

A biotecnologia envolvida no sistema CRISPR

Biotechnology involved in the CRISPR system

Kledson Lopes Barbosa^{1*}, Glensimon Souza Silva Cavalcante²

¹Doutorando no Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia - PPGQB – UFAL

²Graduação em Biomedicina. Especialização em Citopatologia. Professor Monitor de Química pela Secretaria de Estado da Educação e do Esporte – Alagoas.

Resumo

Introdução: o sistema CRISPR trata-se de uma ferramenta molecular, ordenada por um RNA guia e a enzima Cas9 capaz de corrigir a expressão de uma gama de genes alvo. **Objetivo:** apresentar uma revisão da literatura acerca do sistema CRISPR e sua contribuição para a biotecnologia. **Metodologia:** trata-se de uma revisão bibliográfica realizada com base em periódicos nacionais e internacionais com vista à reunir as melhores informações acerca do Sistema CRISPR. **Resultados:** após compilação dos dados, verificou-se que o sistema CRISPR tem se tornado um artifício promissor da biologia molecular, haja vista sua versatilidade de uso em diferentes sistemas e sua capacidade de destruir múltiplos genes invasores. **Conclusão:** nesse sentido, constata-se que a partir do sistema CRISPR podem surgir novas alternativas para o tratamento terapêutico de diversas doenças ligadas ao genoma.

Palavras-chave: DNA. Edição genômica. CRISPR Cas9. Engenharia genômica. Terapias CRISPR.

Abstract

Introduction: the CRISPR system is a molecular tool, ordered by a guiding RNA and a Cas9 enzyme able of correcting the expression of target genes. **Objective:** to present a review of the literature on the CRISPR system and its contribution to biotechnology **Methodology:** this is a bibliographic review based on national and international journals to gather the best information about the CRISPR System. **Results:** after compiling the data, it was verified that the CRISPR system has become a promising artifice for molecular biology, given its versatility of use in different systems and its ability to destroy multiple invading genes. **Conclusion:** in this sense, it can be seen that from the CRISPR system new alternatives can arise for the therapeutic treatment of various diseases linked to the genome.

Keywords: ADN. Genome Editing. CRISPR Cas9. Genome Engineering. CRISPR Therapies.

INTRODUÇÃO

O sistema CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), que em português corresponde a “repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente intercaladas” trata-se de um aprimorado sistema imunológico adaptativo encontrado em procariontes. Tal sistema se baseia em repetições curtas de DNA separadas por sequências de 26-72pb, que incluem espaçadores estruturais de DNA exógeno (FU; SUN; YAN, 2015; YIN et al., 2013).

Estudos sobre o sistema CRISPR/Cas têm demonstrado que o RNA transcrito é processado por proteínas Cas que, por conseguinte, coordena as proteínas interferentes para os ácidos nucleicos alvos. Dessa forma, os espaçadores atuam de modo a eliminar os elementos genéticos invasores no contato posterior (YOSEF; GOREN; QJMRON, 2012).

A nuclease Cas9 foi descoberta através de análises de bioinformática que revelou que existem dois possíveis domínios de nuclease: HNH e RuvC-like (MAKAROVA et al., 2006). Estudos genéticos mostraram que a proteína Cas9 da bactéria *Streptococcus thermophilus* é extremamente importante para defesa contra vírus (BARRANGOU et al., 2007). As respostas de defesa induzida pelo sistema CRISPR/Cas têm estimulado o estudo da imunidade adaptativa, e seu mecanismo de atuação na regulação do comportamento de bactérias tem sido alvo de estudos importantes (FU; SUN; YAN, 2015; WESTRA; BUCKLING; FINERAN, 2014).

CRISPR/Cas9, atualmente considerado um instrumento da engenharia genética, é ordenado por um RNA guia e a enzima Cas9 (CARRINGTON et al., 2015). Através do sistema CRISPR concebe-se avanço na mutação dirigida de muitos sistemas (GRATZ et al., 2013; HWANG et al., 2013; MALI et al., 2013). Embora seu sistema de adaptação, que é a aquisição de novos espaçadores no genoma, não esteja totalmente elucidado (COLLONNIER et al., 2017).

