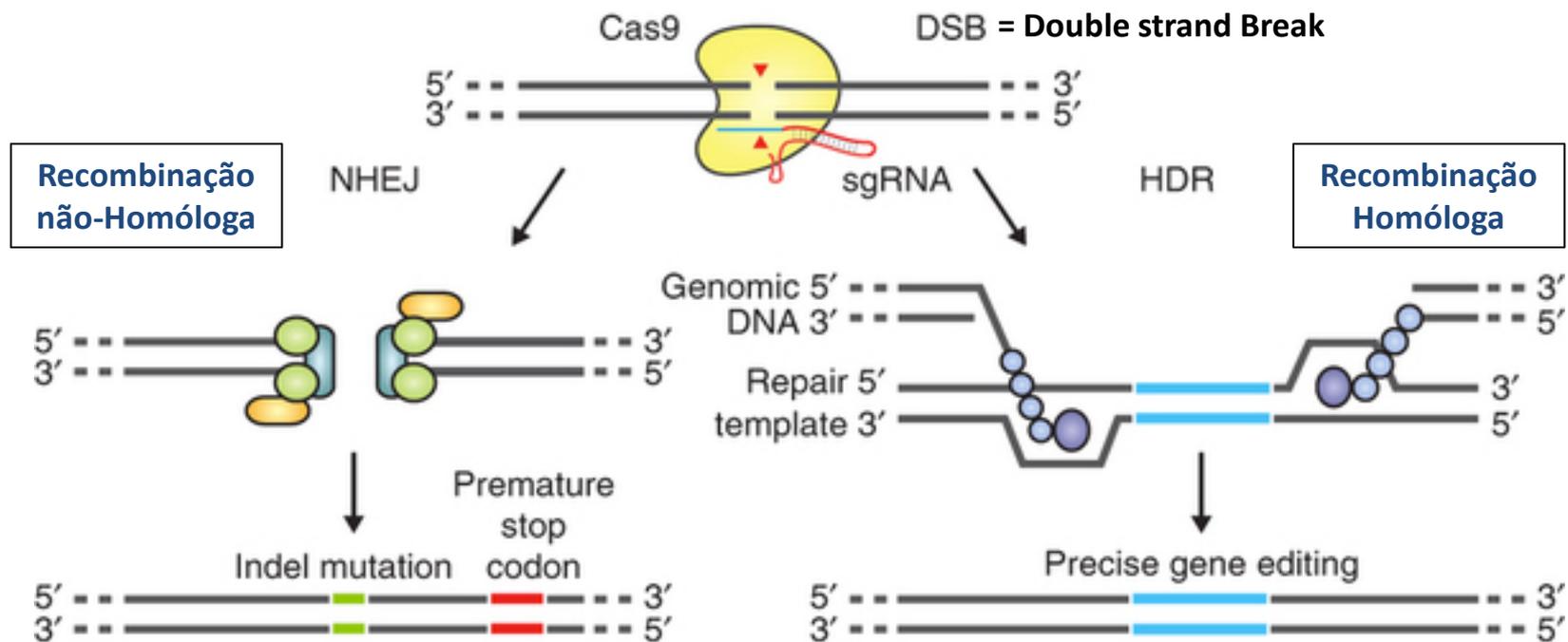
Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA



# Quebra da dupla fita de DNA mediada por sgRNA-CAS9 seguida de reparo permite a manipulação precisa de genes



Reparo sujeito a erro introduz indels na sequência-alvo:

- Mudança de fase de leitura
- Codon de parada prematuro
- **Nocautê gênico**

Reparo por recombinação homóloga permite a edição precisa da sequência-alvo:

- **introdução de mutação**
- **correção de mutação**
- **Construção de quimeras**

# The Nobel Prize in Chemistry 2020

---



© Nobel Prize Outreach. Photo:

Bernhard Ludewig

**Emmanuelle  
Charpentier**

Prize share: 1/2



© Nobel Prize Outreach. Photo:

