



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

# **Enzimas de restrição e o Sistema CRISPR – Cas9**

*Prof. João Carlos Setubal*

o tema geral é adaptação de processos biológicos com fins **biotecnológicos**

- já vimos esse tema antes
- PCR e sequenciamento
  - adaptação do processo de replicação
- Hoje: como **engenheirar** sequências de DNA

# Enzimas de restrição (ou endonucleases)

- São capazes de **cortar** a fita dupla de DNA em locais específicos
- Usadas por bactérias para se defenderem de virus (bacteriófagos)
- É um poderoso instrumento de biotecnologia
- Geralmente a sequência dos locais de corte é um **palíndromo**

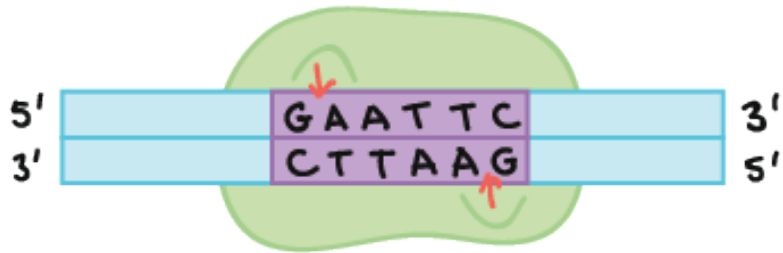
Uma **enzima de restrição** é capaz de cortar DNA toda vez que ela encontra uma sequência curta específica dela



Aqui estamos vendo o nome da enzima (EcoRI) e a sequência que ela **reconhece** (GAATTC ou seu reverso complemento, que é ela mesma)

Aqui estamos vendo como a enzima corta o DNA. A enzima está sendo representada pela mancha verde

