

CRISPR: uma nova era na biologia molecular

Sandna Larissa Freitas dos Santos¹; Hérick Hébert da Silva Alves²; Regilane Matos da Silva Prado³; Karla Bruna Nogueira Torres Barros⁴.

¹ Centro Universitário Católica de Quixadá- Unicatólica-CE. sandy.lary@hotmail.com.

² Faculdade de Farmácia Centro Universitário Católica de Quixadá- Unicatólica-CE.

³ Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Ceará.

⁴ Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual do Ceará.

RESUMO

Objetivo: Conduzir uma revisão sistemática sobre os parâmetros estabelecidos na utilização do sistema CRISPR/Cas no âmbito da genética molecular. Metodologia: As bases de dados usadas foram: LILACS, SCIELO, MEDLINE e BVS, utilizando as palavras-chaves em português, espanhol e inglês, selecionadas mediante consulta aos DeCS da Bireme: sistemas CRISPR-Cas; biologia molecular, genética. Incluíram-se estudos de casos completos publicados entre 2009 e 2015 em periódicos nacionais e internacionais, sendo composto por 13 estudos. Resultados: Esta é a mais recente técnica de edição de genoma, bastante promissora nas áreas da biotecnologia e medicina, suas vantagens estão na alta versatilidade, eficácia, especificidade e facilidade de uso, porém suas desvantagens são observadas, como nas mutações fora do alvo mesmo nas sequências mais conservadas, sobretudo em células humanas, podendo ser algo preocupante. Sua principal utilização se encontra na transferência de genes modificados corretamente para a medula óssea, assim como no auxílio para o tratamento de câncer. Estudos tem evidenciado os esforços para que no futuro a precisão e eficiência do sistema CRISPR/Cas9 continue a aumentar e a melhorar.

Palavras Chave: Sistemas CRISPR-Cas; Biologia Molecular, Genética.

ABSTRACT

Objective: Conduct a systematic review on the parameters established in the use of the CRISPR / Cas system in the field of molecular genetics. Methodology: The databases used were: LILACS, SciELO, MEDLINE and VHL, using the key words in Portuguese, Spanish and English, selected in consultation with DeCS Bireme: CRISPR-Cas systems; molecular biology, genetics. They included studies of complete cases published between 2009 and 2015 in national and international journals, consisting of 13 studies. Results: It is more recent genome editing technique, very promising in the fields of biotechnology and medicine, its advantages are the high versatility, efficiency, specificity and ease of use, but their disadvantages are observed as the change of the mark even in the most conserved sequences especially in human cells, and may be some concern. Its main use is in the transfer of modified genes correctly to the bone marrow, as well as aid for the treatment of cancer. Studies have highlighted the efforts so that in future the accuracy and efficiency of the CRISPR system / Cas9 continue to grow and improve.

Key words: CRISPR-Cas systems; Molecular biology, genetics

INTRODUÇÃO

O conceito de terapia gênica surgiu durante os anos 60 e 70, estando desde essa altura em constante crescimento. A primeira doente a ser tratada com base na terapia

gênica foi uma menina com deficiência em adenosina desaminase (ADA), a qual afeta severamente o sistema imunitário e a capacidade de combater infecções. A terapia consistia em retirar os seus glóbulos brancos e

neles inserir o gene corrigido de modo a fazer desaparecer a deficiência em adenosina desaminase, e em seguida, reintroduzir as células modificadas no sistema circulatório da doente. Este trabalho serviu de rampa de lançamento para o início de novos estudos e pesquisas sobre este tema. Em 1985 iniciou-se o trabalho de pesquisa para demonstrar como as células de pessoas com esta deficiência poderiam ser modificadas em culturas de tecidos. Os investigadores usaram um retrovírus como vetor para transportar o gene ADA correto para dentro das células (MAHFOUZ; PIATEK; STEWART, 2014).

