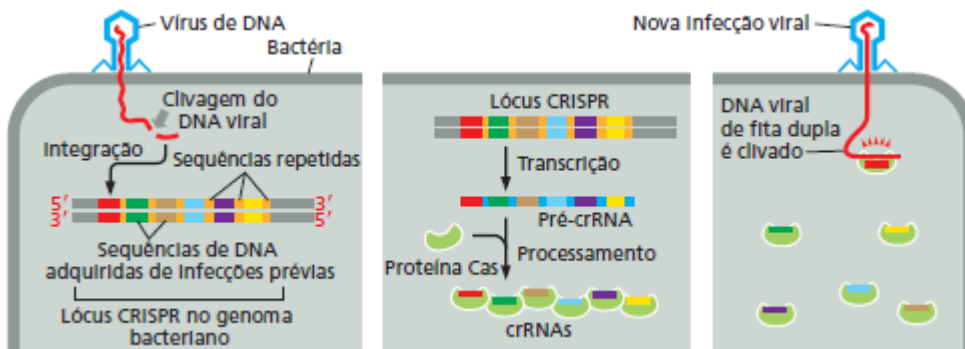


# Editando o DNA com CRISPR/CAS9

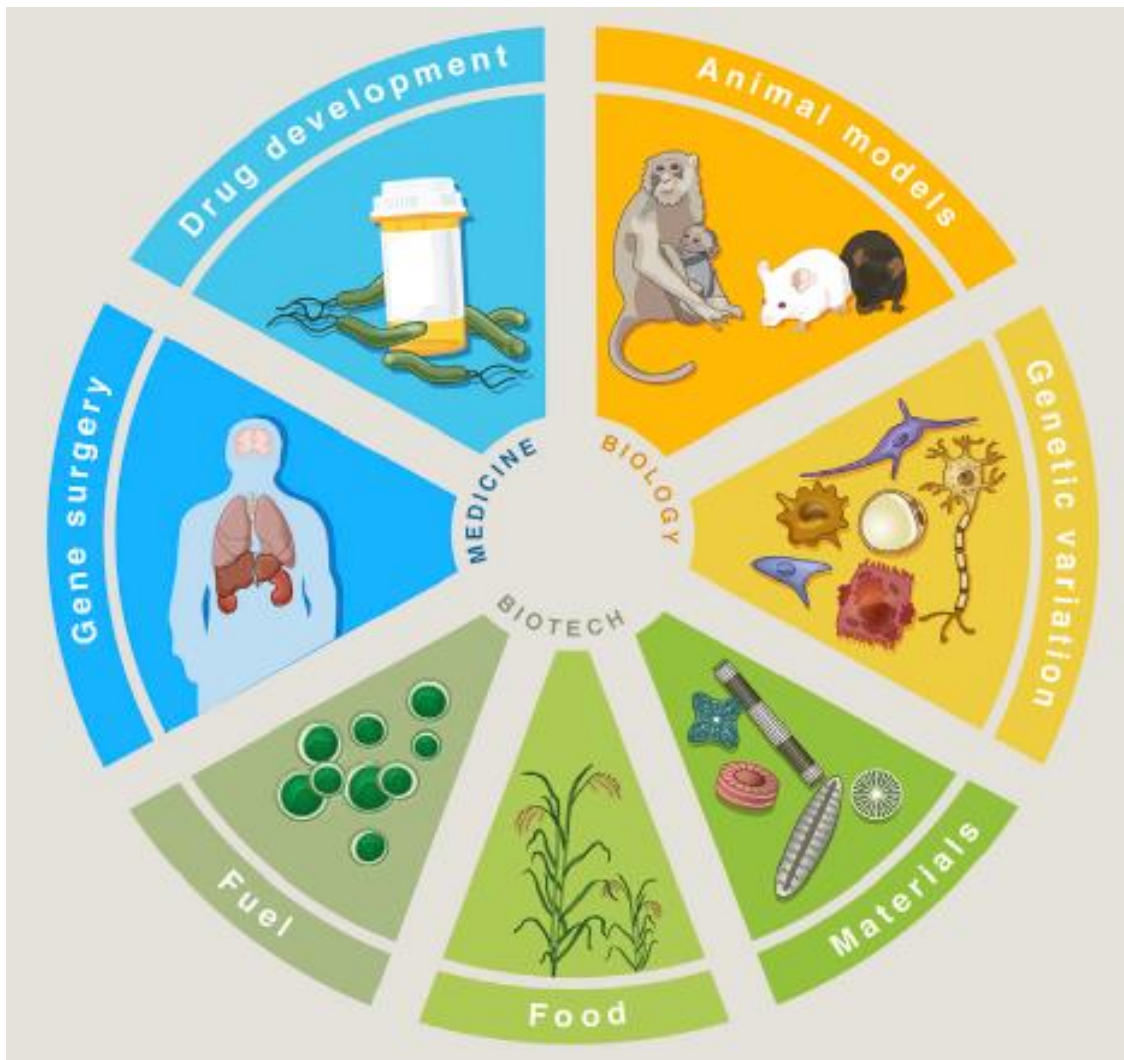
## Aula 8

### LGN0232 – Genética molecular



Emiliana Manesco Romagnoli  
Departamento de Genética  
emilianaromagnoli@usp.br

# Aplicações da engenharia genômica

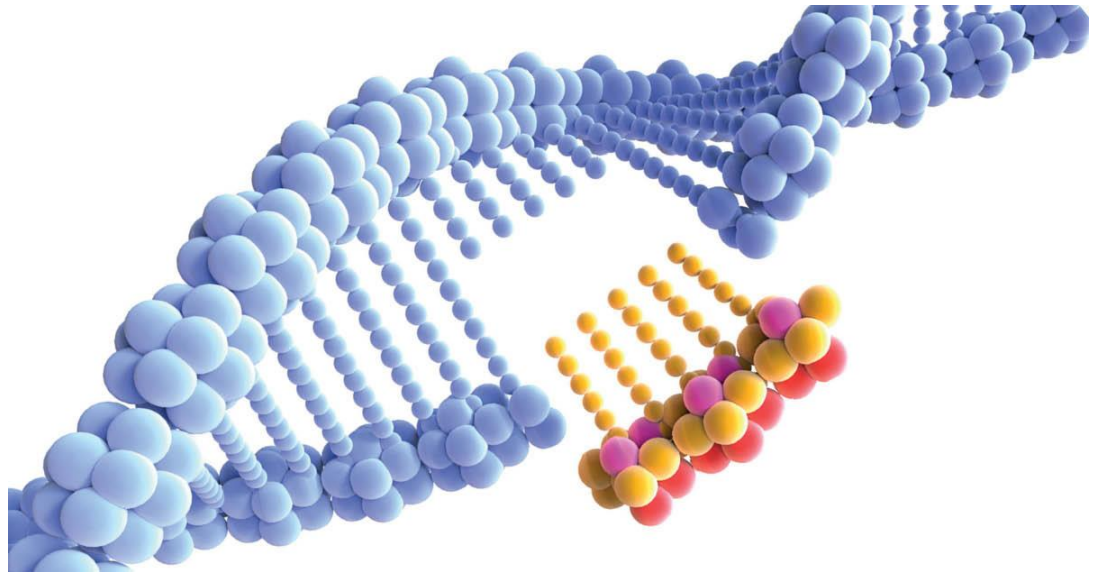


- O controle genético e epigenético de células com tecnologias de engenharia de genoma está permitindo uma ampla gama de aplicações, desde biologia básica até biotecnologia e medicina.
- Mutações genéticas causais ou variantes epigenéticas associadas com função biológica alterada ou fenótipos de doenças podem agora ser recapituladas de forma rápida e eficiente em modelos animais ou celulares.
- A manipulação de circuitos biológicos também pode facilitar a geração de materiais sintéticos úteis, como diatomáceas baseadas em silicato derivadas de algas para administração oral de drogas (Materiais).
- A correção direta in vivo de defeitos genéticos ou epigenéticos no tecido somático seria soluções genéticas permanentes que abordam a causa raiz de doenças codificadas geneticamente (cirurgia do gene). Finalmente, a engenharia de células para otimizar a geração de alto rendimento de precursores de drogas em fábricas de bactérias poderia reduzir significativamente o custo e a acessibilidade de terapêuticas úteis (desenvolvimento de drogas).