antes do corte

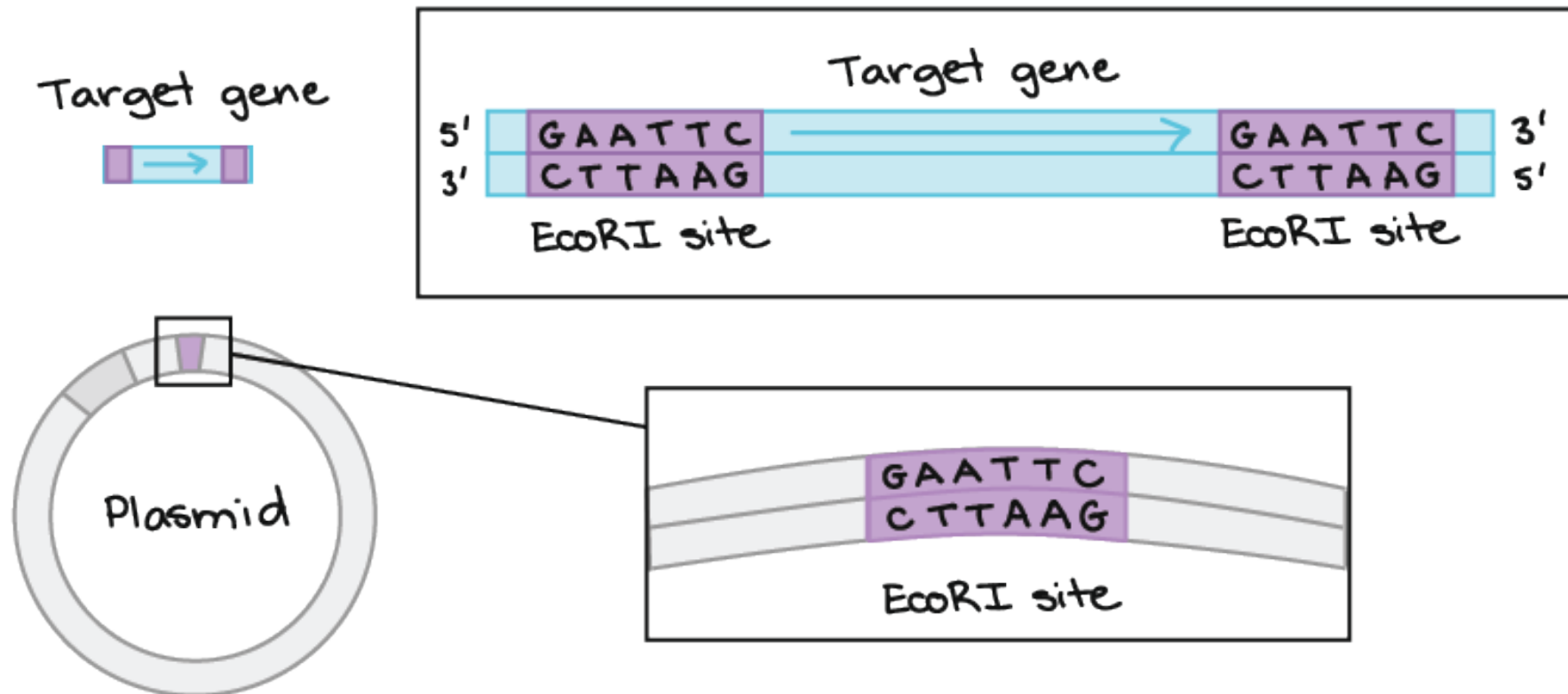


EcoRI enzyme

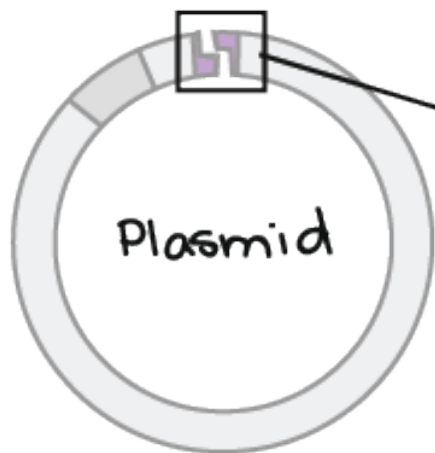
depois do corte

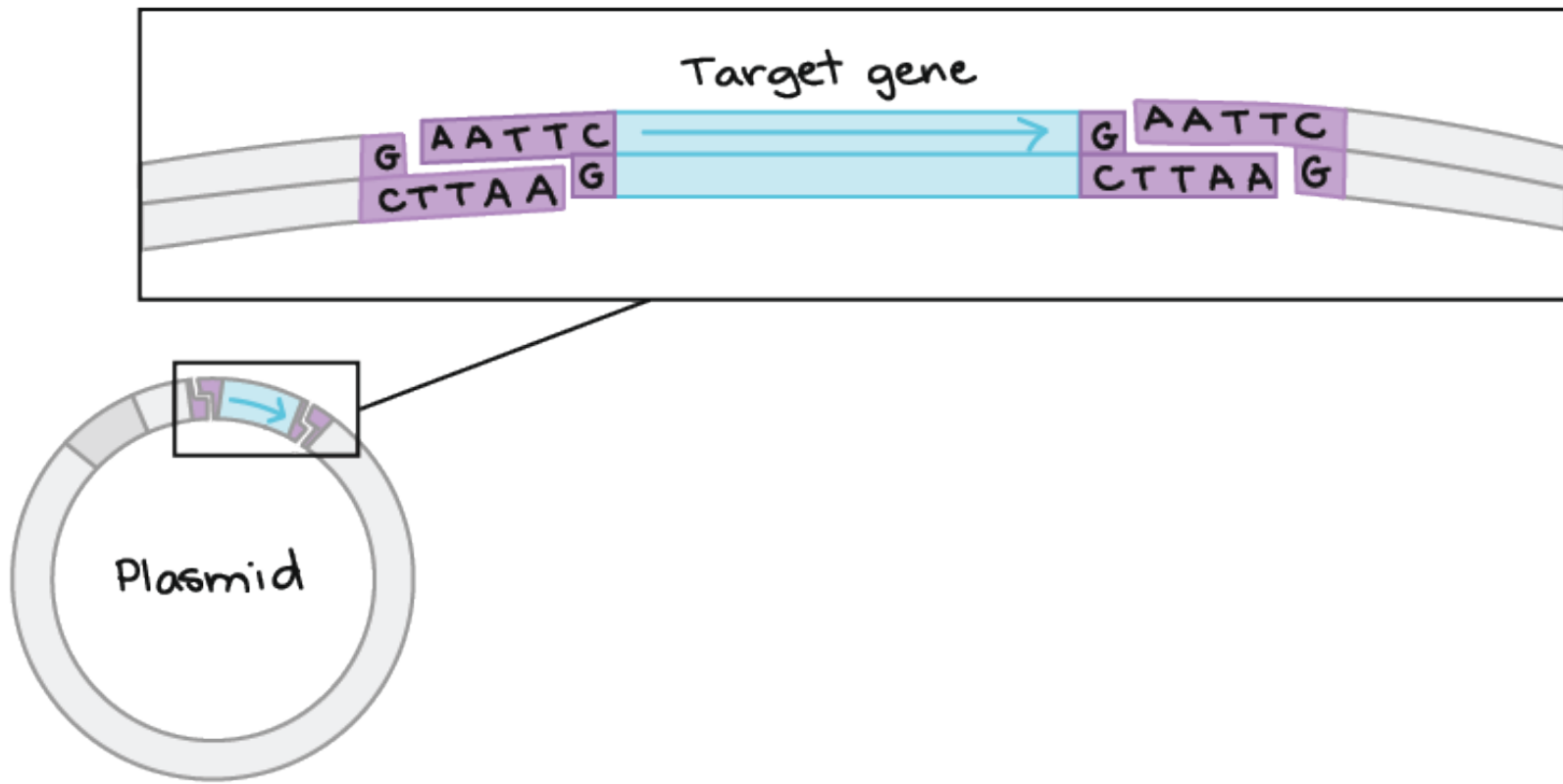


exemplo de uso em biotecnologia: queremos inserir um gene de interesse (target gene) dentro do DNA de um plasmídeo circular