O mecanismo que ocorre nos procariontes é desempenhado por pequenas moléculas de RNA que direcionam endonucleases efectoras de Cas para alcançarem os ele-

Correspondente/Corresponding: *Kledson Lopes Barbosa – Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas – End: Av. Lourival Melo Mota, S/N Tabuleiro do Martins, Maceió – AL CEP: 57072-900 – Tel: (82) 98712-9491 – E-mail: kledsonlopesb@gmail.com

mentos genéticos estranhos que agem de modo a clivar o DNA, dependente da endonuclease por ligação alvo (SOPPE; LEBBINK, 2017).

Quanto à importância do sistema CRISPR, acredita-se que este método seja um artifício promissor para solucionar e corrigir a expressão e função de muitos genes alvo, além de vislumbrar o tratamento de algumas doenças (FANG; WANG, 2016). Desta forma, os estudos direcionados por CRISPR tornaram-se uma ferramenta importante para verificar as possibilidades de edição terapêutica do genoma e de elementos não codificantes (ANDERSSON et al., 2014).

Nesse sentido, o presente estudo foi motivado pelo fato de que o sistema CRISPR ainda é um tema pouco conhecido. Sendo assim, é de extrema importância o aprofundamento deste tema para fornecer uma visão geral sobre edição genômica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura sobre a biotecnologia envolvida no sistema CRISPR, descrevendo sobre a edição genômica e os mecanismos de ação bem como as formas de aplicação do sistema CRISPR/Cas9.

METODOLOGIA

O estudo trata-se de uma revisão bibliográfica realizada com base em periódicos nacionais e internacionais. As consultas foram realizadas nas bibliotecas online: Bireme, LILACS, SciELO, Pubmed e portal de periódicos CAPES. As buscas utilizaram o unitermo "CRISPR". A pesquisa bibliográfica foi realizada para reunir as melhores informações a cerca do tema CRISPR. Para isso, não houve restrições de data e idioma de publicação.

Foram selecionados para este estudo, o total de 36 artigos publicados em diferentes bancos de dados. Os principais temas abordados podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Quantitativo de artigos incluídos neste estudo

Tema das publicações	Nº de Referências
Sistema CRISPR/Cas	15
Ativação do RNA guia – CRISPR	5
Aplicação do potencial Cas	3
CRISPR/Cas – Sistema Imune	3
Perspectivas de terapia com CRISPR	10

Fonte: Autoria própria

DESENVOLVIMENTO

Edição genômica

A complexidade do DNA incentivou o desenvolvimento de alguns sistemas capazes de promover sua edição, garantindo precisão e eficiência. Quanto esses sistemas, as nucleases de DNA detentoras de sequências especifi-

cas, tornaram-se conhecidas por aumentar a eficiência na edição de genes ou genomas de animais e vegetais. Dentre as nucleases de tamanha importância estão a dedo de zinco (ZFNs) e as de efeito ativador da transcrição (TALENs), sendo as mais utilizadas em proteínas quiméricas (GAJ; GERSBACH; BARBAS, 2013).

Nas mesmas perspectivas que as nucleases, surgiu o sistema CRISPR, baseado em um RNA guia associado a uma proteína Cas, tornando-se uma ferramenta revolucionária na edição de genes (JINEK et al., 2012). Sua exploração levou a consideração de que seu principal papel estaria na promoção da defesa adaptativa em procariontes contra ácidos nucleicos estranhos (HORVATH; BARRANGOU, 2010).

O sistema CRISPR/Cas refere-se a espaçadores curtos variáveis que se separam por repetições curtas transcritas em um único RNA guia. Esse RNA guia é responsável por gerar um complexo funcional com nuclease associado a Cas9, que irá clivar o DNA invasor imediatamente (LEI et al., 2014). O complexo funcional de ribonucleoproteína age de modo a ligar-se ao DNA alvo através do emparelhamento de bases mediado pelo RNA guia, onde ocorre posteriormente a clivagem da cadeia dupla de DNA pela Cas9 (JINEK et al., 2012).