Recentemente, os principais vetores utilizados para transportar os genes modificados para as células são os vírus. Estes ligam-se a uma célula hospedeira e transferem o seu material genético para o interior da mesma. Aproveitando esta característica peculiar dos vírus, os cientistas começaram a modificá-los. No entanto, é importante que o vírus mantenha a capacidade de infectar as células, dando a oportunidade do DNA benéfico ser inserido nas células hospedeiras. Os vírus utilizados são os retrovírus, os lentivírus, os adenovírus e os adeno-associados (ZALATAN et al., 2015).

Com o avanço desta tecnologia foi então permitido o seu uso em recém-nascidos com deficiências genéticas. Os genes são corrigidos e transferidos para células sanguíneas imaturas obtidas a partir dos cordões umbilicais dos mesmos. As doenças a serem investigadas para tratamento com uso desta terapia são: fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular, cancro e anemia falciforme. Apesar de tudo, esta técnica tem sido associada a vários problemas ao longo das últimas décadas. Um dos maiores problemas é o fato de não serem conhecidos os seus efeitos adversos a longo prazo e o enorme rol de questões éticas (BENJAMIN et al., 2015; ZALATAN et al., 2015).

Além disso, técnicas de edição de genoma como abordagem promissora na terapia gênica, tempo de terapia curto, a possibilidade de o sistema imunológico responder aos vetores virais e perturbar a eficácia da terapia genética, e de que os vetores virais podem desencadear nos pacientes reações imunitárias, reações inflamatórias tóxicas ou mesmo haver uma

recuperação do próprio vírus, causando doença no paciente, são outros desafios enfrentados no campo da terapia gênica (FU et al., 2013).

O sistema CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), também conhecido como CRISPR/Cas tipo II, é a mais recente técnica de edição de genoma, bastante promissora nas áreas da biotecnologia e medicina (SANDER; JOUNG, 2014). É baseada no sistema imunitário das bactérias que as ajuda a proteger de fagos ou plasmídeos através da transferência de genes invasores (CHARPENTIER, 2015). Com isso a pesquisa tem como objetivo apresentar por meio de uma revisão sistemática da literatura parâmetros estabelecidos da utilização do sistema CRISPR/Cas no âmbito da genética molecular.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão sistemática sobre as estratégias utilizadas para o sistema CRISPR/Cas para a biologia molecular. Realizou-se a definição da questão norteadora (problema) com o objetivo da pesquisa, estabelecendo critérios de inclusão e exclusão das publicações, e discussão dos resultados (MENDES; SILVEIRA; GALVÃO, 2008). A pesquisa foi norteada através da seguinte pergunta: Quais parâmetros estão estabelecidos na utilização do sistema CRISPR/Cas no âmbito da genética molecular?

As bases de dados usadas na seleção dos artigos foram: LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, SCIELO - Scientific Electronic Library on-line, MEDLINE - Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line e BVS - Biblioteca Virtual em Saúde. Para a busca dos artigos foram utilizadas palavras-chaves em português, espanhol e inglês, selecionadas mediante consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme: sistemas CRISPR-Cas; biologia molecular, genética.

Incluíram-se estudos de casos completos publicados entre 2010 e 2015 em periódicos nacionais e internacionais e que apresentaram informações sobre utilização do sistema CRISPR/Cas no âmbito da genética

molecular. Foram excluídos artigos que não se enquadravam na temática do estudo, revisões, publicados em anos anteriores e com duplicidade. As produções que atenderam os critérios estabelecidos previamente, foram selecionadas para este estudo, e lidas na íntegra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

13 artigos compuseram a amostra desse trabalho, e evidenciaram de forma geral a utilização sistema CRISPR/Cas no âmbito da biologia molecular. Dentre eles, 9 eram de origem inglesa, 1 espanhola e 3 em português, sendo que seis foram publicados em 2013. A Tabela 1 apresenta um panorama geral das publicações.