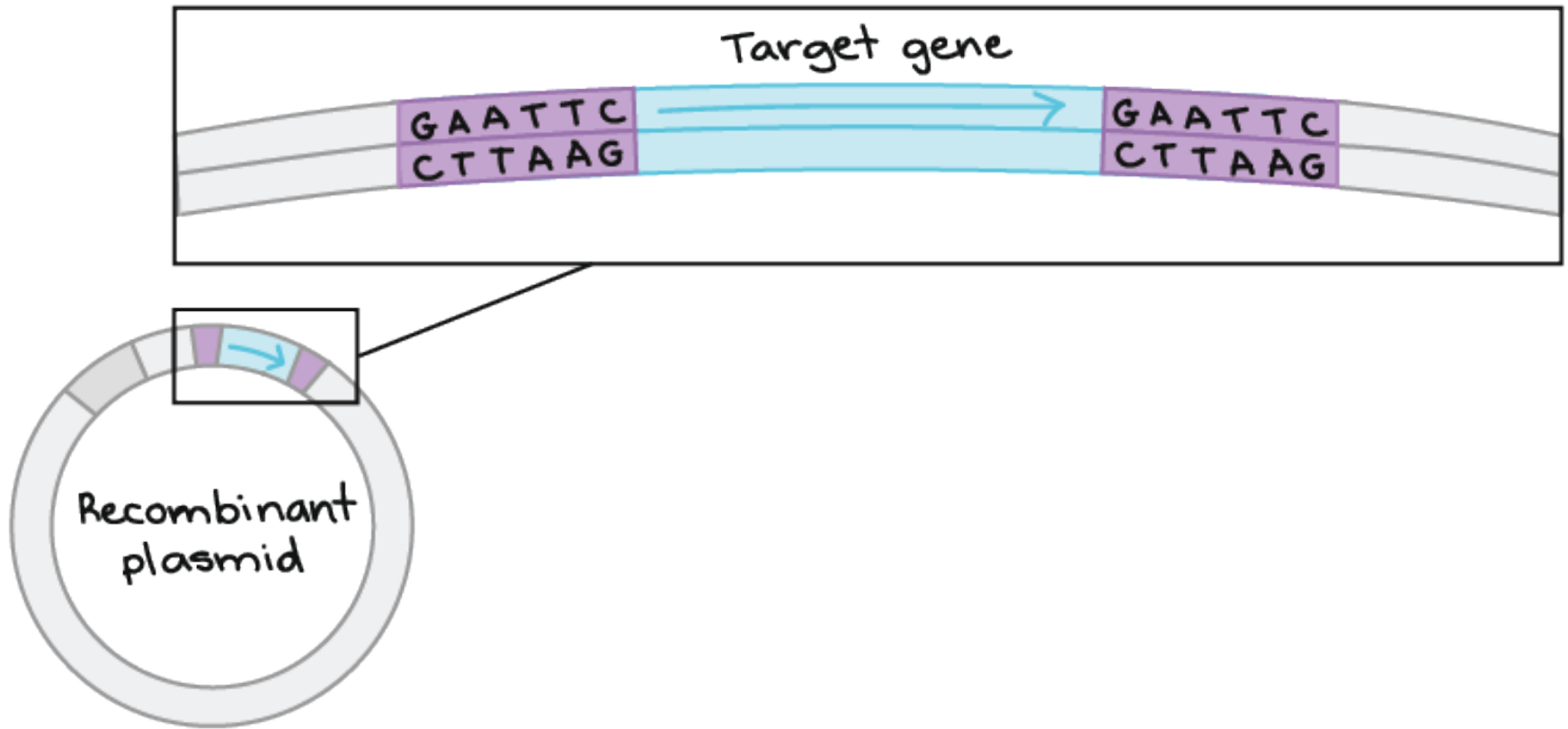


Target gene









O resultado é chamado de **plasmídeo recombinante**

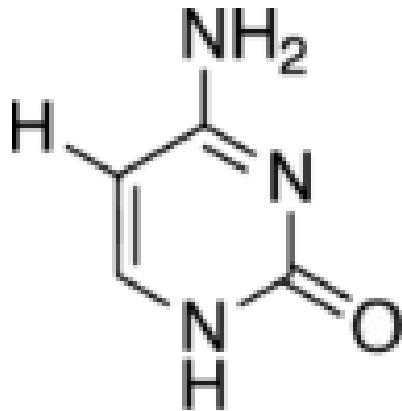
Existem muitos tipos de enzimas de restrição, cada uma reconhecendo uma sequência diferente. A tabela a seguir mostra alguns tipos. Na coluna 1 é o nome da enzima, na coluna 2 vemos o organismo onde ela foi descoberta, na coluna 3 vemos a sequência que ela reconhece, e na coluna 4 vemos o resultado do corte

