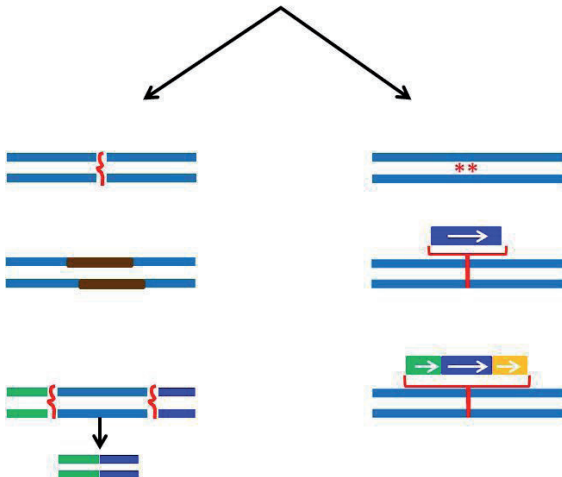
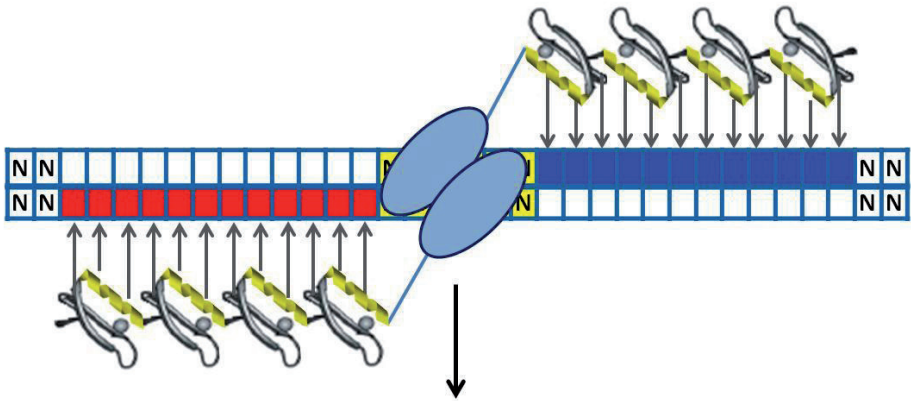


## Edição de Genoma com Nuclease "Zinc Finger"



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Milho e Sorgo  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

# **Documentos 201**

## **Edição de Genoma com Nuclease “*Zinc Finger*”**

Maria José Vilaça de Vasconcelos  
José Edson Fontes Figueiredo

Embrapa Milho e Sorgo  
Sete Lagoas, MG  
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Monica Matoso

Campanha, Roberto dos Santos Trindade, Rosângela Lacerda de

Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: José Edson Fontes Figueiredo

**1ª edição**

**Versão Eletrônica (2016)**

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Milho e Sorgo**

---

Vasconcelos, Maria José Vilaça de.

Edição de genoma com nuclease "Zinc Finger" / Maria José Vilaça de Vasconcelos, José Edson Fontes Figueiredo. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2016.

36 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 201).

1. Melhoramento genético. 2. Genética. 3. Genoma. I. Vasconcelos, Maria Jose Vilaça de. II. Figueiredo, José Edson Fontes. III. Título. IV. Série.

---

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2016

# **Autores**

## **Maria José Vilaça de Vasconcelos**

Farmacêutica, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, Cx. Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, [mjose@cnpms.embrapa.br](mailto:mjose@cnpms.embrapa.br)

## **José Edson Fontes Figueiredo**

Biólogo, D.Sc. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, Cx. Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, [jose.edson@embrapa.br](mailto:jose.edson@embrapa.br)

# Apresentação

Na última década, o sequenciamento completo do genoma de vários organismos ampliou o entendimento sobre o funcionamento dos sistemas biológicos e possibilitou o desenvolvimento de ferramentas para alterá-los de modo preciso. Este campo da pesquisa científica, conhecido como engenharia genômica, utiliza dois tipos de abordagens principais: a manipulação das funções dos genes responsáveis pelo desenvolvimento e pela função fisiológica dos organismos, e estudos sobre os elementos de controle que modulam os níveis de expressão dos genes. Dentre as tecnologias implementadas, destacam-se as ZFNs, que consistem de proteínas quiméricas produzidas pela combinação de proteínas “dedo de zinco” (ZFP, do inglês: zinc finger protein) com endonucleases. As principais aplicações de ZFNs abrangem o silenciamento gênico, correção de genes defeituosos, introdução de novos genes e, por conseguinte, novas funções nos genomas. Nesse documento serão descritos os princípios e as aplicações dessa nova tecnologia de edição genômica.