Presentes em diferentes números de cópias no cromossomo e plasmídios nas archeas e bactérias, os locos CRISPR são uma classe de sequências repetitivas separadas por regiões espaçadoras geralmente adquiridas de elementos genéticos exógenos. Os locos CRISPR foram identificados como um arranjo de DNA repetitivo primeiramente em *Escherichia coli* K12, recebendo a denominação CRISPR apenas em 2002. Cada loco CRISPR é constituído por conjuntos de motivos, sendo cada motivo formado por uma repetição direta ou DR (*Direct Repeat*) de aproximadamente 24 a 47 pares de base (pb), seguida por uma sequência espaçadora. Em uma das extremidades do loco existe uma DR truncada, denominada degenerada, e na extremidade oposta uma sequência Líder, rica em A-T, que parece funcionar como o sítio promotor da transcrição (HAURWITZ et al., 2010; SHALEM et al. 2014).

Foi observado no estudo de Charpentier (2015) que as bactérias eram capazes de se defender de organismos invasores através da cópia de um segmento de aproximadamente vinte pares de bases do DNA invasor para um local do genoma do hospedeiro através de repetições palindrômicas curtas espaçadas entre si – CRISPR.

Assim fica compreendido que existem dois possíveis cenários de interação com os invasores: a memorização de um elemento genético após uma primeira infecção ou a destruição do mesmo elemento após uma segunda infecção. No primeiro caso, o

elemento é reconhecido pelas proteínas Cas que inserem uma sequência curta do DNA invasor numa matriz de CRISPR localizada no genoma do hospedeiro (JEFFRY; JOUNGET, 2014; CHARPENTIER, 2015). Estas sequências que são integradas constituem então uma memória genética que impede que o hospedeiro seja reinfectado. Vai haver então uma memorização das sequências invasoras por parte do hospedeiro, transcrevendo-as numa molécula de RNA que é posteriormente submetida a um ou dois eventos de processamento que darão origem a uma cadeia curta de crRNA, contendo uma parte do elemento genético memorizado (CHARPENTIER, 2015; NIHONGAKI et al., 2015; BENJAMIN et al., 2015). A Tabela 2 mostra os resultados encontrados nos periódicos selecionados para compor o estudo.

O sistema CRISPR/Cas9 é então formado por uma endonuclease Cas9 e duas moléculas de RNA curtas – crRNA e tracrRNA-, sendo que o crRNA é o responsável pela orientação da endonuclease Cas9 para o DNA alvo (MAHFOUZ; PIATEK; STEWART, 2014; SANDER; JOUNG, 2014). Estas moléculas de RNA são capazes de dirigir especificamente a proteína Cas9 para o seu destino e podem ser combinadas com uma molécula de RNA guia – gRNA- com uma sequência de vinte nucleótidos. a partir da transcrição de pequenos segmentos de DNA exogeno é obtido o crRNA, e assim são interligados entre si dentro do loci gnômicos de CRISPR (KRZYSZTOF; CHARPENTIER; KOONINET, 2014).

O sistema tem classificação em três tipos principais – tipo I, II e III, e onze subclasses, sendo que o mais conhecido e estudado é o tipo II-A. Ambos os tipos I e III podem ser encontrados em bactérias e no reino Archaea, ao passo que o tipo II é apenas encontrado em bactérias. A imunidade adaptativa é o aspecto comum entre eles, o que os diferencia é a proteína Cas utilizada e o seu mecanismo de ação para desempenhar a memorização, obtenção do crRNA e possíveis interferências com o DNA invasor (FU et al., 2013). Os sistemas I e III são bastante semelhantes, sendo que ambas as suas interferências envolvem crRNP – complexos

de proteínas ribonucleicas – sendo que cada um é composto por um crRNA guia e um complexo de proteínas Cas. Comparativamente, o tipo II é específico para um crRNA duplo com um RNA adicional – tracrRNA – formando um complexo de DNA que interfere com uma única proteína Cas9 (MAHFOUZ; PIATEK; STEWART, 2014; CHARPENTIER, 2015).