Enzyme ↕	Source ↕	Recognition Sequence ↕	Cut ↕
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5' GAATTC 3' CTTAAG	5' ---G      AATTC---3' 3' ---CTTAA      G---5'
EcoRII	<i>Escherichia coli</i>	5' CCWGG 3' GGWCC	5' ---      CCWGG---3' 3' ---GGWCC      ---5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5' GGATCC 3' CCTAGG	5' ---G      GATCC---3' 3' ---CCTAG      G---5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5' ---A      AGCTT---3' 3' ---TTCGA      A---5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5' TCGA 3' AGCT	5' ---T      CGA---3' 3' ---AGC      T---5'
NotI	<i>Nocardia otitidis</i>	5' GCGGCCGC 3' CGCCGGCG	5' ---GC      GGCCGC---3' 3' ---CGCCGG      CG---5'

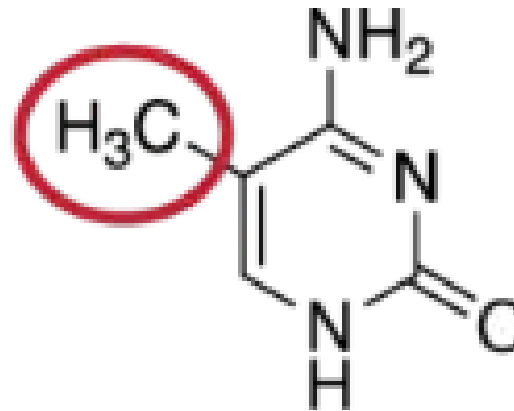
# Como a bactéria se protege das próprias enzimas de restrição?

- com alta probabilidade, uma dada bactéria tem em seu genoma sítios de corte **de suas próprias enzimas de restrição**
- Mas a bactéria tem um gene que codifica uma proteína (uma **metiltransferase**) capaz de adicionar **grupos metila** ( $\text{CH}_3$ ) nas bases A e C desses sítios
- Essa **metilação** protege o genoma da bactéria de suas próprias enzimas de restrição