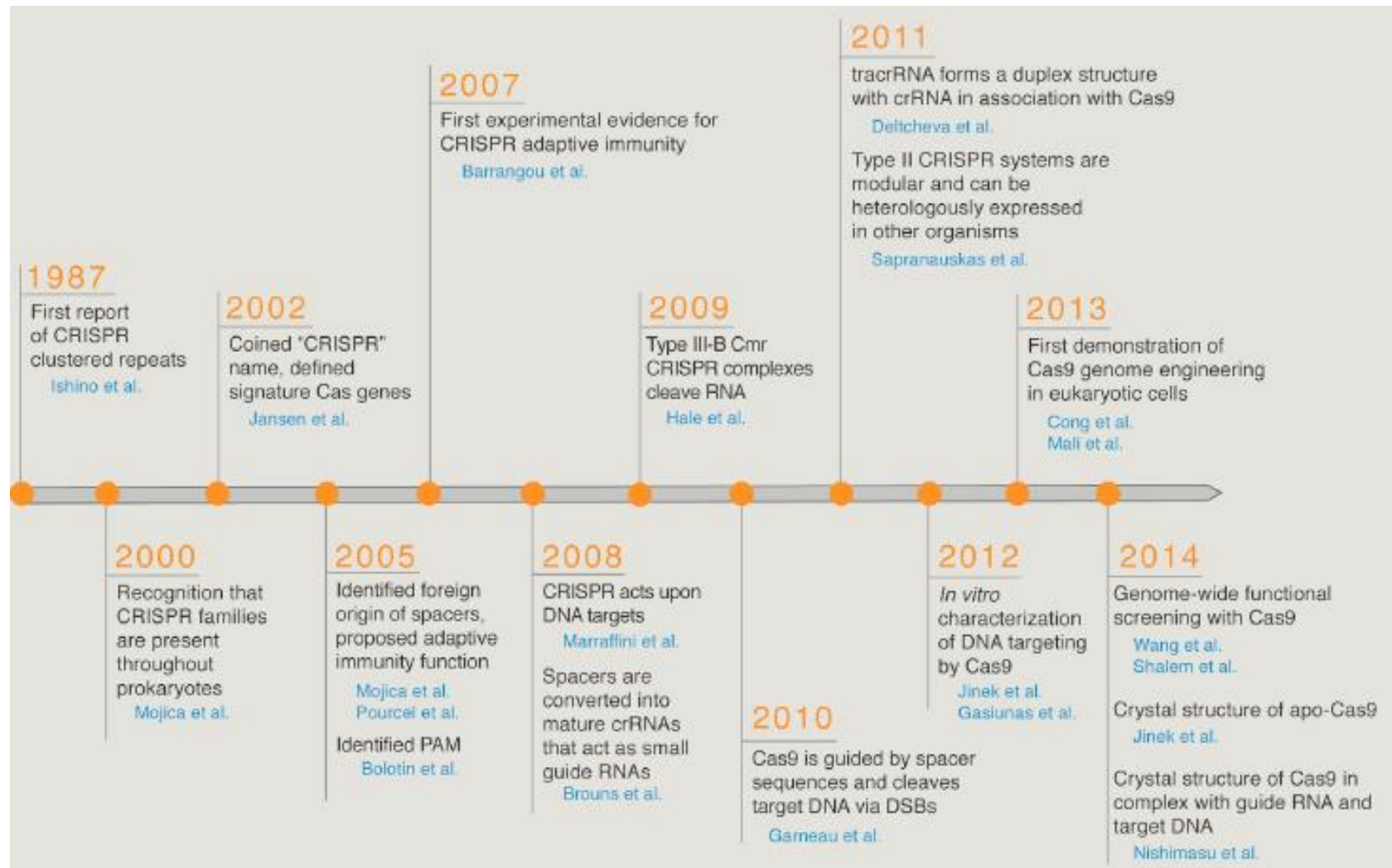
# Clustered Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)

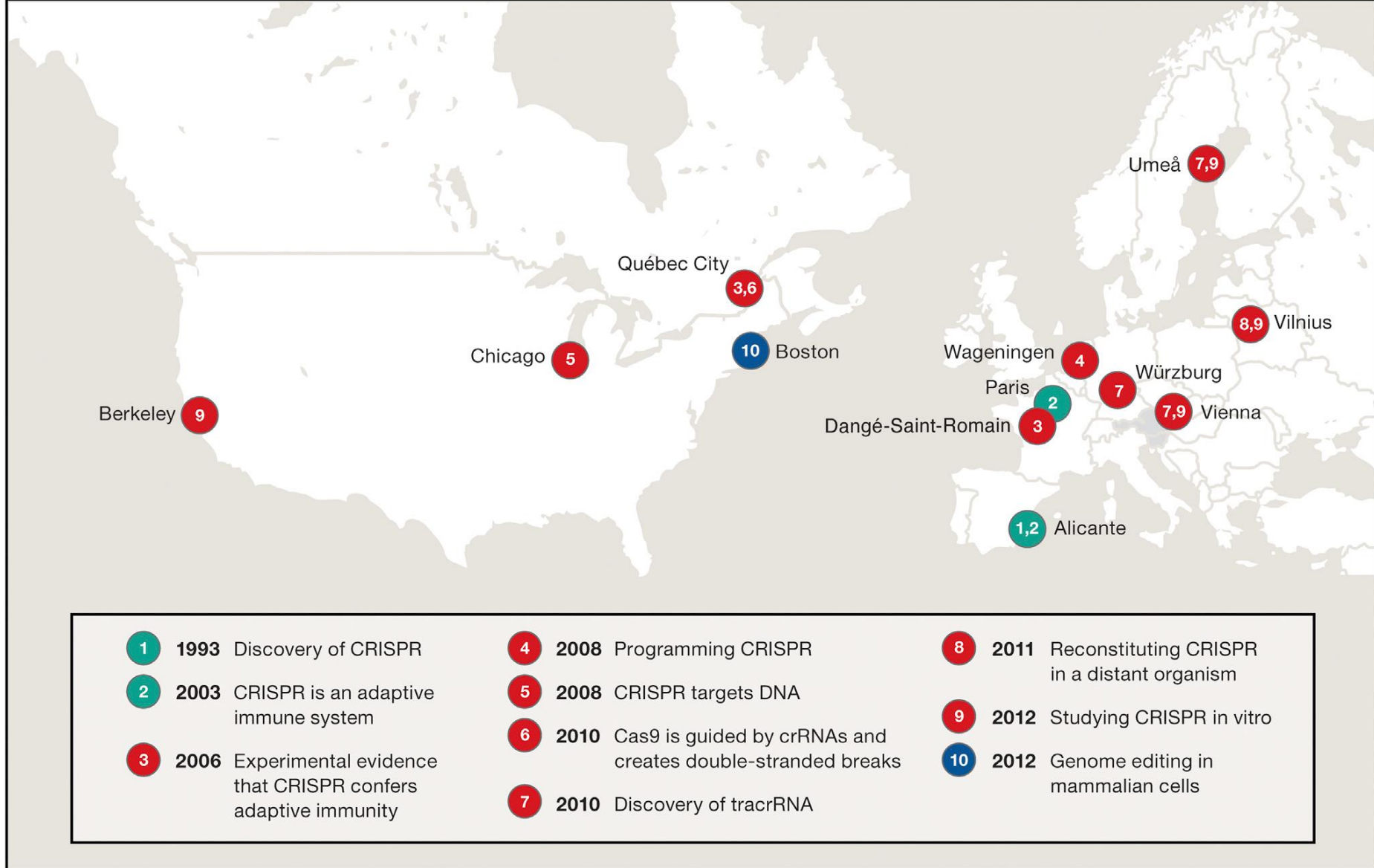
Conjunto de repetições palindrômicas regularmente espaçadas