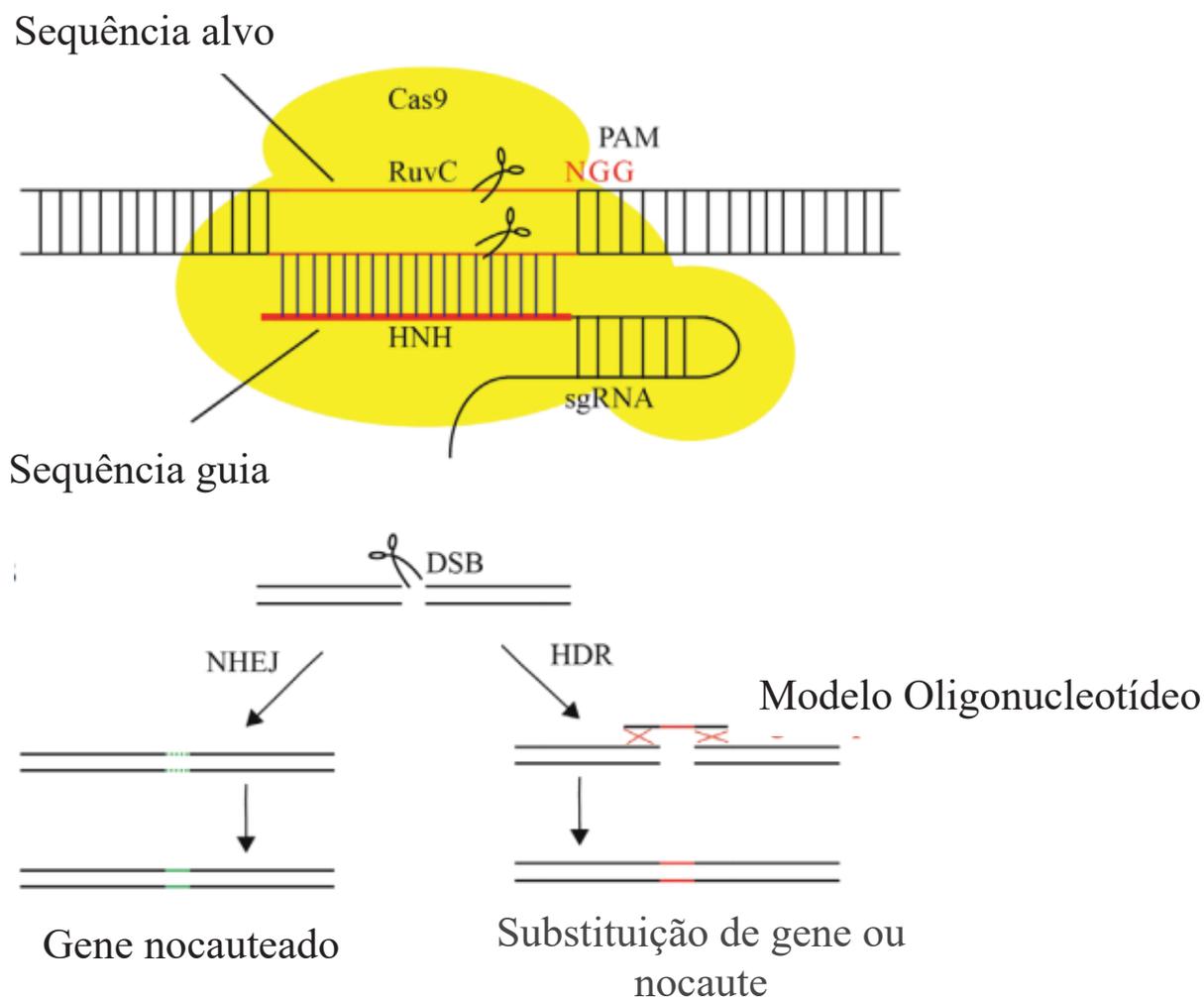
Acredita-se que a técnica de CRISPR seja a mais promissora para engenharia de genomas em células de mamíferos, e os estudos têm demonstrado o mesmo a partir de experimentos de validação (HSU; LANDER; ZHANG, 2014). Sabe-se da existência de três sistemas CRISPR/Cas, sendo I, II e III. Entretanto, apenas o sistema CRISPR/Cas II é o membro de nucleases que demonstra ser o mais propício para uso em engenharia genômica (SONTHEIMER; BARRANGOU, 2015).