# Metilação

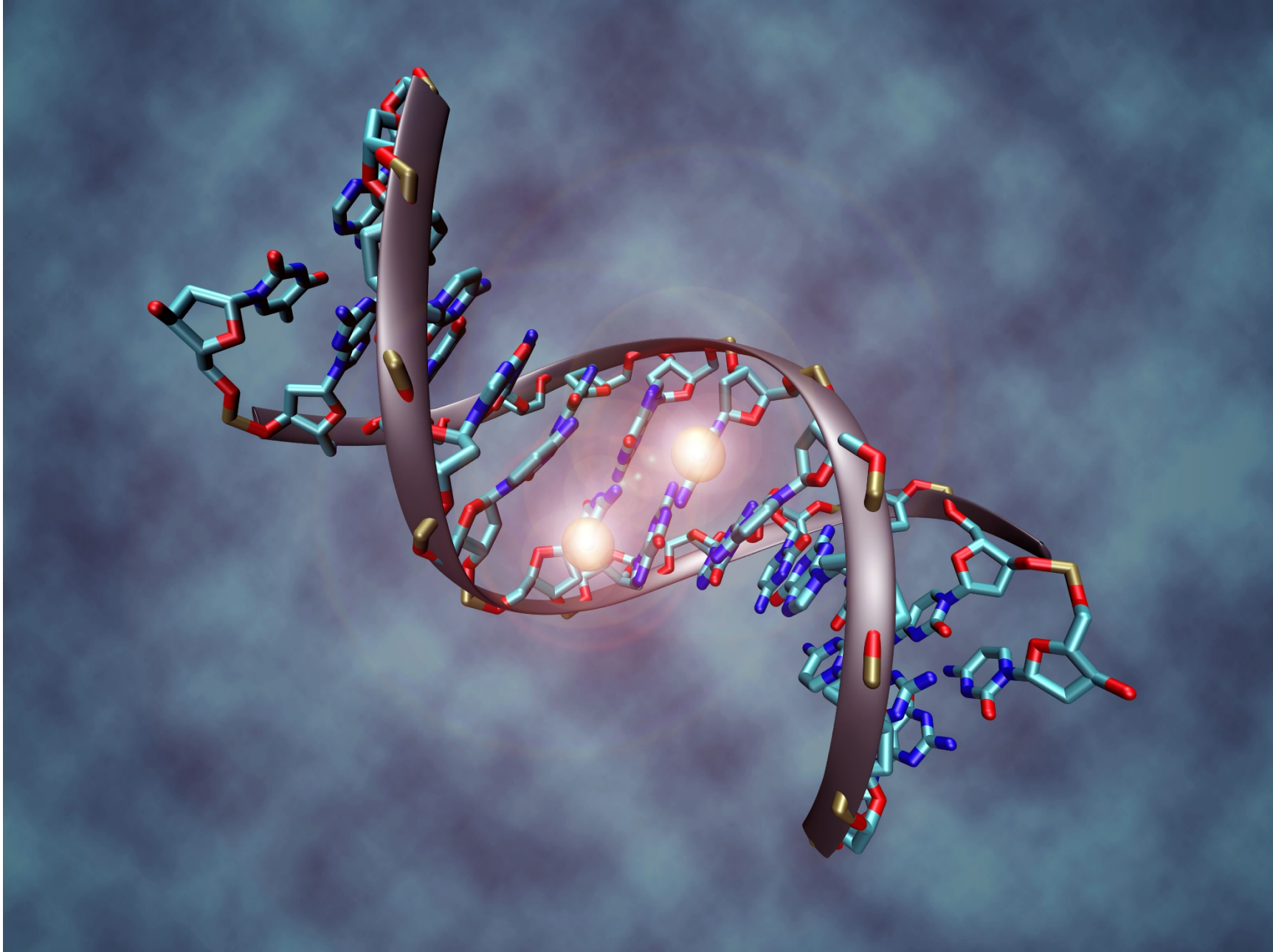


**Cytosine**

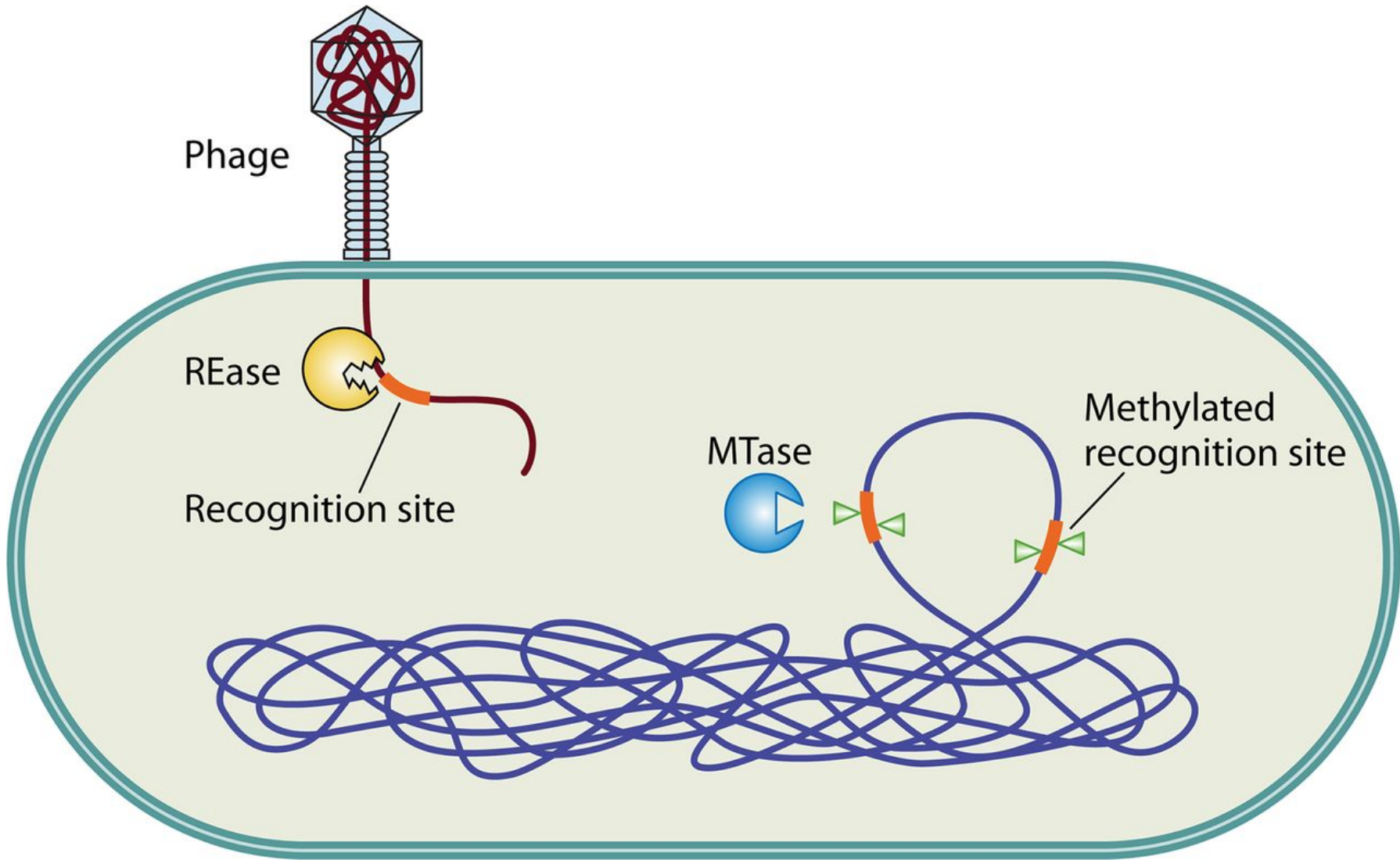


**methylated Cytosine**

a sequência do DNA não muda



[mons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17066877](https://mons.wikimedia.org/w/index.php?curid=17066877)



# SRM

- o conjunto de genes enzimas de restrição + metiltransferases recebe o nome de
  - Sistemas de restrição e modificação
- Há 3 diferentes tipos



# Metilação é um mecanismo comum na **regulação gênica**

- A presença do grupo metila **inibe transcrição**
- anteriormente vimos que metilação também é usada para distinguir a fita parental da fita filha, no processo de replicação