Brittany Hosea-Small

**Jennifer A. Doudna**

Prize share: 1/2

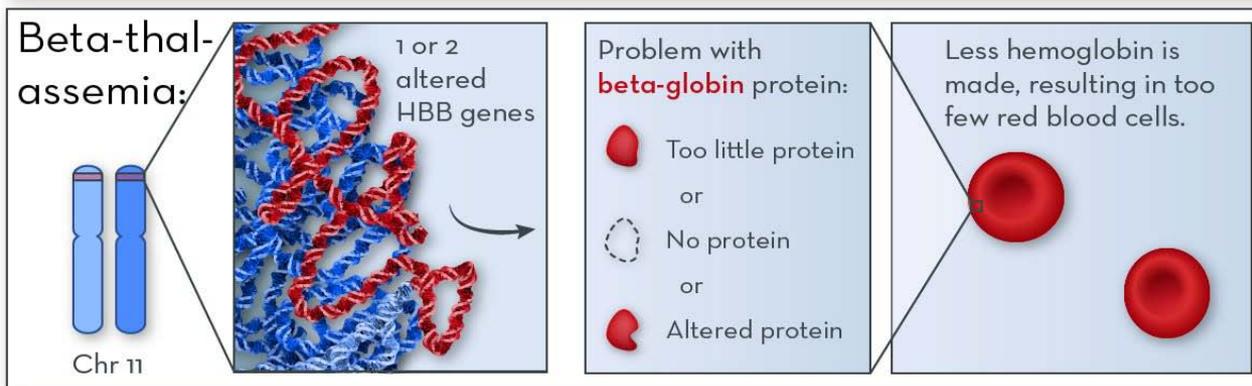
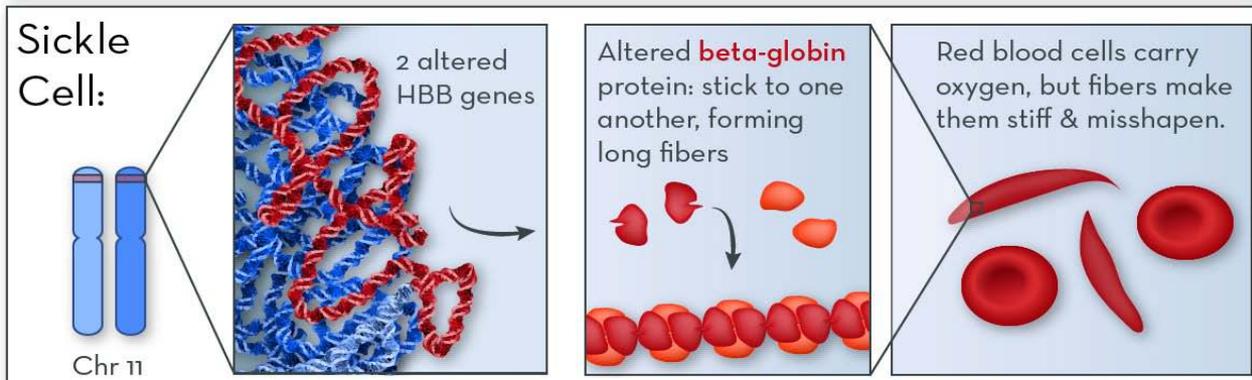
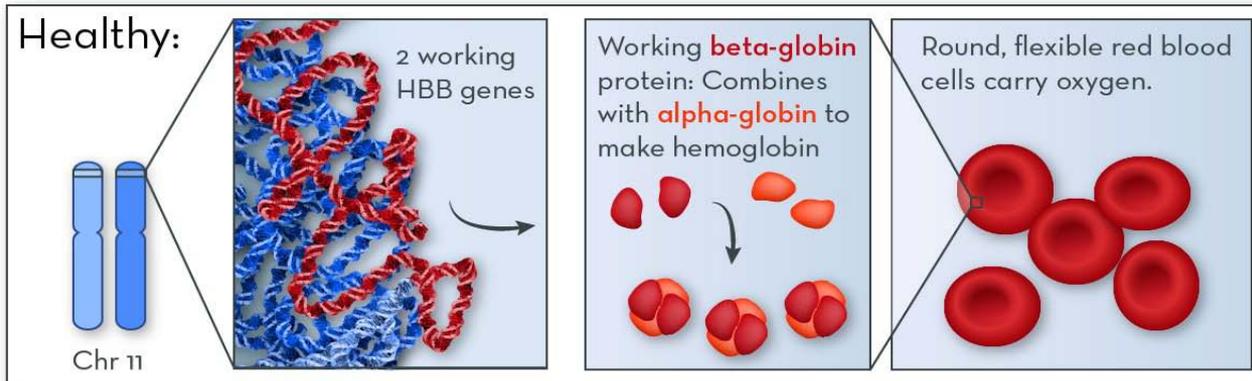
---