*Antonio Alvaro Corsetti Purcino*  
Chefe-Geral  
Embrapa Milho e Sorgo

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	6
<b>Tecnologia <i>Zinc Finger Nuclease</i> – ZFN</b> .....	8
<b>Proteínas <i>Zinc Finger</i> (ZFP) e <i>Nuclease Zinc Finger</i> (ZFN) ...</b>	8
<b><i>Zinc Finger Nucleases</i></b> .....	12
<b>Domínio de Ligação de ZFN</b> .....	13
<b>Domínio de Clivagem de ZFN1</b> .....	15
<b>Mecanismos de Reparo do DNA e Aplicações de ZFNS</b> .....	15
Sistema NHEJ .....	16
Sistema HR.....	17
<b>Perspectivas e Aplicações da Tecnologia ZFN</b> .....	18
<b>Avanços e Desafios Futuros para o Uso de ZFN</b> .....	21
<b>Conclusões</b> .....	22
<b>Referências</b> .....	23

# Edição de Genoma com Nuclease “Zinc Finger”

---

*Maria José Vilaça de Vasconcelos<sup>1</sup>*

*José Edson Fontes Figueiredo<sup>2</sup>*

## Introdução

O termo genoma refere-se ao conjunto de sequências de DNA de uma célula que contém toda informação necessária para o desenvolvimento, funcionamento e a perpetuação de uma espécie. As primeiras tentativas de manipulação de genomas visando o desenvolvimento de linhagens de células somáticas recombinantes utilizando o mecanismo natural de recombinação homóloga (HR, do inglês, *homologous recombination*) não foram eficazes (FOLGER et al., 1982; PANDEY, 1983; SMITHIES et al., 1985). Isso se deveu principalmente ao fato de que as taxas naturais de recombinação homóloga em células somáticas são muito baixas. Ao longo dos anos, diversos procedimentos foram criados para amplificar os níveis basais de recombinação homóloga e melhorar a eficiência das recombinações somáticas, empregando agentes químicos, radiação ionizante, expressão transiente de enzimas de restrição ou a utilização do adenovírus rAAV (do inglês, *recombinant adeno-associated virus*) (MINGOZZI; HIGH, 2013; PUCHTA, 1999; RUSSELL;

HIRATA, 1998). Na última década, o genoma de vários organismos foi completamente sequenciado, ampliando o entendimento sobre o funcionamento dos sistemas biológicos e possibilitando o desenvolvimento de ferramentas para a sua alteração de modo preciso. Este campo da pesquisa científica, conhecido como engenharia genômica, utiliza dois tipos de abordagens principais: a manipulação das funções dos genes responsáveis pelo desenvolvimento e pela função fisiológica do organismo, e estudos sobre os elementos de controle que modulam os níveis de expressão dos genes.

Entre as tecnologias criadas para promover edições genômicas destacam-se as nucleases “engenheiradas”, tais como ZFN (do inglês, *zinc finger nuclease*), TALEN (do inglês, *transcription-activator-like effector nuclease*) e o sistema CRISPR/Cas9 (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/associated system*) (JABALAMELI et al., 2015; KIM, E. et al., 2012; KIM, Y. et al., 2013a, 2013b; MILLER et al., 2010; OSAKABE; OSAKABE, 2015; TEIMOURIAN; ABDOLLAHZADEH, 2015). Essas três metodologias possibilitam ao biólogo molecular gerar quebras duplas em locais específicos da molécula de DNA, que são reparadas pelos sistemas HR e NHEJ (do inglês, *non-homologous end joining*). Apesar de serem utilizadas com o mesmo objetivo, cada abordagem difere no mecanismo usado para conduzir as modificações genéticas, o que torna cada uma delas particularmente mais adequada para resolver desafios específicos na edição de genomas (KIM, Y. et al., 2013a). Nesse documento será abordada a estratégia de edição genômica mediada por ZFN, enfocando seu desenvolvimento, funcionamento e usos.