Embora o sistema CRISPR/Cas9 seja conhecido na edição de genoma, outras aplicações estão sendo investigadas no âmbito dessa tecnologia. Alguns estudos têm reportado uma versão Cas9 cataliticamente inativa (dCas9). Por outro lado, verificou-se que o sítio catalítico de dCas9 pode tornar-se ativo ao se ligar ao DNA dependente de sgRNA (RNA sintético). Esse mecanismo de ativação catalítica ocorre através da fusão da CRISPR RNA com o acessório trans (*trans-activating CRISPR RNA*) que é essencial para a ativação do pré-CRISPR (QI et al., 2013).

Mecanismos de ação CRISPR

São vastas as informações que constam na literatura sobre a funcionalidade do sistema CRISPR/Cas9 a partir de dois componentes, Cas9 e o sgRNA (RNA sintético). A partir da determinação cristalográfica de Cas9 (Figura 1), observou-se a presença de dois domínios de endonucleases funcionais: HNH (*McrA-like*), que cliva a cadeia complementar ao crRNA (CRISPR RNA), e RuvC, que cliva a cadeia oposta não complementar.

Figura 1 – Diagrama esquemático da edição de CRISPR/Cas9



Fonte: Liu et al. (2017)

Conforme se observa na figura 1, o sgRNA comporta-se como um guia para identificar a sequência alvo acompanhada de uma região adjacente conhecida como *proto-spacer* adjacente motive (PAM), a qual possui uma sequência consenso NGG, onde N é qualquer nucleotídeo e G, o nucleotídeo guanina. A presença da região PAM é essencial para a clivagem do DNA alvo pela Cas9. A ligação do sgRNA por complementariedade e a presença de PAM adjacente ao DNA alvo permite a dupla clivagem da cadeia de DNA (*double strand break – DSB*) pela Cas9 (LIU et al., 2017).

Após formação do DSB, o mesmo pode ser reparado pelo NHEJ, que geralmente causa desajustes e inserção/deleção. Por outro lado, quando há presença de um modelo Oligo, o HDR induz a substituição genética específica (JACOBS et al., 2015; LIU et al., 2017).

Perspectivas do CRISPR nas terapias

Lattanzi et al. (2017) investigaram a correção da duplicação do exon 2 em mioblastos com distrofia muscular de Duchenne por um único sistema de CRISPR/Cas9. Através do estudo, reportaram a restauração da expressão da proteína distrofina do tipo selvagem ao nível de transcrição em miotubos derivados de mioblastos com o genoma editado na ausência de seleção, trazendo novas perspectivas para o tratamento de várias doenças genéticas, tal como a distrofia muscular.

Doenças hematológicas, como a Leucemia Mielóide Aguda (LMA), também têm sido investigadas através da aplicação de CRISPR/Cas. Em um desses estudos, Brabetz et al. (2017) utilizaram a mutação R140Q de IDH2 (gene) como modelo para remover e reproduzir mutações associadas à LMA a partir da introdução de um DNA molde no locus do gene endógeno por recombinação homóloga.

Os achados reportaram novas perspectivas para geração e remoção de mutações genéticas relacionadas com a leucemia em posições definidas e controladas em células blásticas primários de LMA. Sendo assim, este inquérito esboça bases para futuras abordagens terapêuticas no tratamento da leucemia.

As respostas de células T foram avaliadas mediante aplicação do CRISPR/Cas9 sob o linfoma por Ramos, Heslop e Brenner, (2016). Nesse estudo os autores detectaram a possibilidade de manipular células T autólogas *in vitro*, visando à expressão de receptores de antígenos químicos específicos. As respostas deste estudo pressupõem vantagens para seu uso no futuro, bem como demonstra as potencialidades do sistema CRISPR/Cas9 no enfrentamento do câncer.

Outros estudos extremamente relevantes buscaram

eliminar o genoma de HIV-1 de células T-linfoides humanas pela edição de gene mediado por CRISPR/Cas9. Os Resultados reportaram redução significativa da replicação de HIV-1 em culturas de células T CD4+ infectadas, uma vez que reduziu também a carga viral. Dessa forma, abre-se mais um caminho terapêutico para eliminar o DNA do HIV-1 assim como aumentar as chances de cura da Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (KAMINSKI et al., 2016a; KAMINSKI et al., 2016b).

