

CRISPR/Cas9

Universidade de Aveiro

*Imortalidade, Vitalidade, Alimentação,
Biotecnologia, ADN*



Alexandre Martins, Bruno Gomes, Eduardo
Alves , Francisco Pinto, Tiago Alves, Filipe
Barbosa



CRISPR/Cas9

Universidade de Aveiro

(103552) Alexandre Martins
alexandremartins@ua.pt

(103320) Bruno Gomes
brunofgomes@ua.pt

(103629) Francisco Pinto
franciscopinto@ua.pt

(104179) Eduardo Alves
eduardoalves@ua.pt

(104110) Tiago Alves
tiagojba9@ua.pt

(103064) Filipe Barbosa
filipebobarbarbosa@ua.pt

16 de dezembro de 2021

Índice

1	Introdução	1
2	Classificação	2
2.1	Classes	2
2.1.1	Classe 1	3
2.1.2	Classe 2	3
3	Aplicação	4
3.1	Eliminar doenças	4
3.2	Na alimentação	4
3.3	Ecossistemas projetados	5
4	Como se relaciona com o Bauhaus e os 17 objetivos de desenvolvimento sustentável	6
5	Conclusões	7

Resumo

O impacto desta descoberta científica é uma das mais importantes na história da humanidade. Cientistas descobriram como explorar o sistema imunológico das bactérias para editar genes em outros organismos.

Esta é uma nova ferramenta com a capacidade de excluir características indesejáveis e adicionar características desejáveis com mais precisão do que nunca.

Os cientistas usaram-no para reduzir a gravidade da surdez genética em ratos, sugerindo que poderia ser usado para tratar o mesmo tipo de perda auditiva em pessoas. Editaram células da medula óssea para tratar a anemia falciforme. O CRISPR pode nos ajudar a desenvolver safras tolerantes à seca e a criar novos antibióticos, assim como permitir exterminar populações inteiras de mosquitos transmissores da malária ou ressuscitar espécies extintas.

Capítulo 1

Introdução

Neste relatório é abordado o "Clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9", o qual pode vir a ser o próximo grande salto na conservação ou melhoria do meio ambiente desde a indústria agrícola até setores da saúde humana.

Iremos perceber no que consiste a ferramenta de edição de genoma CRISPR/Cas9, como funciona, as suas virtudes e limitações.

Depois desta introdução, no Capítulo 2 são apresentadas as duas classes existentes no sistema CRISPR de seguida, seguem-se as diferentes aplicações de CRISPR/Cas9 no Capítulo 3. Finalmente, no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões do trabalho.

Capítulo 2

Classificação

Os sistemas CRISPR – Cas fornecem imunidade adaptativa em arqueias e bactérias. A CRISPR-Cas consiste em três estágios. Durante o primeiro estágio, o complexo de proteína Cas1-Cas2 retira um segmento do DNA alvo e o insere entre as repetições na extremidade de uma matriz CRISPR, produzindo um novo espaçador. No segundo estágio, uma matriz CRISPR, juntamente com os espaçadores, é transcrita em um transcrito longo conhecido como RNA pré-CRISPR e é processada por um complexo distinto de proteínas Cas em pequenos RNAs CRISPR maduros. Durante o último estágio, um complexo de proteínas Cas usa o crRNA como um guia para clivar o DNA ou RNA alvo. Da mesma forma que outros mecanismos de defesa, os sistemas CRISPR-Cas evoluíram no contexto de uma incessante corrida armamentista com elementos genéticos móveis. Uma classificação abrangente de sistemas CRISPR-Cas não pode ser gerada como uma única árvore filogenética, mas requer uma abordagem multifacetada que combina a identificação de genes de assinatura com árvores filogenéticas e a análise de similaridade de sequência entre genes cas parcialmente conservados, bem como a comparação da organização dos loci.