# CRISPR

- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
- CRISPR-cas9
- Sistema usado por bactérias para se defender de virus (bacteriófagos)
- Também resulta em cortes de DNA
- Depende da bactéria “se lembrar” de ataques anteriores
- É como um sistema imunológico

enzimas do sistema

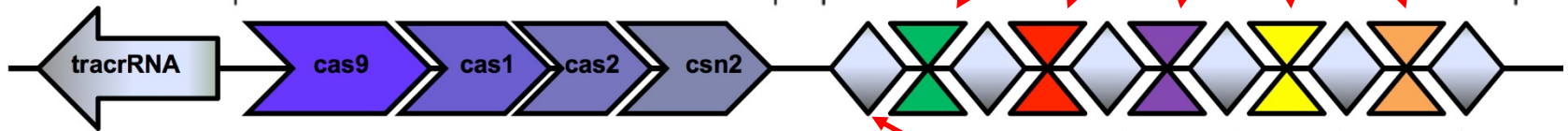
sequências "memorizadas"

espaçadores

CRISPR Locus

cas operon

Repeat-spacer array



sequências repetidas (repeats)

CRISPR array

trans-activating cr RNA

# Exemplo

os repeats são palíndromos parciais



## Regions

922 TCCTCATCTGTTGAGCGAGCTGAGGGCTGCGCCCATCACTCATTGGACCTACCAGGTTTACCCCGTCACGGTCTGACCTGTTCCGGCGGGCGCTACTACCT

Search DR in database

Search Spacers in database

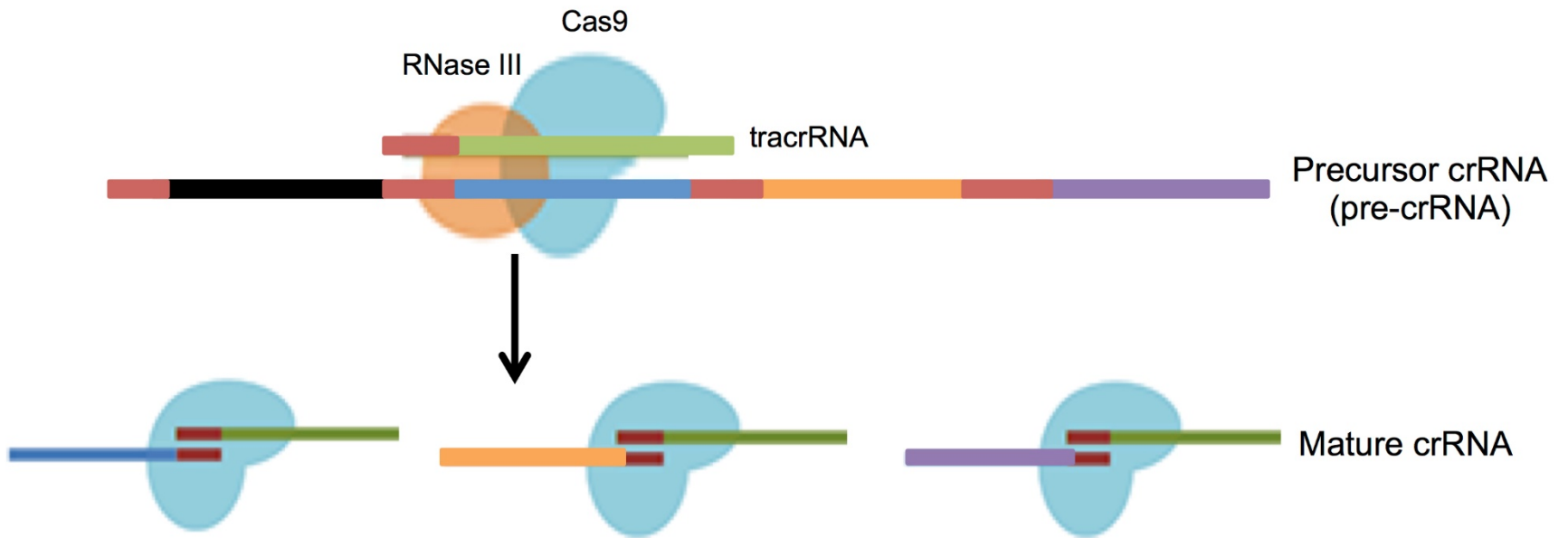
022  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
090  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
156  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
224  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
290  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
358  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
424  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
491  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC  
557  GTTTCAATCCACACGCCC GCATGGGGCGTGAC