O sistema CRISPR/Cas9 e as ferramentas moleculares de endonucleases específicas de sequências buscam pela possibilidade de reparar permanentemente o genoma humano. Em busca dessa realidade de grande importância clínica, a tecnologia CRISPR/Cas9 tem sido fortemente explorada (Tabela 2), principalmente em pesquisas que tratam de doenças humanas (NICHOLSON; PEPPER, 2016).

Tabela 2 – Sistema CRISPR investigado em diferentes doenças humanas

Doença	Mutação	CRISPR	Teste de funcionamento	Referência
Doença granulomatosa crônica	Uma única mutação intrônica no gene CYBB	CRISPR/Cas9D10A, nickase; mediado por doador HR.	Função de macrófagos diferenciados <i>in vitro</i>	(FLYNN et al., 2015)
Síndrome de Bath	1 pb supressão ou mutação	CRISPR/Cas9 e PiggyBac, mediado por doador HR.	Cardiomiócito diferenciado <i>in vitro</i> , contração muscular.	(WANG et al., 2014)
B-Talassemia	C > T Mutação no gene HBB.	CRISPR/Cas9 e PiggyBac, mediado por doador HR.	Diferenciação hematopoietica, expressão genética.	(XU et al., 2015)
B-Talassemia	A/G e TCTT no gene HBB.	CRISPR/Cas9 e PiggyBac, mediado por doador HR	Diferenciação hematopoietica, expressão genética.	(XIE et al., 2014)
Fibrose cística	CFTR F508.	CRISPR/Cas9, mediado por doador HR.	Organoides intestinais diferenciados <i>in vitro</i> ; ensaio de Forskolin.	(SCHWANK et al., 2013)
Distrofia muscular de Duchenne	Deleção de 75484 pb, incluindo exón 44 do gene da distrofia.	CRISPR/Cas9, mediado por doador HR.	Células musculares esqueléticas diferenciadas <i>in vitro</i> ; expressão genética.	(LI et al., 2015)
Hemofilia A	Inversão do gene (140 kb e 160 kb do íntron 1 até 22.	Proteína Cas9 e o plasmídeo de DNA de sgDNA administrados por um sistema de microporador.	Células endoteliais diferenciadas <i>in vivo</i> ; Transplante em um rato com hemofilia.	(PARK et al., 2015)

A aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 requer o uso de vetores que codifiquem sgrRNA (RNA guia) assim como Cas9, visto que é essencial a presença de um sistema de entrega de DNA seguro para ocorrer a edição de genes. Por estas questões, já se investiga uma forma de entrega direta do mRNA e proteína, e, até mesmo o desenvolvimento de novos vetores (WANG et al., 2014; XU et al., 2015).

Por questões éticas e critérios de segurança a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 nas terapias que envolvem humanos será um desafio de longo prazo a ser enfrentado (SCHWANK et al., 2013; XIE et al., 2014), até que se torne uma tecnologia aceita pela prática médica, através de validação de ensaios clínicos, e reconhecida em todo o mundo.

CONCLUSÃO

Por fim, CRISPR/Cas9 vem tornando-se um padrão ouro na edição genômica, possibilitando a manipulação de genes para criar uma variedade de mutações em diferentes células. Há de se ressaltar também suas possibilidades futuras no que diz respeito ao redimensionamento das terapias em doenças hereditárias e ou genéticas. Em adição, CRISPR/Cas9 torna-se uma grande promessa para cooperar em diversas terapias, uma vez que, possui características específicas como fácil manipulação, significativa eficiência e ampla aplicação.