- CRISPR-Cas foi descoberto em bactérias e archaea
- É um mecanismo de imunidade adaptativa contra bacteriófagos
- Três tipos diferentes de sistema CRISPR-Cas (tipo I, tipo II e tipo III)
- Cada tipo representa mecanismos bioquímicos distintos de interferência, o funcionamento de todos envolve três etapas distintas: adaptação, expressão e interferência



# Principais Estudos de Caracterização e Engenharia de Sistemas CRISPR

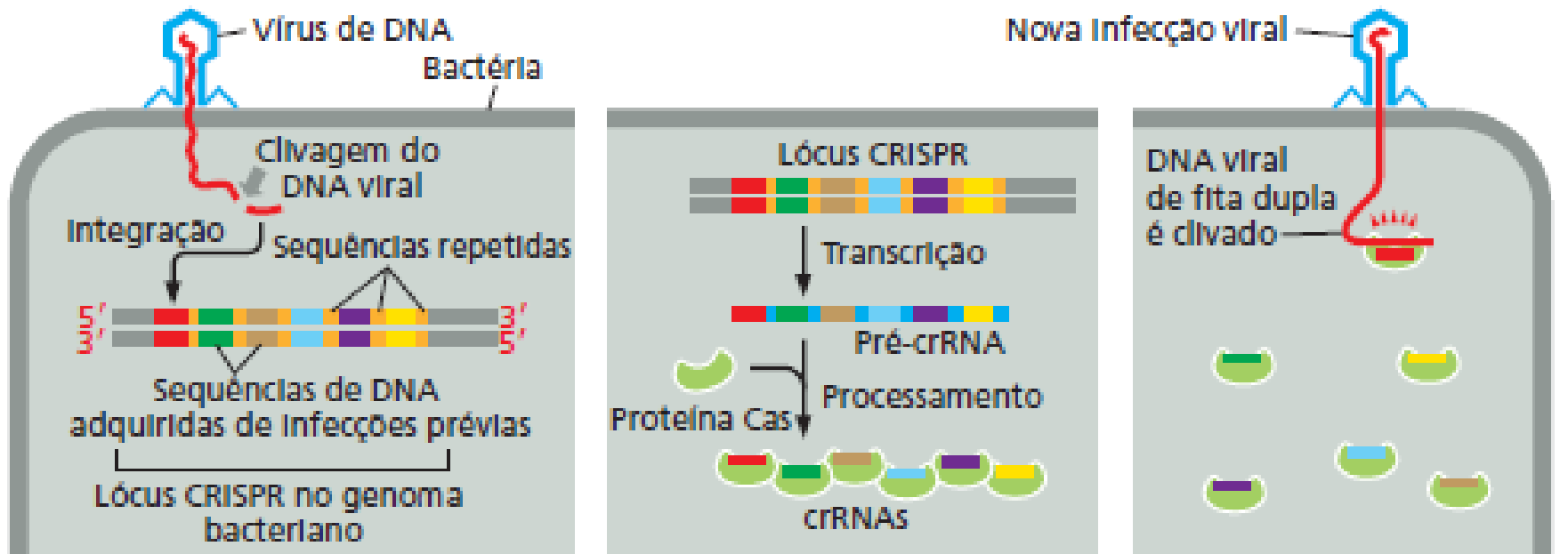




A história de vinte anos da CRISPR desdobrada em doze cidades em nove países Para cada “ capítulo ” na “ história ” da CRISPR, o mapa mostra os locais onde o trabalho principal ocorreu e as primeiras datas de envio dos artigos. Os círculos verdes referem-se à descoberta precoce do sistema CRISPR e sua função; vermelho para a caracterização genética, biológica molecular e bioquímica; e azul para a etapa final da engenharia biológica para permitir a edição do genoma.



# Imunidade mediada por CRISPR em bactérias e arqueias

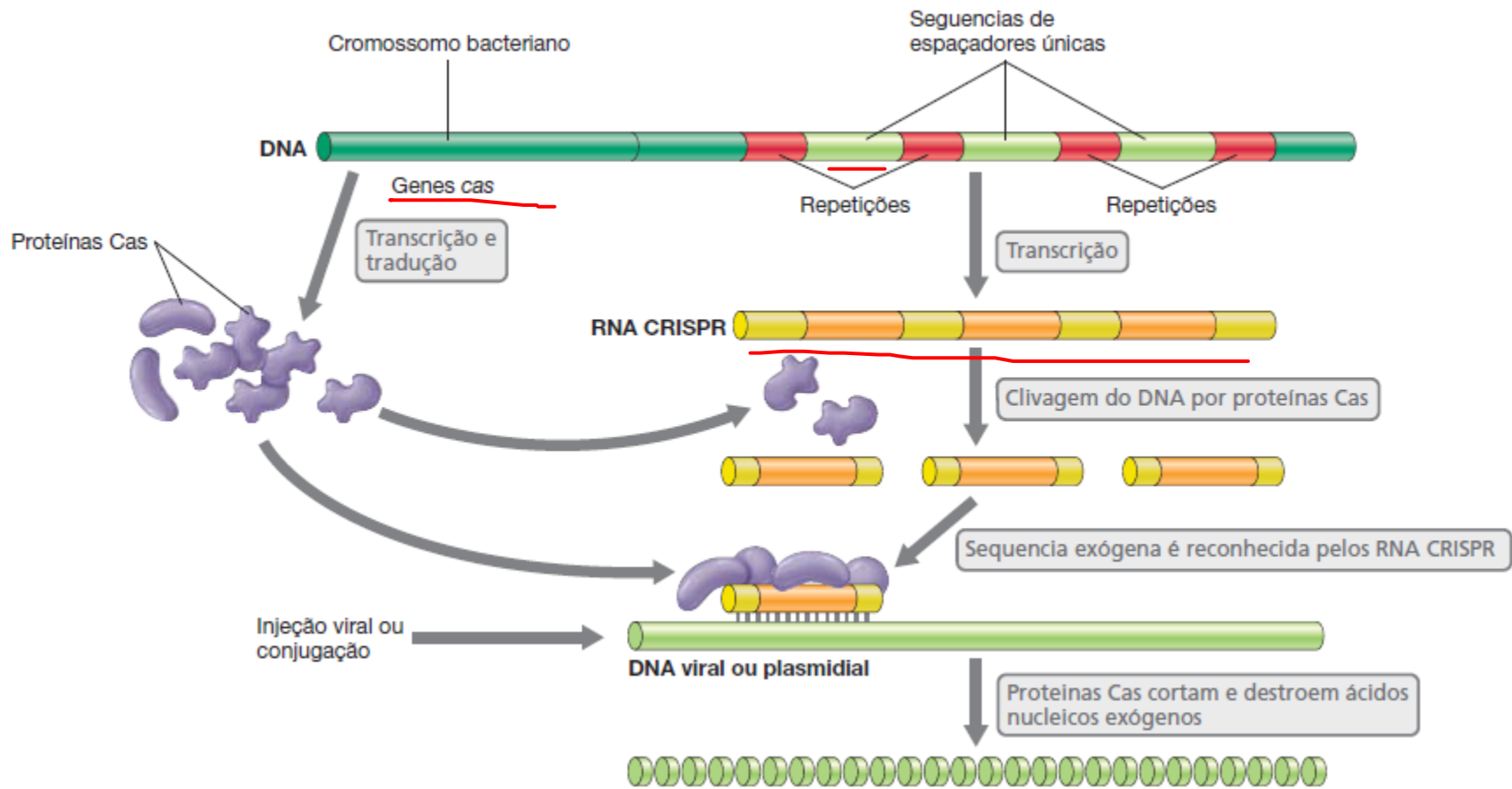


ETAPA 1: pequenas seqüências de DNA viral são integradas no locus CRISPR

ETAPA 2: RNA é transcrito a partir do locus CRISPR, processado e ligado à proteína Cas