## **Tecnologia *Zinc Finger Nuclease* – ZFN**

A tecnologia ZFN desenvolve desenhos personalizados de proteínas destinadas a reconhecer e clivar a dupla fita de DNA em locais específicos no genoma (KIM, S. et al., 2011). ZFNs são proteínas quiméricas que combinam as proteínas ZFP (do inglês, *zinc finger proteins*) com endonucleases, geralmente o domínio de clivagem da enzima de restrição FokI (KIM, J. S. et al., 2010). ZFN constitui ferramenta eficaz para realizar o silenciamento gênico (knockout) por meio de NHEJ, ou então por HR, corrigir genes defeituosos no genoma ou introduzir um gene, ou cassetes gênicos, nos locais de quebra dupla no DNA (DURAI et al., 2005; KIM, S. et al., 2011; MOELLER; WANG, 2005; PORTEUS; CARROLL, 2005). ZFNs podem ser introduzidas, nas células ou embriões, como construções de DNA ou RNA e ainda como proteínas, por meio de microinjeção, infecção, transfecção ou eletroporação (HARRISON et al., 2014).

### **Proteínas *Zinc Finger* (ZFP) e Nuclease *Zinc Finger* (ZFN)**

*Zinc finger protein* (ZFP) ou na tradução livre para o português “proteína dedo de zinco” constitui um grupo estruturalmente diverso de proteínas que desempenham funções variadas nas células, tais como replicação e reparo de DNA, transcrição, tradução, metabolismo, sinalização, proliferação celular, apoptose, transcrição reversa e montagem de partículas virais (KRISHNA et al., 2003). Essas proteínas são definidas como domínios funcionais de aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos, que formam arranjos modulares de três a sete domínios *zinc finger* (ZF) e cuja estabilidade estrutural é

determinada pela ligação de pelo menos um átomo de zinco (LAITY et al., 2001). Em aproximadamente metade das ZFPs, os domínios ZF ligam-se uns aos outros por meio de uma região conservada de aminoácidos (TGEKP) e o resíduo do aminoácido lisina (K) faz contato com o fosfato do DNA (LAITY et al., 2000; WOLFE et al., 2000). ZFs possuem estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélice e duas fitas  $\beta$  ( $\beta\beta\alpha$ ), mantidas unidas pelo átomo de zinco, gerando uma estrutura tridimensional tetraédrica com o aspecto de “dedo”, derivando o nome dessas proteínas. Os domínios contendo zinco interagem com diferentes tipos de moléculas, tais como DNA, RNA, proteínas lipídios ou moléculas hidrofóbicas pequenas como os hormônios esteroides (LAITY et al., 2001). Nos ácidos nucleicos (DNA, RNA), a alfa-hélice do “dedo de zinco” se liga a três bases nitrogenadas em uma das cadeias do DNA, e a uma base na outra cadeia, por meio de ligações de pontes de hidrogênio. Essa propriedade do domínio *zinc finger* constitui a plataforma para o desenho de novos domínios ZF para se ligarem ao DNA com alto grau de precisão (JABALAMELI et al., 2015).

Proteínas ZFPs contendo múltiplos “dedos de zinco” ligados de forma adjacente aumentam o tamanho do sítio de reconhecimento e a especificidade de ligação no DNA. O “dedo de zinco” pode ser facilmente modificado e pequenas alterações nos aminoácidos das cadeias laterais da alfa-hélice que fazem contato com o DNA são suficientes para mudar a especificidade das ligações ZFP/DNA. Essa característica é fundamental para a engenharia de motivos ZF que reconhecem sequências específicas do DNA evitando ligações indesejadas, fora do alvo que se pretende manipular (LUSCOMBE et al., 2000; MANSOORI, 2005). Existem várias estratégias para a construção de arranjos de ZFP para ligação a diferentes DNAs-