REFERÊNCIAS

- ANDERSSON, R. et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. **Nature**, [s.l.], v. 507, n. 7493, p. 455-461, 2014.
- BARRANGOU, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, [s.l.], v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.
- BRABETZ, O. et al. RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations. **Mol. Ther. Nucleic Acids**, Cambridge, v. 6, p. 243-248, 2017.
- CARRINGTON, B. et al. CRISPR-STAT: an easy and reliable PCR-based method to evaluate target-specific sgRNA activity. **Nucleic Acids Res.**, London, v.43, n.22, p. 1-8, 2015.
- COLLONNIER, C. et al. Towards mastering CRISPR-induced gene knock-in in plants: Survey of key features and focus on the model *Physcomitrella patens*. **Methods**, [s.l.], v. 121-122, p. 113-117, 2017.
- FANG, H.; WANG, W. Could CRISPR be the solution for gene editing's Gordian knot? **Cell Biol. Toxicol.**, Princeton, v. 32, n. 6, p. 465-467, 2016.
- FLYNN, R. et al. CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPSCs. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 43, n. 10, p. 838-848, 2015.
- FU, Q.; SUN, J.; YAN, Y. [The functional aspects of bacterial CRISPR-cas systems and interactions between phages and its bacterial hosts—a review]. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 55, n. 3, p. 251-257, 2015.
- GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, Talen, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 397-405, 2013.
- GRATZ, S. J. et al. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. **Genetics**, Austin, v. 197, n. 4, p. 1029-1035, 2013.
- HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. **Science**, New York, v. 327, n. 5962, p. 167-170, 2010.
- HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, [s.l.], v. 157, n. 6, p. 1262-1278, 2014.
- HWANG, W. Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 31, n. 3, p. 227-229, 2013.
- JACOBS, T. B. et al. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. **BMC Biotechnol**, London, v. 15, n. 1, p. 16, 2015.
- JINEK, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**, New York, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.
- KAMINSKI, R. et al. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. **Gene Ther.**, Basingstok, v. 23, n. 8-9, p. 690-695, 2016a.
- KAMINSKI, R. et al. Elimination of HIV-1 genomes from human t-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 gene editing. **Sci Rep.**, London, v. 6, 2016b.
- LATTANZI, A. et al. Correction of the exon 2 duplication in dmd myoblasts by a single CRISPR/Cas9 system. **Mol Ther. Nucleic Acids**, San Diego, v. 7, p. 11-19, 2017.
- LEI, Y. et al. CRISPR-P: a web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. **Mol. Plant**, Oxford, v. 7, n. 9, p.1494-1496, 2014.
- LI, H. L. et al. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. **Stem Cell Reports**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 143-154, 2015.
- LIU, X. et al. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s.l.], 2017.
- MAKAROVA, K. S. et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biol. Direct.**, London, v. 1, n. 1, p. 7, 2006.
- MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, New York, **N.Y.**, v. 339, n. 6121, p. 823-826, 2013.
- NICHOLSON, S. A.; PEPPER, M. S. CRISPR-Cas: Revolutionising genome engineering. **S. Afr. Med. J.**, Cape Town, v. 106, n. 9, p. 870, 2016.
- PARK, C. Y. et al. Functional Correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia a patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 213-220, 2015.
- QI, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**, [s.l.], v. 152, n. 5, p. 1173-1183, 2013.
- RAMOS, C. A.; HESLOP, H. E.; BRENNER, M. K. CAR-T Cell therapy for lymphoma. **Ann. Rev. Med.**, Palo Alto, v. 67, n. 1, p. 165-183, 2016.
- SCHWANK, G. et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 13, n. 6, p. 653-658, 2013.
- SONTHEIMER, E. J.; BARRANGOU, R. The bacterial origins of the CRISPR genome-editing revolution. **Hum. Gene Ther.**, New York, v. 26, n. 7, p. 413-424, 2015.
- SOPPE, J. A.; LEBBINK, R. J. Antiviral goes viral: harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 25, n. 10, p. 833-850, 2017.
- WANG, G. et al. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. **Nat. Med.**, New York, v. 20, n. 6, p. 616-623, 2014.
- WESTRA, E. R.; BUCKLING, A.; FINERAN, P. C. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 12, n. 5, p. 317-326, 2014.
- XIE, F. et al. Seamless gene correction of β -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. **Genome Res.**, New York, v. 24, n. 9, p. 1526-1533, 2014.
- XU, P. et al. Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target the HBB IVS2-654 (C > T) mutation in β -thalassemia-derived iPSCs. **Sci. Rep.**, London, v. 5, 2015.
- YIN, S. et al. The evolutionary divergence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* is reflected in clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) spacer composition. **Appl Environ. Microbiol.**, Washington, v. 79, n. 18, p. 5710-5720, 2013.
- YOSEF, I.; GOREN, M. G.; QIMRON, U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 40, n. 12, p. 5569-5576, 2012.

Submetido em: 13/12/2017

Aceito em: 07/03/2018