ETAPA 3: crRNA pequeno complexado com Cas procura e destrói seqüências virais

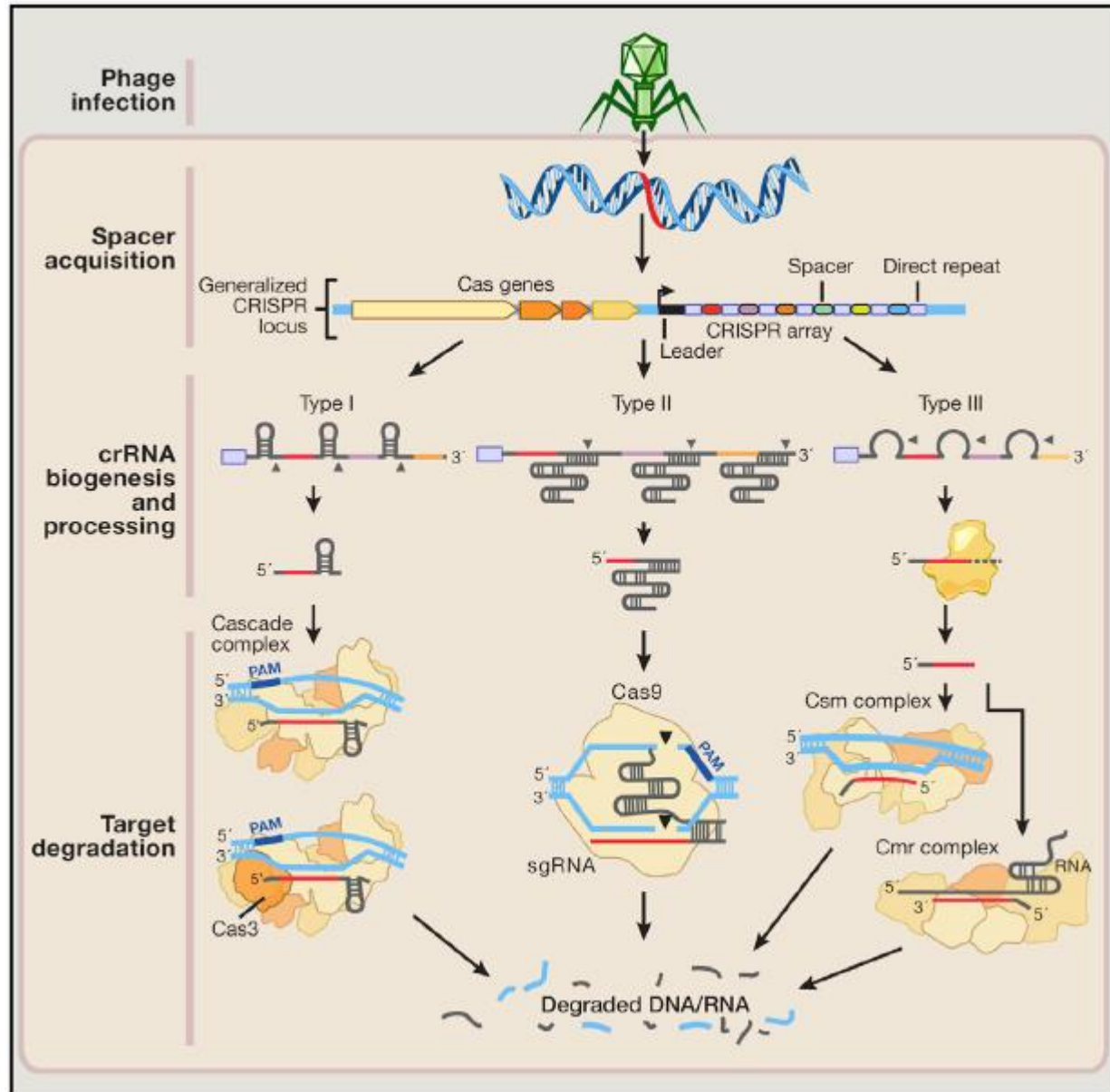
Após infecção por um vírus (à esquerda), uma pequena porção de DNA do genoma viral é inserido no locus CRISPR. Para que isso ocorra, uma pequena fração de células infectadas deve sobreviver à infecção viral inicial. As células sobreviventes, ou mais comumente suas descendentes, transcrevem o locus CRISPR e processam o transcrito em crRNAs (no centro). Quando ocorre reinfecção por um vírus para o qual aquela população de células já tenha sido “vacinada”, o DNA viral que entra é destruído por um crRNA complementar (à direita). Para um sistema CRISPR ser efetivo, os crRNAs não devem destruir o próprio locus CRISPR, ainda que os crRNAs sejam complementares a ele. Em muitas espécies, para que os crRNAs possam atacar uma molécula de DNA invasora, devem existir pequenas seqüências de nucleotídeos adicionais nas moléculas-alvo. Como essas seqüências, denominadas PAMs (motivos adjacentes ao protoespaçador, do inglês, *protospacer adjacent motifs*), localizam-se fora das seqüências de crRNA, o locus CRISPR do hospedeiro é poupado (



**A operação do sistema CRISPR.** A região CRISPR no cromossomo bacteriano é transcrito em longas moléculas de RNA que depois são processadas em segmentos por algumas das proteínas Cas. Cada segmento espaçador corresponde a encontros anteriores com ácidos nucleicos exógenos que entraram na célula. Se uma dessas pequenas moléculas de RNA CRISPR (correspondendo a um espaçador) reconhece e pareia suas bases com o ácido nucleico da transdução ou conjugação, outras proteínas Cas destroem o ácido nucleico exógeno.

# Mecanismos naturais microbianos

## Sistemas CRISPR em imunidade adaptativa



Fonte: Hsu et al., 2014;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>



# Cas9

- ✓ Sistema CRISPR da bactéria tipo II de *Streptococcus pyogenes*
- ✓ Cas9 endonuclease forma complexo com o sítio alvo e o RNA guia

<https://www.sciencemag.org/features/2019/09/beyond-crispr-what-s-current-and-upcoming-genome-editing>



**Table 1. Classification and Examples of CRISPR Systems**

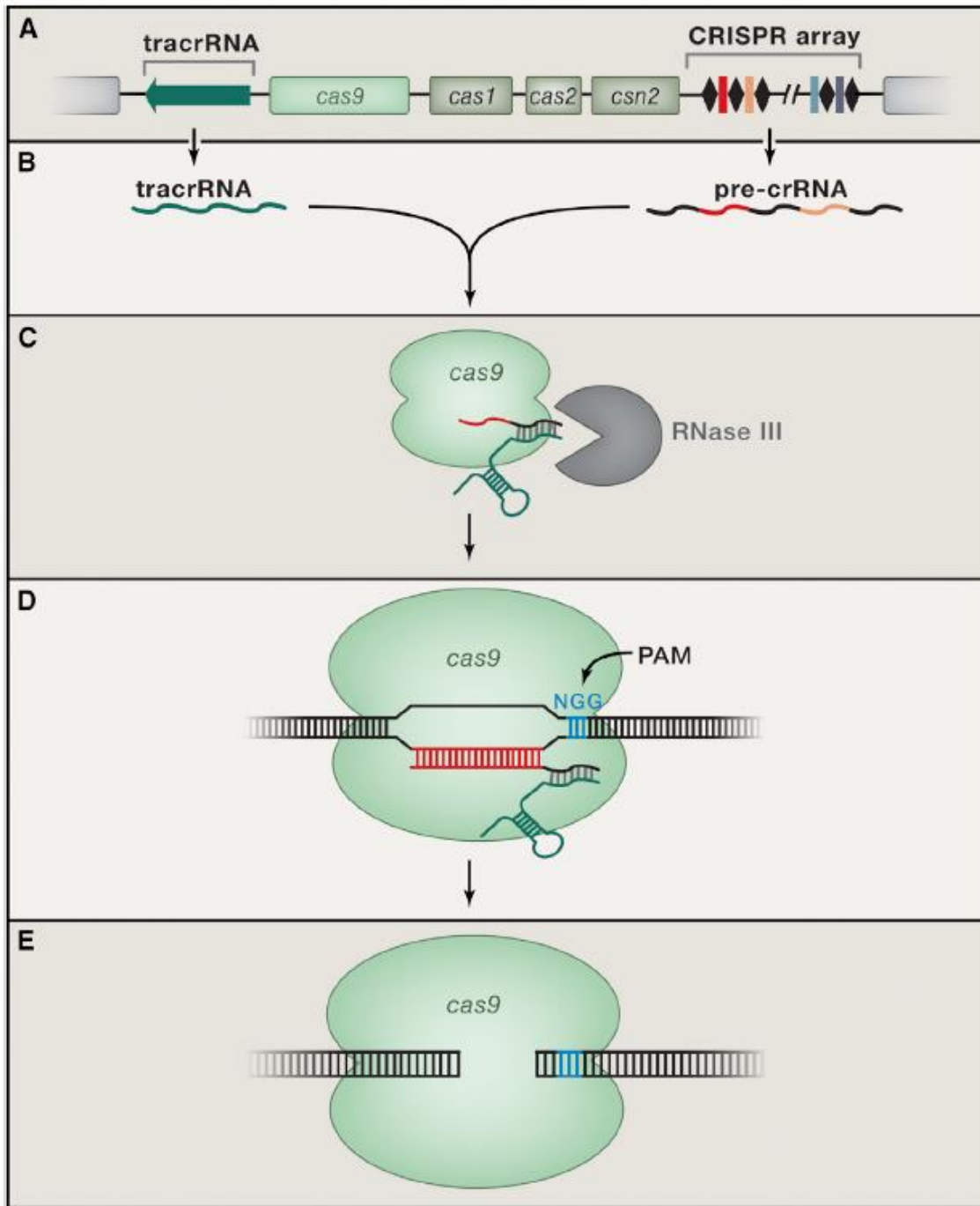
Class	Type	Subtype	Hallmarks	Example effector	Example organism	Studies Cited
Class 1	Type I		multisubunit effector complex; Cas3	Cascade	<i>E. coli</i>	Brouns et al., 2008
	Type III	III-A	multisubunit effector complex; Csm effector module; DNA targeting	Cas10-Csm	<i>S. epidermidis</i>	Marraffini and Sontheimer, 2008
		III-B	multisubunit effector complex; Cmr effector module; RNA targeting	Cmr	<i>P. furiosus</i>	Hale et al., 2009
Class 2	Type II		single protein effector; tracrRNA	<u>Cas9</u>	<i>S. thermophilus</i> <i>S. pyogenes</i>	Bolotin et al., 2005; Barrangou et al., 2007; Sapranaukas et al., 2011; Gasiunas et al., 2012 Deltcheva et al., 2011; Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Mali et al., 2013
	Type V		single protein effector; single-RNA guided	Cpf1	<i>F. novicida</i>	Zetsche et al., 2015

