
Enzimas em biologia molecular. III. Tecnologia CRISPR-Cas9

Silvana Beres CASTRIGNANO

Núcleo de Doenças Respiratórias - Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz

Neste terceiro artigo sobre enzimas utilizadas em laboratório de biologia molecular, será abordada a tecnologia CRISPR-Cas9. Nela, a enzima endonuclease chamada Cas9 cliva DNA guiada por interação RNA-DNA. O grande interesse suscitado pela tecnologia CRISPR-Cas9 é ser facilmente programável para reconhecer e clivar sítios específicos de um gene alvo e, portanto, passível de ser usada para edição de genomas^{1,2}.

Esta clivagem da fita dupla de DNA, quando aplicada em células de eucariotos, tende a ser reparada por um dos dois mecanismos naturais de reparo celular: união terminal não-homóloga ou NHEJ (do inglês, *non-homologous end joining*), ou reparação por recombinação homóloga ou HDR (do inglês, *homology-directed repair*). NHEJ pode levar ou a religação das extremidades resultando na reconstituição perfeita da sequência ou em ligação com erros, por causa de inserções ou deleções no locus genômico, com chances de levar a mudança na fase de leitura, resultando na produção de proteínas não funcionais ou até no impedimento da produção de proteínas. O HDR necessita de um molde de DNA contendo sequência homóloga da região afetada. Esse molde pode ser incorporado ao locus e gerar alterações na sequência genômica^{1,3,4}.

A enzima Cas9 é uma enzima com dois domínios nucleases, e cada um deles cliva uma das duas fitas do DNA detectado pelo sistema CRISPR-Cas (Fig. 1). É possível gerar mutações em um desses domínios para inativá-lo e gerar proteínas que clivem somente uma das fitas do DNA; neste caso a enzima funciona como nicase. E inativação de ambos os domínios resulta em uma proteína de ligação que pode reconhecer um alvo específico em um DNA e sinalizá-lo ou interferir na sua função^{1,5}

A tecnologia CRISPR-Cas9 originou-se do sistema CRISPR-Cas do tipo II que ocorre naturalmente em bactérias e arqueas, nas quais serve como um sistema imune adaptativo que protege esses organismos contra vírus e plasmídeos invasores. No genoma desses procariotos, o locus do sistema CRISPR-Cas do tipo II é composto por (1) um conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas (CRISPR, do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) intercaladas com fragmentos pequenos de DNA do invasor — denominados protoespaçadores se localizados no genoma do invasor, e espaçadores se no sistema CRISPR — que foram integrados ao cromossomo do hospedeiro e (2) por um operon de genes codificadores da proteína Cas (do inglês, *CRISPR-associated*). Após transcrito, esse sistema formará um complexo composto por enzima Cas e uma estrutura de RNA duplo formado por CRISPR RNA (crRNA) e *trans-activating* crRNA (tracrRNA) (Fig. 1A). Na fase de interferência, há reconhecimento e clivagem dos alvos (sequências estrangeiras dos vírus ou plasmídeos invasores), respectivamente pelo crRNA (por complementaridade) e pela proteína Cas (Fig. 1A)^{1,5,6}.

Data de 2012 a descoberta da possibilidade de planejar a atuação de Cas9 guiada por molécula-guia simples de RNA — crRNA e tracrRNA sintéticas, ligadas por uma alça artificial — construída para clivar sítios específicos de um genoma (Fig. 1B)^{3,5}. Desde então, a tecnologia tem sido estudada em cultura de células de uma grande variedade de espécies, em vários animais — incluindo seres humanos, parasitas causadores de doença e vetores de transmissão de vírus (p. ex. com objetivo de tornar

o mosquito estéril) —, em plantas, em fungos^{1,4}. A investigação com a tecnologia CRISPR-Cas9 também tem sido feita em vírus com genoma DNA ou naqueles que exibem uma fase de DNA durante seu ciclo de “vida”. Assim, têm sido pesquisadas com sucesso edição nos genomas de alguns vírus como o da hepatite B, papilomavírus, herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)³.

A ferramenta mostra-se promissora para uso em seres humanos, pois através de seu uso poderão ser introduzidas mudanças no genoma para curar mutações genéticas responsáveis por doenças, como alguns tipos de imunodeficiências, hemoglobinopatias, erros inatos do metabolismo, deficiência de alfa-1-antitripsina, fibrose cística, etc^{1,4}. Outra provável aplicação será no combate à infecção viral causada por vírus que permanecem latentes ou que se integram ao DNA do hospedeiro ou ainda em casos de infecção viral persistente³.

