

# CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9 é uma técnica de edição genómica baseada no sistema imune adaptativo guiado por RNA presente em bactérias que desde a descoberta, em 2011, das suas capacidades de alteração direcionada e altamente específica do DNA, tem sido amplamente usada em engenharia genética com esse propósito, devido às vantagens que apresenta comparativamente a outros sistemas de edição génica – nomeadamente TALEN (“transcription activator-like effector nucleases”) e ZFN (“zinc finger nucleases”) -, das quais se destacam a facilidade e simplicidade de planeamento e aplicação experimental, custo reduzido, eficiência e capacidade de clivagem independentemente do estado de metilação do DNA. As suas características e inerente maleabilidade como ferramenta de edição do genoma levaram à sua disseminação pela comunidade científica.

CRISPR – “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” – são sequências de DNA repetitivas que, associadas a nucleases Cas – “CRISPR associated proteins” – permitem a bactérias defenderem-se de fagos e transferência de plasmídeos. Após uma primeira exposição a DNA exógeno, pequenos fragmentos destes podem ser incorporados no cromossoma bacteriano em *loci* CRISPR *spacer array*, tornando-se um registo genético de infeção. Estas sequências ao serem transcritas geram CRISPR RNA’s (crRNA) que contêm uma sequência complementar à exógena que foi incorporada. Numa segunda infeção a complementaridade entre o crRNA e os fragmentos de DNA do fago sinalizam a endonucleases Cas a sua degradação.

Foram já descritos seis tipos de sistemas CRISPR-Cas, sendo que o mais usado e bem caracterizado atualmente é o tipo II, que recorre a uma única endonuclease de DNA, Cas9 (isolada de *Streptococcus pyogenes*), para reconhecimento e clivagem de pontas cegas da dupla cadeia de DNA de qualquer sequência que seja complementar ao RNA guia com 20 nucleótidos. Após a clivagem o DNA pode ser reparado por NHEJ (“non-homologous end joining”), o que pode gerar mutações “indel” aleatórias, ou por reparação direcionada por homologia, muito mais fiável, em que esta ocorre através de um template de reparação homólogo.

A enzima SpyCas9 tem 1368 aminoácidos e vários domínios, que forma uma estrutura bilobada, com um lobo de reconhecimento alfa-helicoidal e um lobo nucleásico. Os seus dois domínios de clivagem são o domínio nucleásico tipo HNH, que cliva a 3 pares de bases a montante da sequência PAM na cadeia-alvo (“protospacer adjacent motif”, sequência conservada adjacente à sequência guia – em SpyCas9 é 5'-NGG-3', sendo N qualquer nucleótido); e o domínio nucleásico tipo RuvC, que cliva no mesmo local, mas na cadeia oposta à cadeia-alvo. A enzima só funciona quando ligada ao tracrRNA, pois necessita deste para ocorrer a sua ativação estrutural. Após formação do híbrido de reconhecimento RNA-DNA e da clivagem de ambas as cadeias, a enzima mantém-se ligada ao DNA recém-clivado até outros fatores celulares removerem a enzima.

Esta técnica permite, portanto, perceber a organização funcional e estrutural do genoma de qualquer organismo ao nível sistemático, assim como a ligação entre variações genéticas e certos fenótipos biológicos. Do ponto de vista da terapia génica, possibilita a correção direcionada de mutações prejudiciais/desfavoráveis.

## Referências

Jiang, F. & Doudna, J. (2017) "CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms". Annual Review of Biophysics. Vol. 46: 505-529.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system". Nature protocols, 8(11), 2281.

Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. (2014) "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering". Cell 157(6): 1262-1278