Os sistemas CRISPR são atualmente organizados em duas classes abrangentes:

Classe 1, que contém efetores de várias subunidades, e Classe 2, que contém efetores de proteínas individuais. Essas classes são subdivididas em cinco tipos (Makarova et al., 2015), com o tipo IV permanecendo um tipo putativo dentro da Classe 1.

Embora apenas os sistemas da Classe 2 tenham sido adaptados para a engenharia do genoma, os resultados descritos nesta revisão surgiram do estudo de uma diversidade de sistemas CRISPR-Cas. (Os sistemas Tipo III-B não são discutidos, mas representam um sistema incomum que tem como alvo o RNA em vez do DNA [Hale et al., 2009].)

**Fonte:** Eric S. Lander, 2016; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>



Classe 2, Sistema CRISPR-Cas9 Tipo II de *Streptococcus thermophilus*

Os sistemas Tipo II são os mais simples dos três tipos de sistemas CRISPR e têm sido a base para a tecnologia de edição de genoma.

(A) O locus contém uma matriz CRISPR, quatro genes codificadores de proteínas (*cas9*, *cas1*, *cas2* e *csn2*) e o *tracrRNA*. A matriz CRISPR contém regiões de repetição (losangos negros) separadas por regiões espaçadoras (retângulos coloridos) derivadas de fagos e outros elementos genéticos invasores. O gene *cas9* codifica uma nuclease que confere imunidade ao cortar o DNA invasor que corresponde aos espaçadores existentes, enquanto os genes *cas1*, *cas2* e *csn2* codificam proteínas que funcionam na aquisição de novos espaçadores do DNA invasor.

(B) A matriz CRISPR e o *tracrRNA* são transcritos, dando origem a um longo pré-crRNA e um *tracrRNA*.

(C) Esses dois RNAs hibridizam por meio de seqüências complementares e são processados em formas mais curtas por Cas9 e RNase III.

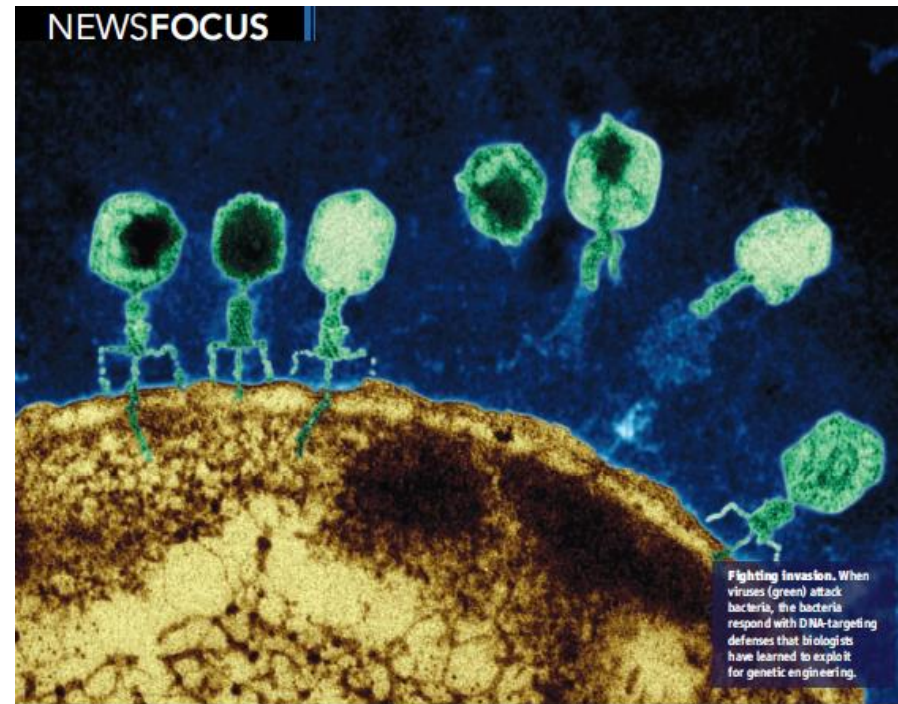
(D) O complexo resultante (Cas9 + *tracrRNA* + crRNA) então começa a pesquisar as seqüências de DNA que correspondem à seqüência espaçadora (mostrada em vermelho). A ligação ao local alvo também requer a presença do motivo adjacente do protoespaçador (PAM), que funciona como um identificador molecular para o Cas9 se agarrar.

(E) Uma vez que Cas9 se liga a um local alvo com uma correspondência entre o crRNA e o DNA alvo, ele cliva o DNA três bases a montante do local PAM. Cas9 contém dois domínios de endonuclease, HNH e RuvC, que clivam, respectivamente, as fitas complementares e não complementares do DNA alvo, criando extremidades cegas.