As vantagens do sistema CRISPR/Cas9 estão relacionadas a alta versatilidade, eficácia, especificidade e facilidade de uso. Expondo isto, organizações farmacêuticas e investigadores na área da biotecnologia têm trabalhado de modo a proporcionar uma oportunidade única para a comunidade científica e médica para realizar a sua aplicação na terapia de células humanas, como a terapia genética, correção de defeitos em genes de células progenitoras, doenças genéticas, tratamento do cancro e mesmo do HIV, HPV e EBV em células infetadas (CHARPENTIER, 2015; KENNEDY et al., 2015). No caso do HPV e HBV, a interrupção dos genes virais representa um meio altamente eficaz para a eliminação do vírus das células infetadas. O sistema CRISPR/Cas9 tem demonstrado ser uma técnica bastante eficaz na eliminação dos vírus das células infetadas e na cessação dos tumores, assim como no tratamento de doenças monogênicas hereditárias já estudadas in vivo em embriões de primatas não humanos (LAFONTAINE; FATHE; SMYTH, 2015; SHALEM et al., 2014).

Gupta e Musunuru (2014) relatam que a vantagem desse sistema pode ser observada no fato de que, após induzir uma DSB, o componente proteico Cas9 manter-se inalterado. Esta facilidade de uso da CRISPR/Cas9 demonstrou ser uma vantagem, especialmente na produção de grandes conjuntos de vetores para atingirem locais alvos ou mesmo genomas extensos.

Ainda, este sistema pode ser capaz de modificar múltiplos locais genômicos simultaneamente, ou seja, de utilizar vários RNAs guia em paralelo dentro da mesma célula (GUPTA; MUSUNURU, 2014; VASILEVA et al., 2015). Este fato tornou então mais simples a mutação de múltiplos genes de uma só vez ou a indução e deleções precisas numa região genômica, embora deva

de se ter em atenção que o uso em simultâneo de vários pares de ZFN e TALEN pode alcançar os mesmos resultados (KIRA et al., 2015).

Vários estudos recentes apontam que desajustes na sequência alvo são tolerados pelo sistema. A sua capacidade de tolerância detém de uma defesa específica das bactérias contra as invasões virais provenientes de DNA transportado pelos plasmídeos, como referido anteriormente (MAHFOUZ; PIATEK; STEWART, 2014; BENJAMIN et al., 2015). Além de permitir uma edição de genoma de forma fácil e eficiente, o sistema CRISPR/Cas9 tem a vantagem de ser utilizado para regular a expressão de genes endógenos e marcar locus específicos do cromossoma em células e organismos vivos (SANDER; JOUNG, 2014).

Recentemente, o sistema CRISPR/Cas9 foi usado para modificar uma linha de células estaminais e hematopoiéticas. Isto ilustra o grande potencial do sistema para a medicina personalizada, uma vez que é capaz de modificar linhas de células estaminais (LAFONTAINE; FATHE; SMYTH, 2015). Um dos passos mais importantes a ser dado no futuro é a imunização das células contra o vírus HIV-1 através da produção de vacinas preventivas através da técnica CRISPR/Cas9. Estudos comprovaram que a técnica CRISPR/Cas9 leva à eliminação rápida do vírus HIV-1 mesmo antes de ele integrar o genoma do hospedeiro, sendo então uma alternativa altamente viável a ser aplicada no campo da vacinação em várias células latentes e modelos animais in vivo (BENJAMIN et al., 2015; KIRA et al., 2015).

CONCLUSÃO

O sistema CRISPR/Cas9 representa um método ainda em ascensão, capaz de induzir alterações de alelos, knock-outs, entre outras estratégias de melhoramento de perturbações genéticas. Pensa-se que a facilidade com que são criados modelos de mamíferos através desta tecnologia vai permitir o crescimento da capacidade de investigar quais as modificações genéticas envolvidas nas doenças humanas. Isto é apoiado pela já criação de primatas com mutações genéticas específicas, aumentando