alvo. A abordagem mais usada baseia-se na montagem de ZFP com módulos de ZF cujas especificidades de ligação ao DNA sejam bem conhecidas. Dessa forma é possível criar ZFs para se ligarem a qualquer uma das 64 possibilidades de combinações entre três bases do DNA, e, em seguida, montá-los para criar proteínas que se ligam de maneira precisa a qualquer sequência de DNA (PAVLETICH; PABO, 1991). Outras estratégias para engenharia de ZFs bastante utilizadas incluem o sistema híbrido simples de levedura (*yeast one-hybrid system*), híbrido simples de bactéria (*bacterial one-hybrid system*), sistema duplo híbrido bacteriano (*bacterial two-hybrid system*) e emprego de células de mamíferos (JOUNG et al., 2010; KIM, J. S. et al., 2010). O uso da técnica “phage display” também possibilitou gerar domínios ZF que reconhecem a maioria dos tripletes de bases no DNA (GREISMAN; PABO, 1997; JOUNG et al., 2010). Em 2002, Sera e Ungara determinaram o codon não degenerado de reconhecimento de ZF no DNA e utilizaram essas informações para desenhar ZFP capazes de se ligarem com alta especificidade ao DNA (SERA; UNGARA, 2002). Recentemente, Najafabadi et al. (2015) ampliaram as informações sobre os sítios de reconhecimento de Cys2-His2. Combinando dados de um sistema *one-hybrid* bacteriano modificado, microarranjos de *protein-binding* e imunoprecipitação de cromatina, demonstraram que C2H2-ZFs humano se ligavam ao DNA, e utilizando dados de análise de milhares de domínios C2H2-ZF identificaram o código de reconhecimento dessa família de proteínas (NAJAFABADI et al., 2015).

Existem mais de 40 tipos de ZFP anotados no UniProtKB, sendo que os mais frequentes são os tipos C2H2 (Cys2His2), CCHC, PHD- e RING. O tipo C2H2, também conhecido como Krüppel, é um fator de transcrição (Fator IIIA) inicialmente identificado

em *Xenopus laevis* e representa o primeiro domínio ZF descrito na literatura (BROWN et al., 1985; MILLER et al., 1985; WOLFE et al., 2000). O fator IIIA possui nove repetições de 30 aminoácidos e cada domínio forma uma estrutura secundária  $\beta\beta\alpha$  coordenada por um íon de zinco que se posiciona entre duas cisteínas na fita  $\beta$ , e duas histidinas na alfa-hélice, por isso o nome Cys2His2 (KRISHNA et al., 2003; LEE et al., 1989). Proteínas ZFP do tipo C2H2 são as mais frequentes no genoma de várias espécies e a maioria delas são fatores ativação ou repressão da transcrição que se ligam em domínios específicos na molécula de DNA (BOUHOUCHE et al., 2000; GOMMANS et al., 2007). Proteínas do tipo C2H2 geralmente possuem 2-4 domínios em tandem que fazem parte de uma proteína maior. Aminoácidos das cadeias laterais da alfa-hélice de cada módulo formam ligações com nucleotídeos localizados na alça maior da molécula de DNA (ELROD-ERICKSON et al., 1996; PAVLETICH; PABO, 1991). Os contatos entre ZF e DNA são realizados através dos aminoácidos 6, 3-2 e -1 das cadeias laterais da alfa-hélice. Os aminoácidos 6, 3 e -1 reconhecem três bases em uma das cadeias do DNA, enquanto o aminoácido 2 reconhece uma quarta base na outra cadeia e que é complementar à base reconhecida pelo aminoácido 6. Contudo, tipos diferentes de interações foram observados em outras famílias ZFPs (WUTTKE et al., 1997; NOLTE et al., 1998).

O conjunto de características das proteínas ZFP, tais como a propriedade de ligação com nucleotídeos específicos do DNA; a relativa facilidade para alterar domínios individuais de ZF para reconhecimento de qualquer sequência de trinucleotídeos; a simplicidade das ligações entre dois ou mais ZF e a preservação da estrutura e função dos módulos ZF após a fusão com nucleases, possibilitou a sua utilização como ferramenta ideal

para edição de genomas (KIM; KIM, 2014; KIM, H. J. et al., 2009; URNOV et al., 2010). Assim, nucleases dedo de zinco (ZFN) podem ser desenhadas para clivar virtualmente qualquer sequência de nucleotídeos do DNA (KLUG, 2010).