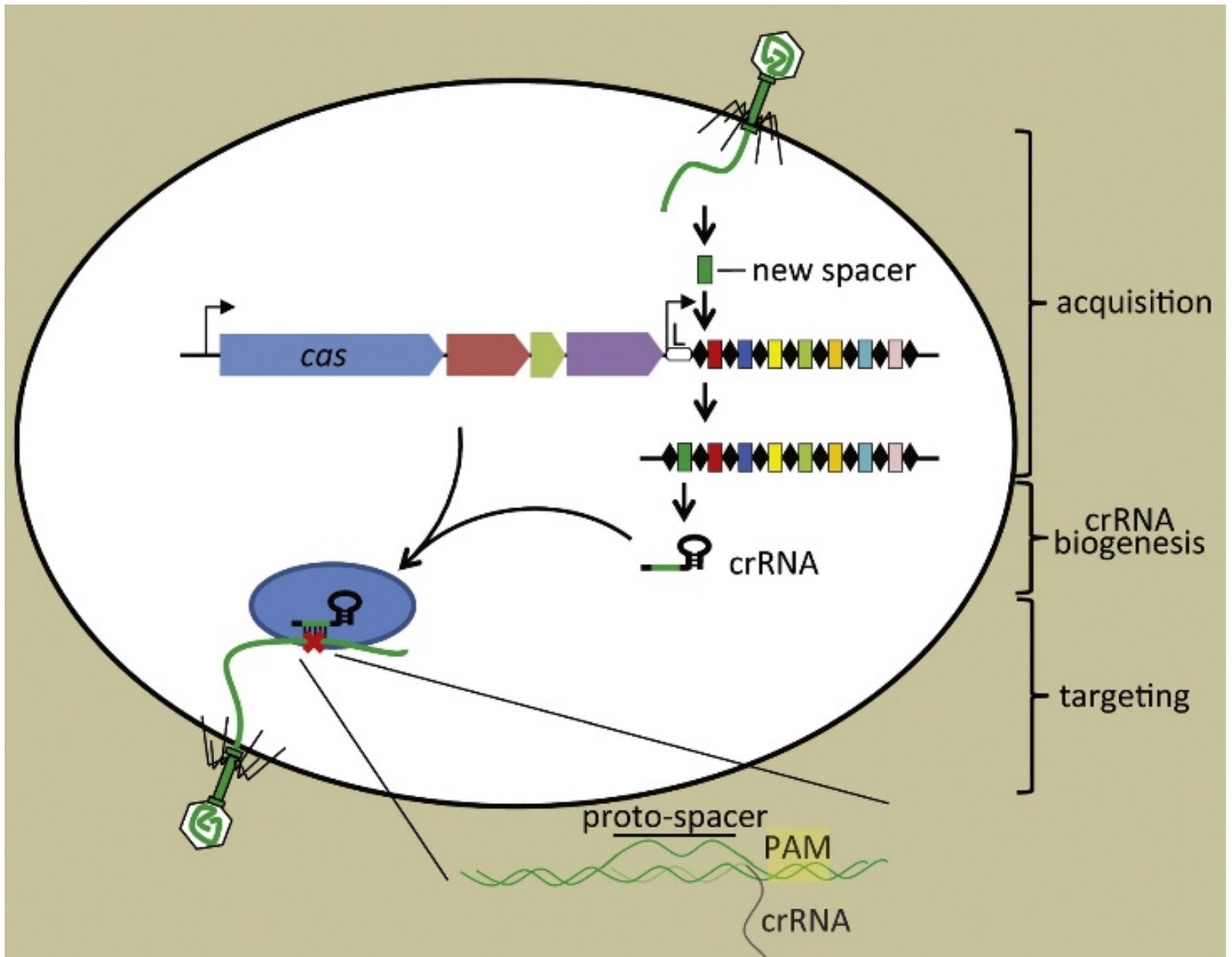
CGTGAATGACTCCGGTGTGCGGGCGTACTGCGCGG  
 TGACGTGCTCGGCATTCTTTGATGGCGGGAAGAT  
 ATCGGTATGGCTGTGAGTGGCTTGGCGCATCAGGCC  
 ACTGGCGGGCCATCGGCCAGGCACTGCTCCAGCA  
 ATGGGCAGGGCCGGCATCAGGCGCCGGTCAGGTGGT  
 AGGCGTATATCGCCGCCGGCGGCAGCTGTTTCAT  
 GGACGCGGGCGCTGCAGACGAGCCTCGCCCAGGCGA  
 GCCTCGCGAGCGTGCGGGGCCAGCTCGTCAGGCGT  
 CTGGCTTCCTCGCGAGCGTAGTGCTCGGTCATGCC

espaçadores

# como funciona o sistema CRISPR-cas9

1. uma cópia do DNA invasor é inserida no DNA da bactéria (espaçador)
2. os espaçadores são transcritos na forma de crRNAs
3. esse crRNA é inserido num complexo (várias moléculas juntas)
4. o complexo “ataca” o DNA invasor, e a enzima cas9 (parte do complexo) corta esse DNA