**Fonte:** Eric S. Lander, 2016;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041>

# O sistema CRISPR/Cas ocorre em três passos:

1. Aquisição do DNA viral;
2. Processamento dos RNA guias;
3. Degradação do DNA invasor.

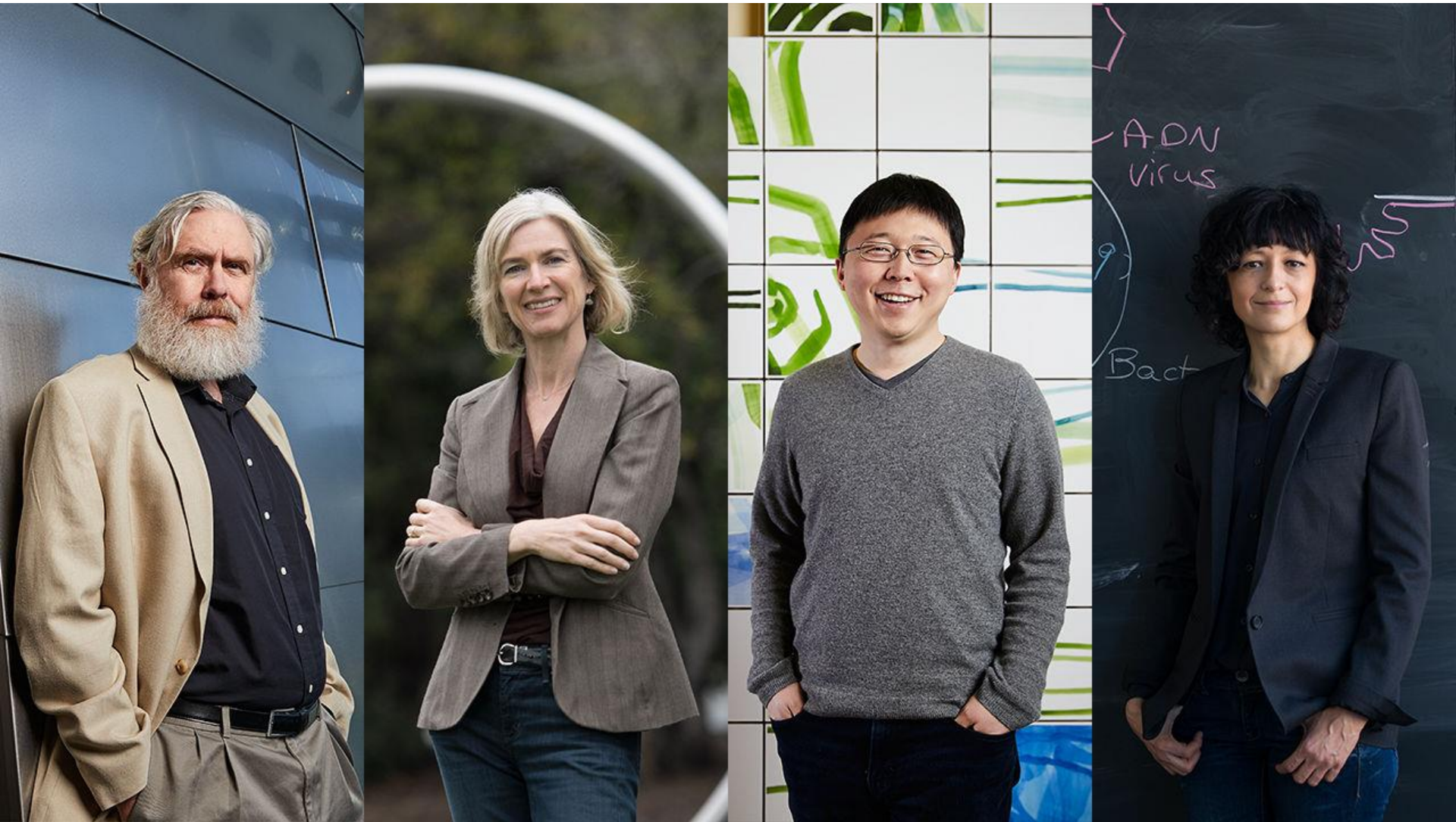


*Science* 23 Aug 2013:  
Vol. 341, Issue 6148, pp. 833-836  
DOI: 10.1126/science.341.6148.833

## The CRISPR Craze

A bacterial immune system yields a potentially revolutionary genome-editing technique



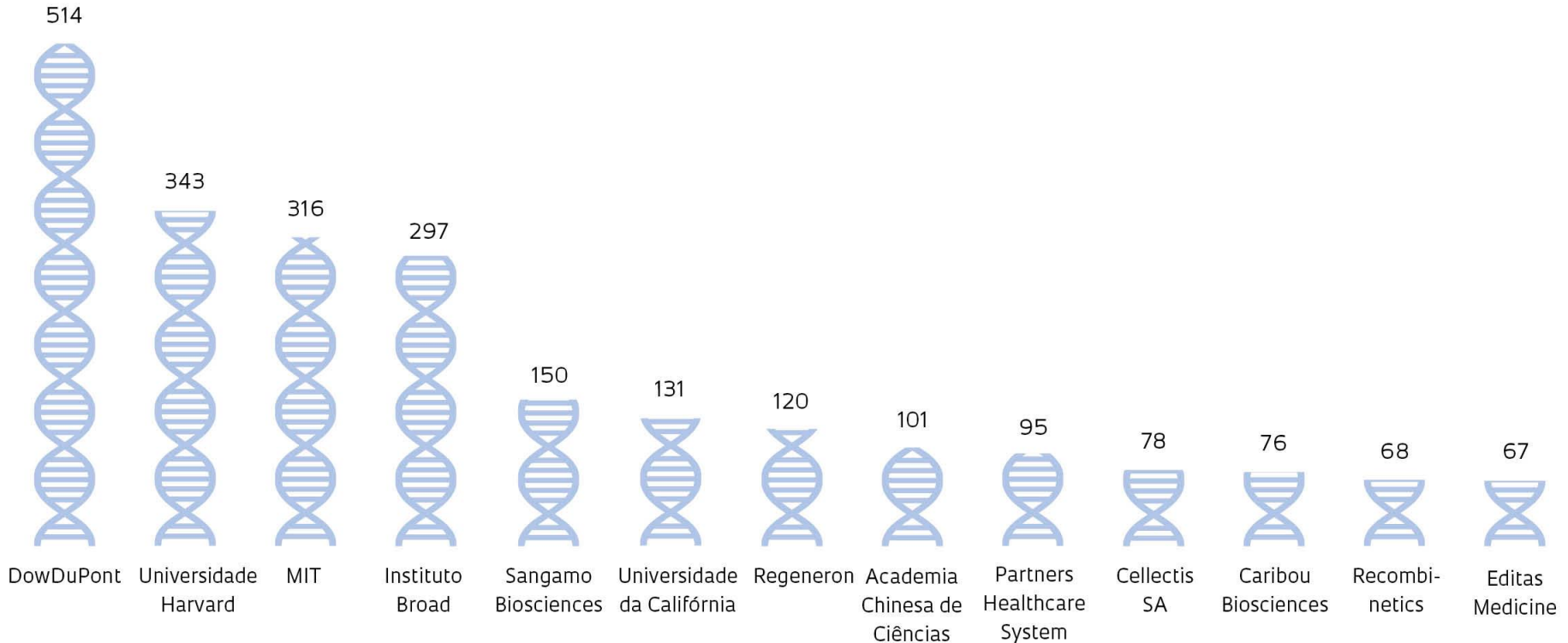


**Pioneiros do CRISPR (da esquerda para a direita): George Church, Jennifer Doudna, Feng Zhang e Emmanuelle Charpentier**



# A corrida pelo CRISPR-Cas9

Patentes e outros ativos de propriedade intelectual sobre edição gênica requeridos nos últimos anos por universidades e empresas no mundo