Entre as dificuldades para a utilização dessa ferramenta, a principal é o modo de introdução do sistema dentro das células. Vetores virais como lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados têm sido utilizados para levar sequências que codifiquem o sistema^{2,4}. Existem preocupações com o uso desses vetores virais, como o fato de nem sempre o vírus infectar a célula que se quer atingir; a falta de segurança desses vetores, já que existe risco de integração de sequências virais no genoma do hospedeiro, mesmo se o vetor não for um lentivírus; dificuldade de empacotar sequências grandes

para expressão em vetores virais; risco de resposta do hospedeiro contra o vetor²⁻⁴. Outros métodos de entrega, seja de sequências do complexo para serem expressas nas células, seja da própria enzima Cas e da molécula-guia de RNA, têm sido avaliadas, como através de plasmídeos, métodos físicos (p.ex. eletroporação), conjugação com peptídeos com capacidade de penetração celular (CPP, do inglês, *cell-penetrating peptide*) e entrega mediada por nanopartículas como polímeros e lipídeos²⁻⁴.

Algumas empresas já comercializam produtos voltados para a utilização da tecnologia CRISPR-Cas9 em laboratório como, p. ex., Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com/crisprs), Genewiz (www.genewiz.com/Public/Services/Gene-Synthesis/CRISPR-Construct-Synthesis), ThermoFisher (www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/genome-editing/genart-crispr.html), TaKaRa/Clontech (www.clontech.com/Products/Genome_Editing), GenScript (www.genscript.com/CRISPR-Cas9-technology-resource.html).

Esta técnica de edição de genomas CRISPR-Cas9 tem suscitado um número enorme de pesquisas, e baseado na sua maior facilidade de uso e eficácia em relação a técnicas anteriormente descritas^{1,2}, e pelas perspectivas de aplicação no futuro, vale a pena difundir suas propriedades e qualidades. A importância do sistema é tal que tem sido aventada a chance de os seus descobridores serem indicados ao prêmio Nobel⁷.

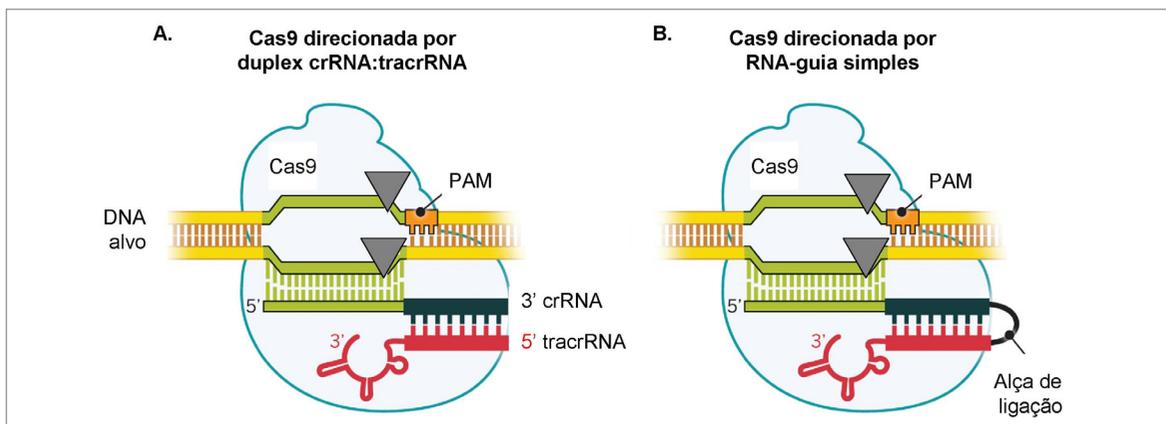


Fig 1. Estrutura esquematizada do complexo CRISPR-Cas9 ligado ao DNA alvo. **A.** CRISPR-Cas9 do *Streptococcus pyogenes*; **B.** Tecnologia CRISPR-Cas9 proposta por Jinek et al⁵. Os triângulos invertidos mostram os sítios de clivagem das fitas de DNA por cada um dos dois domínios da enzima Cas9; PAM: motivo adjacente ao protoespaçador (do inglês, *protospacer adjacent motif*), é uma sequência de poucos nucleotídeos localizada no genoma-alvo do sistema CRISPR-Cas, essencial na funcionalidade do sistema CRISPR-Cas⁶. Figura adaptada a partir da original de Doudna e Charpentier¹

REFERÊNCIAS

1. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014; 346(6213):1258096. doi: 10.1126/science.1258096
2. Wang M, Glass ZA, Xu Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther*. 2017; 24(3):144-50.
3. Kennedy EM, Cullen BR. Gene editing: a new tool for viral disease. *Annu Rev Med*. 2017; 68:401-11.
4. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16(6):387-99.
5. Jinek M, Chylinsky K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337(6096): 816-21.
6. Mojica FJM, Díez-Villaseñor, C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009; 155(Pt 3): 733-40.
7. Comfort N. Genome Editing: That's the way the CRISPR crumbles. *Nature*. 2017; 546(7656):30-1.