Duas classes distintas foram identificadas em genomas bacterianos, cada uma com a capacidade de clivar moléculas de DNA ou RNA alvo com especificidade de sequência direcionada pelo guia de RNA. A maioria das tecnologias são baseadas em Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, juntamente com um RNA guia único projetado devido à simplicidade do sistema. A edição de genes em células animais foi bem-sucedida com Spy Cas9, ortólogos Cas9 dentro do subtipo II-A e nova proteína única classe 2 efetores como Cpf1. Em contraste, os sistemas complexos de classe 1 CRISPR-Cas consistindo em complexos multiproteínas guiados por RNA.

2.1 Classes

1. Os sistemas CRISPR/Cas de Classe 1 utilizam complexos efetores de múltiplas proteínas.

2. Os sistemas CRISPR/Cas Classe 2 utilizam efetores de proteína única.

2.1.1 Classe 1

Das duas Classes, a Classe 1 corresponde a cerca de 90 % dos sistemas CRISPR-Cas, raramente é reaproveitada para edição de genoma. Os sistemas de classe 1 dependem de várias subunidades Cas para formar um complexo conhecido como Cascade. A expressão e a formação dos complexos Cascade são validadas em células bacterianas e células humanas. Para demonstrar a utilidade em células humanas, eles reprogramaram o Cascade para modulação transcricional direcionada ao amarrar um domínio de ativação ou repressão ao complexo Cascade.

2.1.2 Classe 2

Os 10% restantes dos loci CRISPR-cas pertencem aos sistemas CRISPR-Cas classe 2; esses sistemas são encontrados em bactérias e não foram identificados em hipertermófilos.

Os sistemas CRISPR-Cas Classe 2 são caracterizados por módulos efetores que consistem em uma única proteína de múltiplos domínios. Projetamos um pipeline computacional para a descoberta de novas variantes da classe 2 e usamo-lo para identificar seis novos subtipos CRISPR-Cas. Os sistemas CRISPR-Cas são caracterizados por uma modularidade funcional e evolutiva pronunciada. O módulo efector CRISPR – Cas, que medeia a maturação de crRNAs, bem como o reconhecimento e clivagem do alvo, é versátil na composição do gene e na arquitetura do locus; isso levou a que as duas classes do sistema CRISPR – Cas fossem definidas com base na organização de seus módulos efetores. Os complexos efetores dos sistemas de classe 1 consistem em 4-7 subunidades de proteína Cas em uma estequiometria irregular e os complexos Csm-Cmr de tipo III sistemas 22–25. Em contraste, o recurso característico dos sistemas de classe 2 é um módulo efector que consiste em uma única proteína de múltiplos domínios.

Capítulo 3

Aplicação

O CRISPR já apresentou resultados promissores no tratamento de diversas doenças e teve um grande impacto na edição de genomas de plantas. A tecnologia CRISPR também mostrou potencial em outras áreas, como o desenvolvimento de modelos de doenças e biocombustíveis.

3.1 Eliminar doenças

O bioengenheiro Daniel Anderson e seus colegas usaram o CRISPR em camundongos para corrigir uma mutação associada a uma doença metabólica humana chamada tirosinemia. Foi o primeiro uso do CRISPR para corrigir uma mutação causadora de doença em um animal adulto - e um passo importante no sentido de usar a tecnologia em humanos. Para entregar a enzima Cas9 e seu RNA guia no órgão alvo, o fígado, tiveram que bombear grandes volumes de líquido para os vasos sanguíneos - algo que não é considerado viável em pessoas.

Anderson e outros dizem que os primeiros testes clínicos desse tipo de tratamento poderiam acontecer brevemente. Esses primeiros testes provavelmente serão cenários nos quais os componentes do CRISPR podem ser injetados diretamente nos tecidos, como os do olho, ou nos quais as células podem ser removidas do corpo, projetadas no laboratório e depois colocadas de volta.

3.2 Na alimentação

Enquanto Anderson e outros têm como objetivo modificar o DNA em células humanas, outros estão visando plantações e gado. Antes da chegada das técnicas de edição de genes, geralmente era feito pela inserção de um gene no genoma em posições aleatórias, junto com sequências de bactérias, vírus ou outras espécies que conduzem a expressão do gene. Mas o processo é ineficiente, complexo e caro.