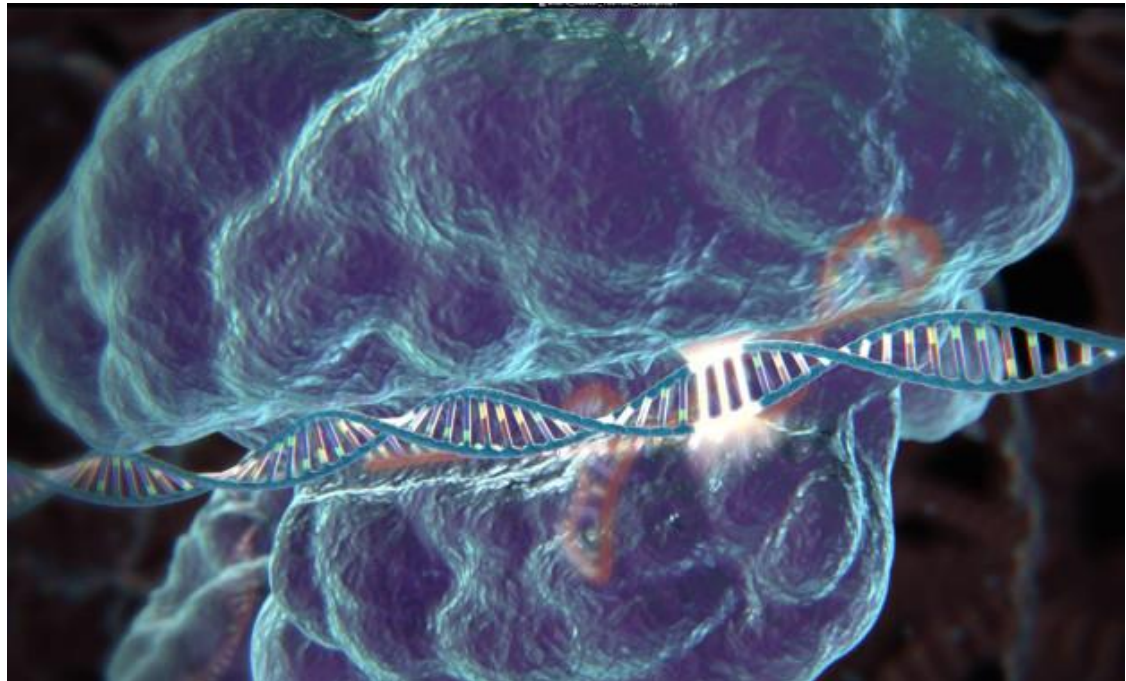


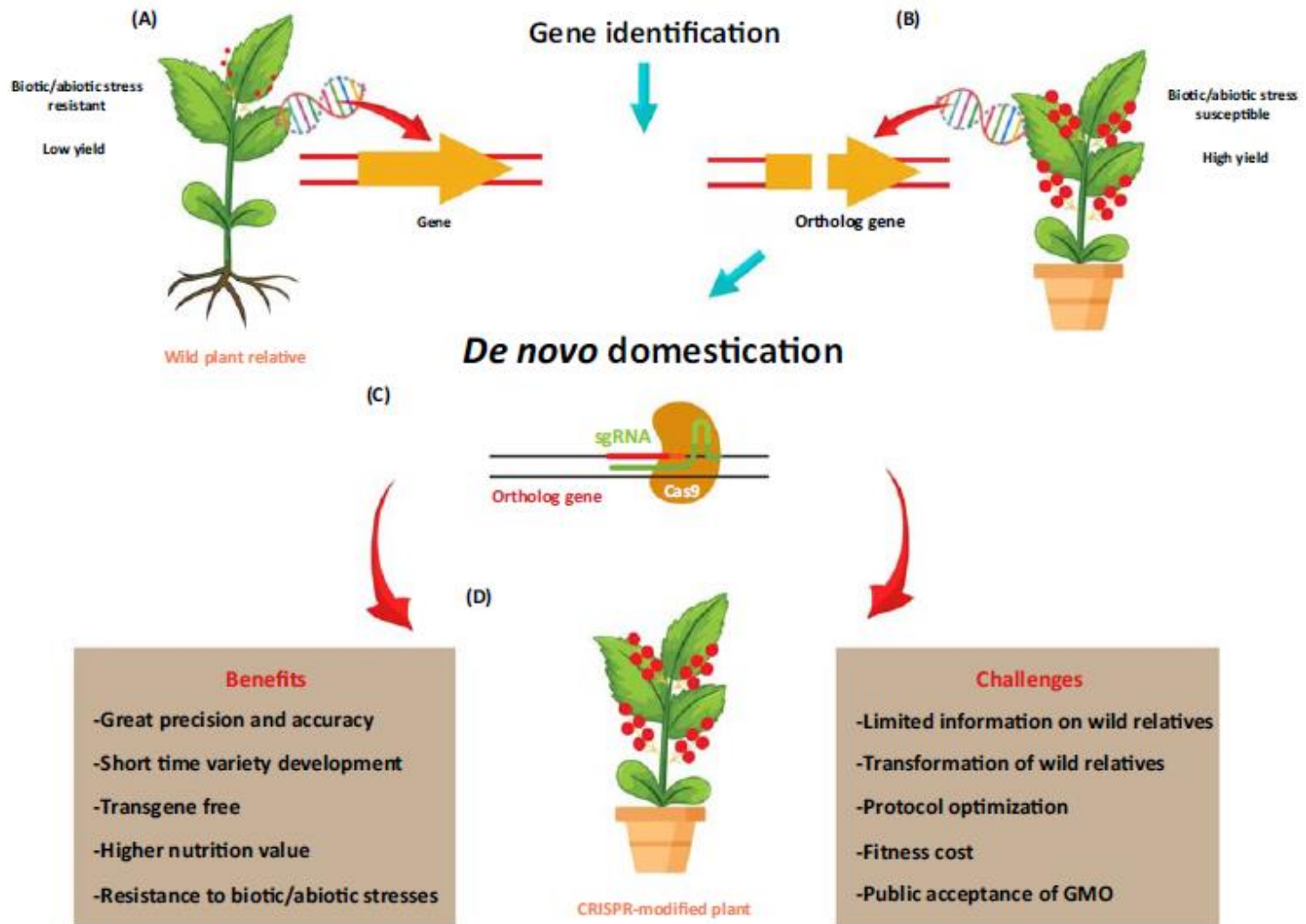
FONTE CRISPR: GLOBAL PATENT LANDSCAPE/ IRUNWAY

<https://revistapesquisa.fapesp.br/guerra-de-patentes/>

# Vantagens

- ✓ Simplicidade no desenho do alvo: formação do complexo ribonucleotídeo;
- ✓ 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)





Domesticação De Novo Mediada por CRISPR. (A) Embora parentes selvagens (por exemplo, cereja moída) não sejam tão produtivos quanto suas espécies parentes cultivadas (por exemplo, tomate), eles demonstram certas características altamente valiosas, como tolerância ao estresse biótico e abiótico. Os genes para tais características podem ser (e têm sido) identificados e usados em programas de melhoramento de precisão downstream.

(B) Em contraste, as variedades de culturas cultivadas, apesar de terem alto rendimento e características agrônômicas úteis, podem ser severamente afetadas por certos estresses bióticos e abióticos, especialmente patógenos de plantas. Uma maneira de melhorar isso é utilizar ortólogos de genes de resistência de parentes selvagens. Vice-versa, os genes de domesticação das variedades cultivadas podem ser transferidos para os parentes selvagens para aumentar seu rendimento e produtividade. Este último é referido aqui como domesticação de novo.

(C) As características de domesticação podem ser projetadas em parentes selvagens usando um sistema CRISPR-Cas9 guiado.

(D) Os benefícios e desafios das culturas CRISPR são destacados.

# A era da edição gênica

Pesquisadores corrigem em embriões humanos mutação associada a uma doença cardíaca

Ricardo Zorzetto

**P**esquisadores liderados pelo geneticista Shoukhrat Mitalipov, da Universidade de Saúde e Ciência de Oregon, nos Estados Unidos, usaram uma técnica de edição de genes para corrigir em embriões humanos uma mutação responsável pelo desenvolvimento tardio de uma doença cardíaca. Essa é a primeira demonstração feita nos Estados Unidos de que é possível eliminar uma cópia defeituosa de um gene e substituí-la por uma versão íntegra nas células do embrião sem, aparentemente, prejudicar o seu desenvolvimento. Valendo-se da mesma técnica, em março deste ano, a equipe de Jianqiao Liu, da Universidade Médica de Guangzhou, na China, já havia restaurado em embriões humanos dois genes ligados a duas formas de anemia, mas com um índice menor de sucesso.

No estudo publicado em 2 de agosto na revista *Nature*, Mitalipov e outros 30 pesquisadores dos Estados Unidos, da Coreia do Sul e da China usaram uma técnica de edição de genes chamada CRISPR-Cas9 para eliminar a cópia alterada do gene MYBPC3, que codifica uma proteína descoberta nos anos 1980 pelo biólogo brasileiro Fernando Reinach. Esse sistema de edição é formado por uma proteína (Cas9) ligada a uma molécula que a direciona a uma região de repetições do DNA conhecida pela sigla CRISPR (ver Pesquisa FAPESP nº 240). A Cas9 corta a

fito dupla de DNA e ativa nos embriões os mecanismos de reparo que produzem uma cópia íntegra do MYBPC3 – as células humanas têm duas, mas uma mutada já causa problemas. Antes das equipes de Mitalipov e de Liu, outros grupos na China haviam tentado usar a técnica para editar embriões humanos, sem sucesso.