assim todas as esperanças para o seu uso em humanos

As pesquisas analisadas no presente estudo basearam-se nesta técnica de modo a solucionar questões tais como o tratamento de doenças monogênicas hereditárias e infecções virais in vivo e ex vivo, dependendo da perturbação ou do tecido afetado. Muitos são os esforços para que no futuro a precisão e eficiência do sistema CRISPR/Cas9 continue a aumentar e a melhorar, mesmo que as mutações fora do alvo são a principal preocupação dos investigadores e uma das principais correções a alcançar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENJAMIN, P. K. et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, v. 523, p. 481–485, 2015.
- CHARPENTIER, E. Bacterial RNA-guided mechanism opened and biomedicine. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 4, p. 363–365, 2015.
- FU, Y.; FODEN, J.A.; KHAYTER, C.; MAEDER, M.L.; REYON, D.; JOUNG, J.K.; SANDER, J.D. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Nat Biotechnol.** v. 31, n. 9, p. 822-6, 2013.
- GUPTA, R. M.; MUSUNURU, K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n.10, p.4154–4161, 2014.
- HAURWITZ, R. E.; MARTIN, J.; BLAKE, W.; KAIHONG, Z.; JENNIFER, A. D. Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. **Science**, v. 329, n. 5997, p. 1355-1358, 2010.
- JEFFRY, D.S.; JOUNG, J.K. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. **Nat Biotechnol.**; v. 32, n. 4, p. 347–355, 2014.
- JIANG, W.; BIKARD, D.; COX, D.; ZHANG, F.; MARRAFFINI, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 233–239, 2013.
- KENNEDY, E. M.; KORNEPATI, A. V. R.; MEFFERD, A. L.; MARSHALL, J. B.; TSAI, K.; BOGERD, H. P.; CULLEN, B. R. Optimization of a multiplex CRISPR/Cas system for use as an antiviral therapeutic. **Methods**, p. 8–12, 2015.
- KIRA, S.M. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews Microbiology**; v. 13, p. 722–736. 2015.
- KRZYSZTOF, C.K.M.; CHARPENTIER, E.; KOONIN, E.V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. 10, p. 6091–6105, 2014.
- LAFOUNTAIN, J. S.; FATHE, K.; SMYTH, H. D. C. Delivery and Therapeutic Applications of Gene Editing Technologies ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9. **International Journal of Pharmaceutics**. 2015.
- LE, C. F.A.R.; DAVID, C.; SHUAILIANG, L.; ROBERT, B.; NAOMI, H.; PATRICK, D. H.; XUEBING, W.; WENYAN, J.; LUCIANO, A. M. Z. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science.**; v. 339, n. 6121, p. 819–823, 2013.
- MAHFOUZ, M. M.; PIATEK, A.; STEWART, C. N. Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 8, p. 1006–1014, 2014.
- MENDES, K.D.D.; SILVEIRA, R.C.C.P.; GALVÃO, C. M. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto & contexto enferm.** 2008; Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v17n4/18.pdf>. Acesso em: 19 fev 2015.
- NIHONGAKI, Y.; YAMAMOTO, S.; KAWANO, F.; SUZUKI, H.; SATO, M. CRISPRCas9-based Photoactivatable Transcription System. **Chemistry & Biology**, v. 22, n. 2, p. 169–174, 2015.
- SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 347–55, 2014.
- SHALEM, O.; SANJANA, N.E.; HARTENIAN, E.; SHI, X.; SCOTT, D.A.; MIKKELSEN, T.S.; HECKL, D.; EBERT, B.L, ROOT, D.E, DOENCH, J.G, ZHANG, F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. **Science**. v. 3, n. 343, p. 84-7, 2014.
- TIM, W.; JENNY, J. W.; DAVID, M. S.; ERIC, S.L. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 80-84, 2014.
- YANFANG, F.; JEFFRY, D.S.; DEEPAK, R.; VINCENT, M. C.; KEITH, J. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**; v. 32 p. 279–284, 2014.
- ZALATAN, J.G.; LEE, M.E.; ALMEIDA, R.; GILBERT, L.A.; WHITEHEAD, E.H.; LA RUSSA, M. T. J.C.; WEISSMAN, J.S.; DUEBER, J.E.; QI, L.S.; LIM, W.A. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. **Cell**. v. 160, n. 2, p. 339-50, 2015.

Tabela 01: Distribuição dos artigos selecionadas, contendo periódico, ano de publicação e autores.

