

CRISPR-Cas9

O sistema **CRISPR** (do inglês **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats) é usado como ferramenta de edição genómica. Foi encontrado em bactérias, *Streptococcus pyrogenes*, onde funciona como um mecanismo imunológico de defesa contra DNA viral.

Este sistema é composto por uma enzima, Cas9, uma endonuclease com atividade de helicase, a qual está associada uma cadeia de RNA, crRNA (CRISPR RNA). Este, possui uma sequência de, no mínimo, 20 nucleótidos que é complementar à sequência de dsDNA que se pretende cortar. O crRNA funciona em conjunto com o tracrRNA (trans-activating crRNA), responsável pela ligação à Cas9, e ambos formam um complexo designado por guideRNA. Este vai direcionar a Cas9, ligando-se ao dsDNA por complementaridade de bases.

Para ocorrer esta ligação é ainda necessária a presença da sequência PAM (Protospacer Adjacent Motif), um motivo constituído por três nucleótidos (NGG) situados a 3' na cadeia que se pretende clivar do dsDNA. Esta, é uma sequência de DNA, em que o crRNA não hibrida, e vai servir de sequência de reconhecimento para o corte pela Cas9, que vai clivar o dsDNA genómico, três nucleótidos a montante dessa sequência PAM, pelos seus domínios catalíticos (RuvC-like domain e HNH-like domain), o que resulta num double strand break (DSB) com extremidades cegas.

O DNA clivado é reconhecido pela célula como danificado e vai ser reparado, através dos mecanismos de reparação de DNA, em que se for introduzido um vetor plasmídico com o molde do DNA que pretende clivar, ocorre recombinação homóloga (HDR), caso contrário vai ocorrer um processo de non-homologous end joining (NHEJ).

Aplicações

Este sistema tem diversas aplicações como:

- ☞☞☞ Tratamento de doenças humanas em modelos animais através da correção dos alelos associados à doença (edição genómica *in vivo*)
- ☞☞☞ Terapia celular (edição genómica *ex vivo*)
 - Edição genómica de células T de pacientes com cancro ou doenças autoimunes
 - Edição genómica de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) e células estaminais hematopoiéticas (HSC) para tratamento de doenças como hemofilia B e regeneração de tecidos
- ☞☞☞ Biossíntese de produtos metabólicos de interesse
 - Por eliminação ou atenuação de vias metabólicas competidoras e reprogramação de sinais celulares, levando a um aumento de produção do composto pretendido

Exemplo

- ☞☞☞ Edição genética de células estaminais

Fibrose cística é uma doença genética causada por uma mutação por deleção no gene CFTR no cromossoma 7, que origina uma proteína não funcional (falta-lhe um aminoácido). Esta doença caracteriza-se pela acumulação de muco nas vias respiratórias e ductos pancreáticos, o que causa problemas respiratórios e na digestão.

Usando o sistema CRISPR-Cas9 é possível corrigir este gene. São isoladas células estaminais do paciente, estas são colocadas em cultura e corrigidas através da injeção da Cas9 juntamente com um gRNA direcionado para o gene CFTR. Insere-se também uma cadeia de DNA contendo a sequência correta do CFTR. A Cas9 cliva o gene mutado, e a cadeia de DNA inserida vai servir de molde a reparação do gene por HDR, gerando-se assim o gene funcional. As células com a mutação corrigida vão ser novamente transplantadas para o paciente.

Anexos

Referências:

- Horizondiscovery.com. (2019). *CRISPR-Cas9 - CRISPR Gene Editing*. [online] Available at: <https://www.horizondiscovery.com/gene-editing/crispr-cas9> [Accessed 24 Mar. 2019].
- Pt.wikipedia.org. (2019). *CRISPR*. [online] Available at: <https://pt.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
- Ramos, A. (2016). *CRISPR/Cas9: uma ferramenta de edição genética para investigação e novas terapias*. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Reference, G. (2019). *What are genome editing and CRISPR-Cas9?*. [online] Genetics Home Reference. Available at: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/genomeediting>
- Tian, P., Wang, J., Shen, X., Rey, J., Yuan, Q. and Yan, Y. (2017). Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(3), pp.219-225.
- Yourgenome.org. (2019). *What is CRISPR-Cas9?*. [online] Available at: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-crispr-cas9>
- Zhang, C., Quan, R. and Wang, J. (2018). Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Human Molecular Genetics*, 27(R2), pp.R79-R88.
- Zhou, W., Hu, L., Ying, L., Zhao, Z., Chu, P. and Yu, X. (2018). A CRISPR–Cas9-triggered strand displacement amplification method for ultrasensitive DNA detection. *Nature Communications*, 9(1).
- Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, et al (2013) Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients. *Cell Stem Cell* 13: 653–658