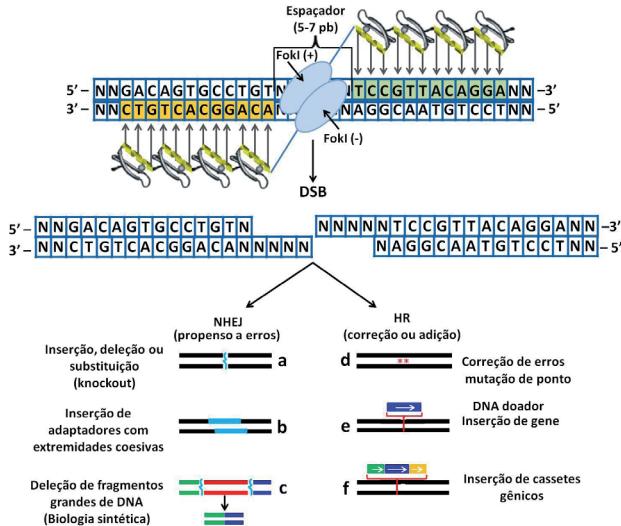
## ***Zinc Finger Nucleases***

Nucleases “dedo de zinco” (ZFNs) são proteínas quiméricas planejadas para reconhecer e clivar sequências específicas de nucleotídeos no DNA genômico, possibilitando a realização de mutagênese sítio dirigida (DURAI et al., 2005; JABALAMELI et al., 2015; PORTEUS; CARROLL, 2005). ZFNs são construídas como módulos de dois ou mais domínios *zinc finger* que são ligados ao domínio de clivagem de uma nuclease, geralmente a enzima de restrição FokI, por um peptídeo flexível de aproximadamente 15 aminoácidos, por exemplo (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (KANDAVELOU et al., 2009). A enzima FokI apresenta atividade catalítica apenas quando dimerizada, por isso sua utilização para a engenharia genômica impõe a necessidade de se desenhar pares de ZFNs capazes de se ligarem de modo invertido e em cadeias opostas do DNA. Além disso, as extremidades carboxiterminal das ZFNs precisam estar distantes uma da outra por aproximadamente 4-7 pares de bases de modo a permitir a dimerização dos domínios de clivagem de FokI (CATHOMEN; JOUNG, 2008; MANI et al., 2005; URNOV et al., 2010). Assim, a ruptura da fita dupla de DNA é feita por duas ZFNs diferentes que são introduzidas na célula ao mesmo tempo. Logo após a quebra, os mecanismos de reparo NHEJ e HR da célula são induzidos para que o dano ocasionado à molécula seja corrigido (Figura 1). O mecanismo de reparo *non-homologous end joining* (NHEJ) é aleatório e pode introduzir deleções, inserções ou substituições,

acarretando mudanças na janela de leitura do DNA. ZFNs são, portanto, particularmente eficazes para promoverem mudança de função, silenciamento gênico ou deleções cromossômicas, enquanto reparos por HR podem corrigir ou substituir um gene mutado ou introduzir cassetes de genes em locais específicos, previamente escolhidos no genoma (LEE et al., 2009).

## **Domínio de Ligação de ZFN**

A especificidade funcional de ZFN é devida a alta conservação dos domínios ZF que interagem com o DNA (CHEN et al., 2012; LAITY et al., 2001). O domínio de ligação das ZFNs ao DNA é formado por unidades modulares de três a seis repetições de ZF. Cada unidade “dedo de zinco” reconhece 3-4 bases no DNA, por meio do contato da  $\alpha$ -hélice da ZFN com a alça maior do DNA (PAVLETICH; PABO, 1991; KLUG, 2010). Considerando que cada ZF reconhece três nucleotídeos do DNA, então um par de ZFN, em que cada membro do par contenha três módulos ZF, pode reconhecer uma sequência de dezoito pares de bases do DNA e do ponto de vista teórico essa especificidade de ligação é suficiente para possibilitar o direcionamento das nucleases para apenas um locus do genoma humano, por exemplo, com aproximadamente 3,2 bilhões de pares de bases, e assim assegurar que somente o alvo desejado seja identificado (KIM, Y. G. et al., 1996; MAEDER et al., 2008).