Com o CRISPR, a situação pode mudar: a facilidade e o baixo custo podem tornar a edição do genoma uma opção viável para culturas menores. Os pesqui-

sadores usaram o método para projetar porcos pequenos e fazer trigo e arroz resistentes a doenças.

A capacidade do CRISPR de editar com precisão as sequências de DNA existentes torna as modificações mais precisas, mas também torna mais difícil para os reguladores e fazendeiros identificar um organismo modificado uma vez que tenha sido liberado.

Isso coloca questões difíceis para os países que estão tentando descobrir como regular plantas e animais editados por genes. Nos Estados Unidos ainda não aprovaram qualquer animal geneticamente modificado para consumo humano.

3.3 Ecossistemas projetados

Além de quintas, os pesquisadores estão considerando como o CRISPR pode ser implantado em organismos na natureza. Grande parte da atenção se concentrou em um método chamado gene drive, que pode varrer rapidamente um gene editado por uma população. O trabalho está em um estágio inicial, mas poderá ser usada para exterminar mosquitos ou carrapatos transmissores de doenças, eliminar plantas invasoras ou erradicar a resistência a herbicidas em pigweed.

Uma mudança genética em um organismo leva muito tempo para se espalhar por uma população. Mas uma unidade genética permite que uma mutação feita por CRISPR em um cromossomo se copie para seu parceiro em cada geração, de modo que quase todos os descendentes herdarão a mudança. Isso significa que ele irá acelerar através de uma população exponencialmente mais rápido do que o normal.

Muitos pesquisadores estão preocupados com o fato de que alterar uma população pode ter consequências drásticas e desconhecidas para um ecossistema: pode significar que outras pragas surgem ou pode afetar predadores na cadeia alimentar. E os pesquisadores também estão cientes de que um RNA-guia pode sofrer mutações com o tempo.

“Tem que ter um retorno bastante alto, porque tem um risco de irreversibilidade”, diz George Church.

Capítulo 4

Como se relaciona com o Bauhaus e os 17 objetivos de desenvolvimento sustentável

A nova Bauhaus europeia foi uma escola de modernismo com uma iniciativa criativa, que pretende derrubar fronteiras entre a ciência e a tecnologia, a arte, a cultura e a inclusão social. A fim de permitir a conceção de soluções para problemas quotidianos. Um esforço coletivo para construir um futuro sustentável. O crispr é uma junção de arte, tecnologia, ciência e envolve a colaboração de várias pessoas de forma a atingir um bem maior.

Neste esforço, envolvem-se os 17 objetivos de desenvolvimento sustentável, sendo os da saúde de qualidade e de erradicação da fome o maior foco do Crispr.

Capítulo 5

Conclusões

Uma importante questão ética em pesquisa é que os benefícios devem superar os riscos. É proposto por parte de especialistas que se dê mais atenção aos riscos, visto que o seu impacto em seres vivos ou no ambiente pode ser extremamente prejudicial.

Desta forma governos e instituições devem responder estabelecendo padrões com o intuito de permitir pesquisas promissoras avançarem e garantindo à população que o trabalho está sendo conduzido responsavelmente.

Contribuições dos autores

Todos contribuíram de igual forma para o projeto.

Acrónimos

CRISPR Clusters of regularly interspaced short palindromic repeats

Bibliografia

CRISPR, the disruptor,
<https://www.nature.com/news/crispr-the-disruptor-1.17673>.
Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286741631683X>.
CRISPR/Cas, <https://pt.wikipedia.org/wiki/CRISPR/Cas>.
CRISPR, <https://pt.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.
Cas9, <https://pt.wikipedia.org/wiki/Cas9>.
Exploring class 1 CRISPR systems,
<https://www.nature.com/articles/s41592-019-0642-1>.
Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5851899/>.