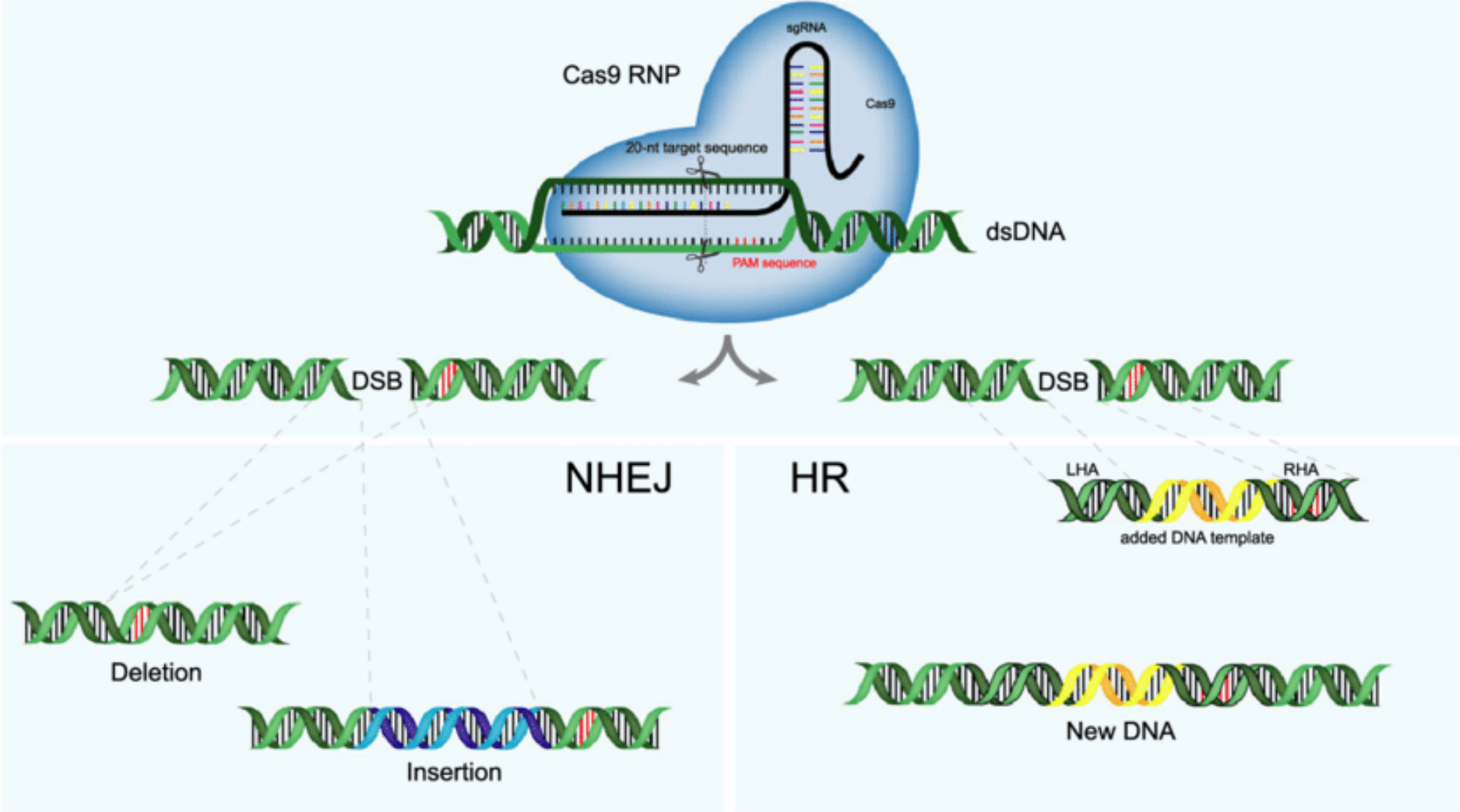


# Um detalhe importante

- A bactéria tem um sistema que captura a sequência de um fago invasor e a insere como espaçador no “crispr array”
- Esse sistema de captura é **diferente** do sistema crispr propriamente ditto
- Essa captura corresponde à etapa de “acquisition” no slide anterior



HR = homologous recombination



Gene disruption by insertions or deletions (INDELs)

Gene correction or addition

NHEJ = nonhomologous end joining

DSB = double stranded break

# edição genômica

- CRISPR-cas9 é o **mais preciso e eficiente** sistema para engenheirar sequências genômicas atualmente conhecido
- está permitindo grandes avanços em ciência e biotecnologia
- Em 2020 as pesquisadoras Jeniffer Doudna e Emmanuele Charpentier ganharam o **prêmio Nobel** por ter descoberto como usar CRISPR-cas9 para edição de genomas
- Uso de CRISPR-cas9 tem trazido serias preocupações éticas

# O caso das gêmeas Lulu e Nana

- gêmeas chinesas que nasceram em outubro de 2018
- O cientista chinês He Jiankui engenheirou os embriões com CRISPR-cas9, alterando o gene *CCR5*
- essa mudança (mutação) teoricamente traz **imunidade ao vírus HIV**
- *CCR5* codifica uma proteína que permite HIV entrar nas células
- Mas o cientista pode ter causado (sem querer) alterações em outras partes do genoma, com efeitos imprevisíveis
- Além disso, *CCR5* possivelmente é necessário para **proteger** as pessoas de outras infecções virais
- em resumo, foi um caso de aplicação de uma nova tecnologia sem as devidas precauções

**BIOTECHNOLOGY**

# The creator of the CRISPR babies has been released from a Chinese prison

He Jiankui created the first gene-edited children. The price was his career. And his freedom.

By Antonio Regalado

April 4, 2022