Ordem	Periódico	Ano de Publicação	Autores
1	Science	2013	Shalem et al.
2	Science	2013	Tim et al.
3	Nature Reviews Microbiology	2011	Krzysztof et al.
4	Trends in Biotechnology	2013	Thomas et al.
5	Nature Biotechnology	2013	Fu et al.
6	Nature Biotechnology	2013	Jiang et al.
7	Science	2013	Le et al.
8	Science	2010	Haurwitz et al.
9	Nature Biotechnology	2014	Jeffry et al.
10	Nature Biotechnology	2014	Yanfang, F. et al.
11	Nature Reviews Microbiology	2015	Kira et al.
12	Cell	2015	Zalatan et al.
13	Nature	2015	Benjamin et al.

Tabela 02: Descrição dos resultados dos periódicos selecionados.

Ordem	Resultados
1	A simplicidade da programação do CRISPR (<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated nuclease</i>) Cas9 para modificar genoma específica sugere uma nova maneira de interrogar a função do gene em uma escala de todo o genoma. Mostra-se que a entrega de lentivírus de uma biblioteca genoma escala CRISPR-Cas9 segmentação 18.080 genes com 64,751 sequências guia exclusivo permite triagem seleção negativo e positivo em células humanas. Primeiro, usa a biblioteca Gecko para identificar genes essenciais para a viabilidade celular em câncer e células-tronco pluripotentes. Em seguida, em um modelo de melanoma, que rastreados para genes cuja perda está envolvida na resistência à Vemurafenibe, um inibidor de RAF terapêutico. Nossos candidatos do mais alto nível incluem previamente validados genes NF1 e MED12, bem como NF2, CUL3, TADA2B, e TADA1. Observa-se um alto nível de consistência entre RNAs guia independente visando o mesmo gene e uma alta taxa de confirmação de sucesso, demonstrando a promessa de triagem do genoma escala com Cas9.
2	O CRISPR -Cas9 tem se expandido muito a caixa de ferramentas para a genética de mamíferos, permitindo a rápida geração de linhas celulares e camundongos com alelos modificados. Descreve-se um pool, a abordagem rastreamento genético de perda de função adequado tanto para seleção positiva e negativa que usa uma biblioteca lentiviral genoma escala-guia única de RNA (sgRNA). Foi utilizado uma biblioteca que contém 73.000 sgRNAs para gerar coleções de telas realizada em duas linhas de células humanas. Uma tela para a resistência ao nucleotídeo análogo 6-tioguanina identificados todos os membros esperados do reparo via incompatibilidade DNA, enquanto outro para a DNA topoisomerase II (TOP2A) etoposídeo veneno identificada TOP2A, como esperado, e também