**Figura 1. Esquema de funcionamento da tecnologia ZFN.** A ligação do par de ZFN ao sítio específico do DNA (nucleotídeos hipotéticos na figura) gera dupla quebra na molécula (DSB) pela atividade dos dois domínios de clivagem de FokI, no espaço entre os dois sítios de reconhecimento. O sistema de sinalização de danos no DNA é ativado e aciona o mecanismo de reparo celular (NHEJ ou HR). Na ausência de uma molécula doadora, o mecanismo NHEJ é ativado e a correção da dupla quebra pode gerar o silenciamento gênico por perda, ganho ou substituição de bases (a). A dupla quebra do DNA com ZFN pode gerar extremidades coesivas (adaptadores) e serem usadas para ligação de DNA exógeno (b). O uso de dois pares de ZFNs que se ligam em pontos distantes do DNA pode gerar a perda de grandes segmentos cromossômicos (c). Na presença de um DNA doador, outro mecanismo celular de reparo (HR) pode ser usado para corrigir mutações de ponto no DNA (d) ou para introduzir um (e) ou mais genes (f), em um local pré-estabelecido no genoma.

## Domínio de Clivagem de ZFN

Conforme foi mencionado anteriormente, o domínio de clivagem da enzima de restrição FokI é o mais utilizado para construção de ZFNs. A endonuclease FokI isolada de *Flavobacterium okeanoikoites* é uma proteína dimérica e cada subunidade possui um domínio N-terminal de ligação ao DNA e um domínio de clivagem inespecífica localizado na extremidade C-terminal (KIM, Y. G. et al., 1996; WAH et al., 1998). A enzima também apresenta uma região de autorreconhecimento que é responsável pela dimerização das duas subunidades, e cada uma delas reconhece e se liga a uma das cadeias do DNA (BITINAITE et al., 1998). FokI reconhece a sequência 5'-GGATG-3' no DNA e corta qualquer sequência inespecífica de nucleotídeos nas proximidades do sítio de ligação da enzima, na posição nove nucleotídeos abaixo em uma das cadeias e 13 nucleotídeos acima, na outra.

## Mecanismos de Reparo do DNA e Aplicações de ZFNs

Existem diversas vias de reparo de DNA nas células, cada uma com diferentes enzimas que atuam em distintos tipos de lesões. No reparo de DSBs, dois sistemas de reparo distintos podem ser acionados: a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) ou a recombinação homóloga (HR) (SONODA et al., 2006). Esses dois mecanismos de reparo atuam em momentos distintos nas diferentes fases do ciclo celular. NHEJ atua no reparo da dupla hélice na fase G1 do ciclo celular, enquanto que a HR começa a ter a sua atuação somente no final da fase S, quando a fita homóloga fica disponível como molde para o reparo, até a fase G2.



## Sistema NHEJ

A quebra dupla na molécula de DNA ativa a via sinalizadora do sistema de reparo de DNA da célula, conhecida como resposta por danos. Em seguida a célula ativa a maquinaria de reparo NHEJ para corrigir a quebra dupla na molécula de DNA, que em aproximadamente 70% das vezes produz deleções no sítio de reparo (GORBUNOVA; LEVY 1999; REMY et al., 2010). O mecanismo de reparo NHEJ usa várias enzimas para realizar o reparo de DSB e apresenta particularidades que definem seus subtipos: Ku-dependente e Ku-independente (DERIANO; ROTH, 2013; YU; GABRIEL, 2003). No mecanismo NHEJ dependente do fator de proteção Ku, as proteínas Ku70 e Ku80 formam um heterodímero (Ku70/Ku80) que se liga às extremidades do DNA no sítio de clivagem. Em seguida, a proteína DNA-PKcs sinaliza a presença da quebra e ativa o complexo, XRCC4-ligase IV e seu cofator divalente (magnésio/mangânês) (DERIANO; ROTH, 2013). Essa via de reparo do DNA pode gerar alterações no sítio de clivagem e conseqüentemente o silenciamento gênico ou mudanças nas sequências de aminoácidos de proteínas. Outro mecanismo de reparo NHEJ, independente do fator Ku, também apresenta subdivisões e particularidades, mas o principal entre eles, MHEJ (do inglês, *microhomology-mediated end-joining*), envolve a participação de DNA polimerase e DNA ligase e produz deleções maiores que aquelas observadas no reparo realizado por NHEJ dependente de Ku (CRESPAN et al., 2012).