Mitalipov e seu grupo conseguiram aumentar a eficiência e a segurança da técnica ao identificar o momento e o modo mais adequados de adotá-la. Eles injetaram a Cas9 no óvulo com o espermatozoide na fecundação – mesmo assim, ela só funcionou em metade dos casos. Quando foi inserida após a fecundação, os embriões apresentaram um problema chamado mosaïcismo: metade de suas células tinha o gene corrigido e metade, a versão defeituosa.

Inicialmente, os pesquisadores suspeitaram que, mesmo quando corrigiu o problema do embrião, a Cas9 tivesse atuado sobre 15 regiões diferentes da originalmente prevista. Uma análise posterior não encontrou defeitos nessas regiões, sugerindo que o problema estava na técnica de verificação usada. Nenhum embrião foi implantado em mulheres, algo não permitido nos Estados Unidos.

O trabalho prepara o caminho para o uso clínico de terapias baseadas nessa ferramenta, escreveram Nerges Winblad e Fredrik Lanmer, do Instituto Karolinska,

na Suécia, na *Nature*. E levanta questões éticas. Teme-se, por exemplo, que a edição de genes possa ser usada para gerar pessoas mais fortes ou inteligentes.

“A CRISPR-Cas9 é uma técnica poderosa, que pode corrigir uma mutação”, afirma a bióloga Ângela Saito, pesquisadora do Laboratório de Modificação do Genoma (LMG) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas. “Como há o risco de alterações inespecíficas e resultados indesejáveis, mais estudos precisam ser feitos antes que possa ser usada para tratar doenças hereditárias humanas.” Para o embriologista José Xavier Neto, coordenador do LMG do LNBio, “por ora, a edição de genes apresenta uma solução para um problema que pode ser resolvido de modo mais seguro com a seleção de embriões obtidos por fertilização *in vitro* antes da implantação no útero”. ■

Embriões nos estágios iniciais de multiplicação após reparo de gene feito com CRISPR-Cas9

Artigo científico

MA, H. et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature*. 2 ago. 2017.

VERBA VINCIT VIM

ORF

[https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2017/08/054\\_embrioes\\_258nova.pdf](https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2017/08/054_embrioes_258nova.pdf)



## Chinês é suspenso por ter criado bebês com gene alterado

Em 26 de novembro, antevéspera de sua apresentação no Segundo Encontro Internacional de Edição de Genomas Humanos, em Hong Kong, o biofísico chinês He Jiankui, de 34 anos, surpreendeu o mundo ao anunciar que tinha criado os primeiros bebês, um par de gêmeas, com genoma propositalmente alterado. Com o emprego da técnica de edição de DNA denominada CRISPR-Cas9, He alegou ter modificado um gene (o  $CCR_5$ ) de embriões que foram implantados em uma mulher e resultaram no nascimento de duas crianças com uma alteração que as torna resistentes à infecção por HIV, o vírus da Aids. Ele não forneceu o nome dos genitores dos bebês (o pai seria soropositivo), nem revelou onde o suposto procedimento teria sido feito. Apenas disse que as recém-nascidas passavam bem. Também não produziu evidência independente, como um artigo publicado em revista científica com avaliação por pares, de ter realizado o polêmico procedimento, questionável sob os pontos de vista ético, legal e de saúde. A CRISPR-Cas9 é uma técnica promissora, mas ainda experimental. Há risco de seu emprego produzir, além das alterações desejadas, mutações deletérias. No encontro científico no dia 28, He se disse "orgulhoso" do procedimento e afirmou que outra mulher carrega um bebê com a mesma modificação. A comunidade científica considerou o suposto experimento antiético, irresponsável e desnecessário (há formas mais simples e seguras de evitar a transmissão do HIV para um bebê). As autoridades chinesas também consideraram a experiência de He ilegal e antiética e suspenderam suas atividades acadêmicas. O pesquisador dava aulas na Universidade do Sul de Ciência e Tecnologia, em Shenzhen, e comandava duas biotech. Dias após o evento, um jornal chinês noticiou que o pesquisador estaria desaparecido, embora a universidade negue.

He Jiankui alega ter mudado gene usando técnica de edição de DNA



FOTOS: 1/CCS; 2/GETTY IMAGES; 3/RODRIGO MÜLLER/USP; 4/MARCO L. CASTRO/4; 5/LLIBRE/NET

<https://revistapesquisa.fapesp.br/chines-e-suspenso-por-ter-criado-bebes-com-gene-alterado/>



# Questões éticas

A CRISPR/CAS9 é técnica promissora, mas ainda experimental. Há risco em seu emprego produzir, além das alterações desejadas, mutações deletérias.

Restam evidências substanciais para justificar grande preocupação sobre a baixa eficiência e especificidade de repetições palindrômicas curtas regularmente intercaladas agrupadas (CRISPR), modificação genética (GM) mediada, apesar de melhorias relativamente pequenas em comparação com outros métodos GM. Esses problemas causam consequências persistentes, adversas, éticas e científicas para os animais GM, que podem nunca ser suficientemente resolvidas.

Jarrold Bailey ,  
Trends in Biotechnology, September 2019, Vol. 37, No. 9  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.05.002>

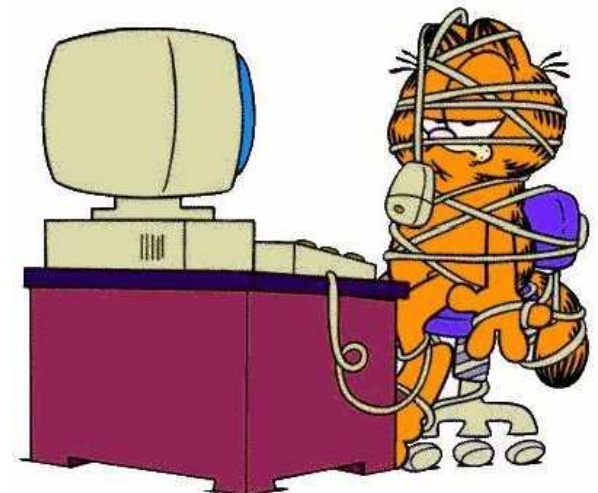
# VISUALIZANDO O PROCESSO...

[https://www.youtube.com/watch?v=UfA\\_jAKV29g](https://www.youtube.com/watch?v=UfA_jAKV29g)

<https://www.youtube.com/watch?v=TnzcwTyr6cE>

<https://www.youtube.com/watch?v=jAhjPd4uNFY>

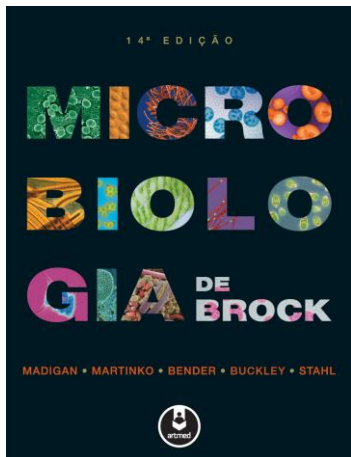
[https://www.ted.com/talks/jennifer\\_doudna\\_we\\_can\\_now\\_edit\\_our\\_dna\\_but\\_let\\_s\\_do\\_it\\_wisely](https://www.ted.com/talks/jennifer_doudna_we_can_now_edit_our_dna_but_let_s_do_it_wisely)



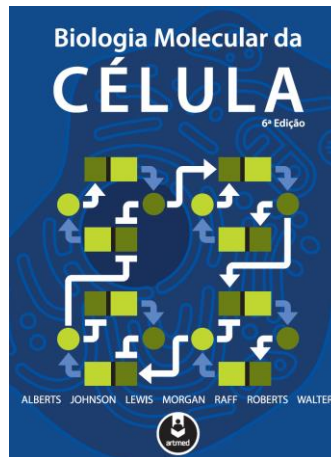
# ESTUDO DIRIGIDO

1. Imunidade mediada por CRISPR/CAS9 em bactérias e arqueias
2. Classificação de sistemas de CRISPR
3. A corrida pela patente

## Leitura recomendada



p. 312



p. 434; p. 497