	<p>ciclina-dependente quinase 6, CDK6. Uma tela de selecção negativa para os genes essenciais identificados numerosos conjuntos de genes correspondentes aos processos fundamentais. Por último, mostra-se que a eficiência sgRNA está associada com motivos de sequências específicas, permitindo a previsão de sgRNAs mais eficazes. Colectivamente, estes resultados estabelecem telas Cas9 / sgRNA como uma poderosa ferramenta genética para a análise sistemática em células de mamífero.</p>
3	<p>O CRISPR-Cas é um sistema de imunidade adaptativa que estão presentes em muitos archaea e bactérias. Estes sistemas de defesa são codificados por operações que possuem uma arquitetura extremamente diversificada e uma alta taxa de libertação para ambos os genes. Três tipos principais de sistema CRISPR-cas são delineadas, com uma outra divisão em vários subtipos e algumas variantes quiméricas. Dada a complexidade das arquiteturas genômicas e a evolução extremamente dinâmica dos sistemas CRISPR-cas, uma classificação unificada destes sistemas deve basear-se em vários critérios. Assim, é proposto uma classificação “politênica” que integra as filogenias dos mais comuns cas genes, a sequência e organização das repetidas CRISPR e a arquitetura do CRISPR-cas.</p>
4	<p>Zinc-finger nucleases (ZFNs) e Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) compreendem uma poderosa classe de ferramentas que estão redefinindo os limites da pesquisa biológica. Estas nucleases quiméricos são compostos por módulos, de ligação de DNA específicas para a sequência programáveis ligados a um domínio de clivagem de DNA não específico. ZFNs e TALENS permitem diversas modificações genéticas através da indução de quebras de DNA de cadeia dupla que estimulam correntes não homólogas propensa a erros em locais específicos. Além disso, destaca-se o potencial terapêutico da ZFNs e TALENS e suas perspectivas futuras para o campo, incluindo o surgimento do CRISPR / endonucleases de DNA guiado RNA-baseados em Cas.</p>
5	<p>Utilizou-se um ensaio repórter baseado em células humanas para caracterizar clivagem off-alvo de associado-CRISPR (Cas) RGNs. Detectou-se alterações off-alvo induzidas por quatro de seis RGNs direcionados para loci endógena em células humanas através de exame de locais parcialmente incompatíveis. Os sites off-alvo foram identificados até cinco desencontros e muitos foram mutagenizada com frequências comparáveis (ou superiores) às observadas no alvo. Assim, demonstra-se que RGNs pode ser altamente ativo mesmo com interfaces de RNA-DNA imperfeitamente compensadas em células humanas, uma descoberta que pode confundir a sua utilização em pesquisas e aplicações terapêutica.</p>
6	<p>Foi utilizado o CRISPR associado ao Cas9 endonuclease complexado com RNAs para introduzir mutações precisas nos genomas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i>. A abordagem baseia-se na dupla ARN: Cas9 clivagem dirigida no local genômica alvo para matar células não mutadas e evita a necessidade de sistemas marcadores selecionáveis ou de contra-selecção. Reprogramou dual-RNA: Cas9 especificidade, alterando a sequência de RNA CRISPR curta (crRNA) para fazer alterações simples e multinucleotide realizadas em modelos de edição. Usou-se de forma simultânea dois crRNAs permitindo a mutagênese multiplex. Em <i>S. pneumoniae</i>, de quase 100% de células que foram recuperadas utilizando a nossa abordagem continha a mutação desejada, e em <i>E. coli</i>, 65% que foi recuperado continha a mutação, quando a abordagem foi utilizada em combinação com recombineering. Analisou-se exaustivamente dual-RNA: requisitos alvo Cas9 para definir o intervalo de sequências segmentáveis e mostrar estratégias para editar sites que não atendem a</p>

	esses requisitos, o que sugere a versatilidade desta técnica para engenharia de genoma bacteriano.
7	O tipo II procariótica CRISPR / Cas sistema imune adaptativo foi mostrado para facilitar clivagem de ARN-ADN específica do local. Analisou-se dois sistemas de tipo II CRISPR / Cas diferentes e foi demonstrado que as nucleases Cas9 pode ser dirigido por RNAs curtos para induzir a clivagem precisa em loci genômica endógena em células humanas e de rato. Cas9 também pode ser convertido em uma enzima para facilitar a reparação dirigida a homologia com atividade mutagênica mínima. Por fim, várias sequências de guia podem ser codificados numa única matriz CRISPR para permitir a edição simultânea de vários locais dentro do genoma dos mamíferos, demonstrando fácil programação e vasta aplicabilidade da tecnologia de ARN-nuclease.
8	Muitas bactérias e archaea agrupado regularmente intervaladas contêm repetições curtas (CRISPR) que conferem resistência a elementos genéticos invasivos. Para o sistema imunológico é a produção de ARN derivado de CRISPR (crRNAs) após a transcrição do locus CRISPR. Foi identificado a endoribonuclease (Csy4) responsável pela CRISPR transcrição de processamento (-crRNA pré) em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Uma estrutura de cristal de 1,8 Angstrom Csy4 ligado ao seu ARN cognato revela que Csy4 faz interações específicas de sequência no sulco principal da estrutura haste-laçada crRNA repetição. Juntamente com os contatos eletrostáticos para o fosfato, estes permitem Csy4 para se ligarem selectivamente e clivar pré-crRNAs usando filogeneticamente conservadas de serina e histidina resíduos no sítio ativo.
9	A edição do genoma mediada por estes nucleases foi utilizado para rapidamente, facilmente e eficazmente modificar os genes endógenos em uma ampla variedade de tipos de células biomedicamente importantes e em organismos que têm sido tradicionalmente um desafio para manipular geneticamente. Além disso, uma versão modificada do sistema CRISPR-Cas9 foi desenvolvida para recrutar domínios heterólogos que podem regular a expressão do gene endógeno ou rotular locus genômica específica em células vivas. Embora as especificidades do genoma do sistema CRISPR-Cas9 continuam a ser totalmente definido, o poder deste sistema ao alvo, alterações altamente eficientes de sequência do genoma e expressão gênica, sem dúvida, transformar a pesquisa biológica e estimular o desenvolvimento de terapias moleculares para a doença no homem.
10	A associação do CRISPR (Cas9) RGNs são direcionados para loci por ARN genômica de guia (gRNAs) contendo 20 nucleotídeos que são complementares a uma sequência de ADN alvo. No entanto, RGNs pode induzir mutações em locais que diferem por até cinco nucleótidos do alvo pretendido. Mostra-se que gRNAs truncadas, com as regiões mais curtas de alvo complementaridade <20 nucleótidos de comprimento, podem diminuir a mutagênese indesejável em alguns locais fora do alvo por 5000 vezes ou mais, sem sacrificar a eficiência-alvo do genoma de edição. Além disso, o uso de gRNAs truncadas pode reduzir ainda mais os efeitos fora do alvo induzidas por pares de Cas9 variantes de ADN que Nick (nickases emparelhado). Os resultados delineiam uma estratégia simples e eficaz para melhorar as especificidades de nucleases Cas9.
11	A evolução da CRISPR- CAS loci que codificam os sistemas imunes adaptativas em archaea e bactérias, envolve mudanças rápidas, em particular, numerosos rearranjos do locus de arquitetura e transferência horizontal de loci completa ou módulos individuais. . A nova classificação retém a estrutura geral da versão anterior, mas é agora expandido para abranger duas classes, cinco tipos e subtipos 16. A estabilidade relativa da classificação sugere que as variantes mais