Em células tratadas apenas com ZFN, sem a presença de um DNA doador, o processo de reparo da dupla fita de DNA frequentemente liga as duas extremidades clivadas de maneira imprecisa gerando perda de parte da informação genética (deleção), acréscimo de alguns nucleotídeos (inserção) ou deleção (GORBUNOVA; LEVY, 1999).

Em plantas, o mecanismo de reparo NHEJ parece ser o mais utilizado e pode ser útil para estudos de função por silenciamento de atividade gênica (PUCHTA, 2005).

## Sistema HR

O reparo de DNA via recombinação homóloga utiliza extensões da fita homóloga para reparar as quebras, por isso, geralmente, está livre de erros. Essa via de reparo envolve a associação de proteínas da família RAD52 (RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 e XRS2), que formam um complexo proteico junto à extremidade do DNA danificado. Outras proteínas também relacionadas à recombinação homóloga são a BRCA1 e a BRCA2. Estas proteínas são codificadas por genes que também estão envolvidos na complexa rede da via de reparo das DSBs.

Outra possibilidade de uso de ZFNs para edição genômica baseia-se no tratamento das células com ZFN e um DNA doador codificando a sequência correta de um gene. Durante o processo de reparo da dupla quebra do DNA, a célula hospedeira pode usar o DNA doador como molde para reparar o gene defeituoso, permitindo a expressão do gene em seu contexto genômico. Essa nova abordagem para o reparo preciso de mutações deletérias no DNA, poderá ser aplicada em curto prazo de tempo para o tratamento de genes defeituosos com padrão de herança monogênica (SIVALINGAM et al., 2016; TESTA et al., 2013). Além disso, a introdução de novos genes em local previamente definido no genoma de uma célula possibilita a reprogramação celular para execução de novas funções. A inserção de genes em local específico do genoma elimina os efeitos indesejados das mutações devidas

à inserção aleatória de genes nos cromossomos, comuns nos procedimentos tradicionais de transformação.

Essas peculiaridades do sistema de reparo do DNA podem ser usadas para produzir o silenciamento gênico, corrigir genes defeituosos ou introduzir novos genes nas células.

## **Perspectivas e Aplicações da Tecnologia ZFN**

Novas aplicações para a tecnologia ZFN estão sendo desenvolvidas por meio da criação de novos domínios específicos de clivagem para FokI visando a ativação (ZFA) ou repressão da transcrição (ZFR) e metilação de promotores (ZFM).

A edição de genomas empregando ZFN apresenta grande potencial para auxiliar na descoberta de novas drogas medicamentosas ou a sua aplicação direta como nuclease, sendo ela própria utilizada com a finalidade terapêutica (COX et al., 2015; PORTEUS, 2015). Nucleases de sequências específicas também poderão ser empregadas para desativar genes que codificam proteínas que causam patologias, ou para gerar bibliotecas de “knockouts” gênicos visando estabelecer a função de genes individuais (KIM, Y. et al., 2013b).

Entre as vantagens da engenharia genômica realizada por ZFN destacam-se a redução dos processos de escrutínio e seleção necessários para identificação dos genótipos desejados. Além disso, os produtos gerados com essa tecnologia não estão sujeitos às regulamentações existentes para liberação de organismos geneticamente modificados pelos métodos

tradicionais, pois as alterações processadas são passíveis de ocorrerem naturalmente por mutações (ISASI et al., 2016; WOLT et al., 2016).

Na área da saúde humana, a edição genômica mediada por ZFN foi usada com sucesso para gerar “knockout” no gene CCR5 que codifica o principal receptor para ligação do vírus HIV nas células (HOFFMAN et al., 2013; PEREZ et al., 2008) e atualmente está em fase de ensaios clínicos nos EUA para o tratamento de AIDS (HOLT et al., 2010).