The Nobel Prize in Chemistry 2020 was awarded jointly to Emmanuelle Charpentier and Jennifer A. Doudna "for the development of a method for genome editing"

---

# Potenciais aplicações da tecnologia CRISPR-Cas9

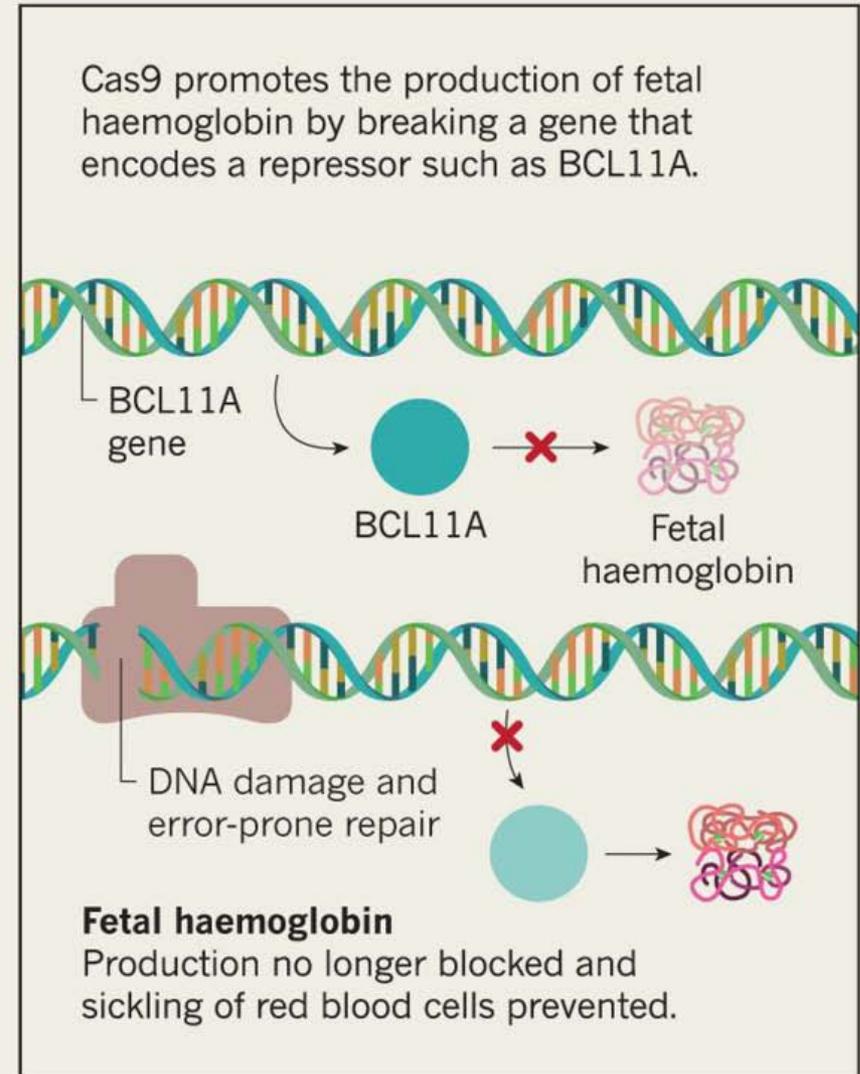
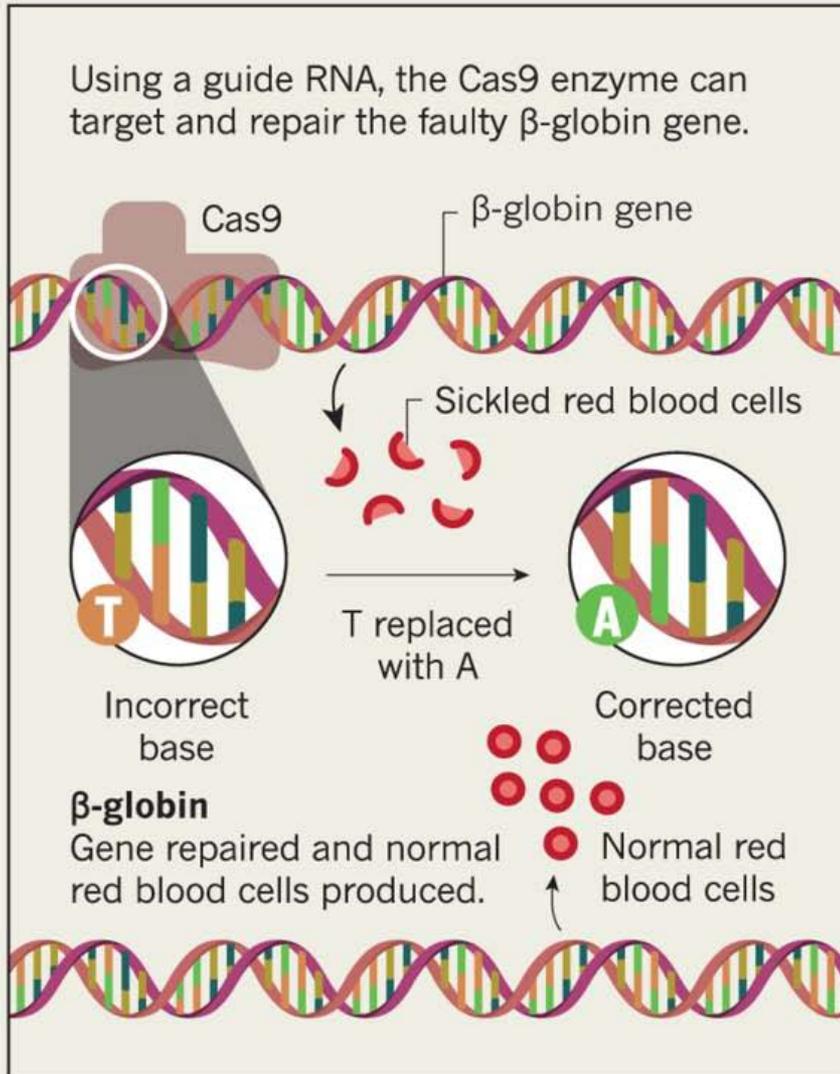
- Manipulação de genomas
- Terapia Gênica (Doenças genéticas hereditárias)
- Tratamento de infecções virais



┌────────── DNA ─────────┐ ┌── PROTEIN ─┐ ┌── CELL/TISSUE ─┐

# GENE EDITING WITH CRISPR

CRISPR-Cas9 gene editing is helping to tackle sickle-cell disease in two ways.





DECEMBER 8, 2023 | 5 MIN READ

## FDA Approves First CRISPR Gene Editing Treatment for Sickle Cell Disease

Most people with sickle cell disease who received a new gene editing treatment saw their pain resolve for at least one year, but longer follow up is needed

BY [SARA REARDON](#)