	prevalentes de sistemas CRISPR-cas já são conhecidos. No entanto, a existência de variantes raros, atualmente inclassificáveis implica que os tipos e subtipos adicionais continuam a ser caracterizado.
12	As células eucarióticas executam programas de transcrição complexas em que loci específicas ao longo do genoma, que são regulados de formas distintas por conjuntos normativos direcionados. Aplicou-se esse princípio para gerar programas de transcrição de base sintética CRISPR em levedura e células humanas. Ao estender RNAs guia para incluir sites de recrutamento de proteínas efetoras, constrói RNAs modulares que codificam tanto locus alvo e ação reguladora. Conjuntos de RNAs podem ser usados para gerar programas de transcrição sintética multigênicas em que alguns genes são ativados e outros são reprimidos. Aplicou-se esta abordagem flexível para redirecionar o fluxo através de uma via metabólica complexa ramificado em leveduras. Além disso, estes programas podem ser executados por indução da expressão da proteína dCas9, que atua como um ponto de controle regulatório de mestre único. Andaimos de ARN associados a CRISPR fornecem um meio poderoso para a construção de expressão de programas de genes sintéticos para uma ampla gama de aplicações, incluindo destinos celulares religação vias metabólicas ou de engenharia.
13	Mostrou-se que o <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 (SpCas9) pode ser modificada para reconhecer sequências PAM (protospacer adjacent motif) alternativas usando informações estruturais, uma evolução que é dirigida com base em seleção bacteriana, e design combinatória. Estes PAM específicos permitem a edição robusta de sítios gene endógeno em células humanas e de peixe-zebra não atualmente segmentáveis por SpCas9 de tipo selvagem, e as suas especificidades genome-wide são comparáveis com o tipo selvagem SpCas9. Além disso, identificou-se uma outra variante SpCas9 que exibe especificidade melhorada em células humanas, possuindo melhor discriminação de encontro aos locais off-alvo com não-canônico NAG e NGA PAMs e / ou espaçadores incompatíveis. Os resultados fornecem variantes SpCas9 amplamente úteis e, mais importante ainda, determinar a viabilidade de engenharia de uma vasta gama de especificidades Cas9s com PAM alteradas.