Na agricultura, a edição genômica é considerada uma área promissora e com grande potencial para o melhoramento genético de culturas economicamente importantes. Ao longo da última década, a bioinformática e o sequenciamento de genomas de várias espécies de plantas possibilitaram grande avanço no conhecimento sobre o controle genético de características agrônômicas importantes, tais como doenças e resistência aos diferentes tipos de estresses abióticos, alergenicidade e qualidade nutricional, entre outras. Essas informações são essenciais para a edição genômica (GIL-HUMANES; VOYTAS, 2014; VOYTAS; GAO, 2014). Por exemplo, nos casos em que a perda da função de determinado gene pode conferir algum tipo de vantagem adaptativa para a planta em estudo, sequências específicas de nucleases ZFN podem nocautear o gene-alvo desejado. Do mesmo modo, genes exógenos podem ser introduzidos em uma variedade conferindo propriedades novas. Essa abordagem pode representar uma economia de recursos materiais e tempo necessários para realização de retrocruzamentos em programas tradicionais de melhoramento de plantas. Variedades de plantas cultivadas, com destaque para milho, soja, canola, e

algodão, tolerantes a herbicidas estão sendo desenvolvidas em vários laboratórios aplicando-se tecnologia de edição de genoma por ZFN (PRATT et al., 2014). Em milho, Shukla et al. (2009) utilizaram, simultaneamente, a expressão de ZFN e um gene heterólogo doador que codificava para a proteína phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT) que confere tolerância ao herbicida glufosinato. O evento gerou plantas resistentes, cujas alterações foram processadas exatamente no locus-alvo (*IPK1*). As plantas modificadas transmitiram as alterações genéticas para as gerações seguintes, indicando o caráter estável e a integração do gene heterólogo no genoma. Ao mesmo tempo em que a mutação produziu plantas tolerantes ao glufosinato, foi também observado o silenciamento do locus-alvo, *IPK1*, resultando em alteração do perfil de fosfato inositol nas sementes em germinação.

Dependendo do objetivo, ZFN pode fazer parte do produto final da reação entre ZFN e o DNA. Nos casos em que ZFN não é desejada como produto final, RNA da construção de ZFN é introduzido na célula e a expressão transiente é suficiente para que ocorra a expressão, ligação e corte da sequência-alvo na dupla fita de DNA. Dependendo do método utilizado para introdução de ZFN na célula, o DNA da construção ZFN pode ser naturalmente degradado ou rejeitado. Em todos esses casos, o produto final não contém DNA de ZFN, apenas as alterações desejadas no genoma da planta (CAI et al., 2009; PETOLINO et al., 2010; SHUKLA et al., 2009).

## Avanços e Desafios Futuros para o Uso de ZFN

A edição genômica cria oportunidades para a alteração genética, rápida e precisa, visando o aumento da produção em plantas de culturas importantes, proteção de plantas contra diferentes condições de estresses bióticos e abióticos, ou melhoramento da qualidade nutricional (PETOLINO, 2015; TOWNSEND et al., 2009; VOYTAS; GAO, 2014). Os benefícios dessa pesquisa aplicada em plantas dependerão de como os países decidirão regular essa tecnologia cuja aplicação se torna cada dia mais presente nos estudos da biologia vegetal. As autoridades norte-americanas estão se posicionando favoravelmente ao entendimento de que variedades de culturas geradas através da edição de genomas não constituem organismos geneticamente modificados, portanto não necessitam de estudos regulatórios para a sua liberação. Contudo, isso ainda não está definido por legislação. A União Europeia ainda não emitiu nota oficial sobre o assunto.

Uma das limitações para o emprego de ZFN em engenharia genômica está relacionada com a ocorrência de alterações não desejadas, ou seja, fora do alvo pretendido, que geram efeitos citotóxicos causando a morte celular (BIBIKOVA et al., 2002; PORTEUS, 2006; PORTEUS; BALTIMORE, 2003). Alguns estudos demonstraram que a citotoxicidade é uma consequência da ocorrência de DSBs fora do alvo interferindo na atividade de genes essenciais para o funcionamento adequado da célula, pois células tratadas com ZFP sem nuclease, ou ZFNs contendo mutações que impossibilitam a clivagem do DNA, não apresentam os efeitos tóxicos (BEUMER et al., 2006; JONES, 2015; PRUETT-MILLER et al., 2009). Estratégias para

reduzir o número de DSBs fora do alvo incluem o aumento da especificidade de ligação de ZFN ou a heterodimerização dos pares de ZFN (DOYON et al., 2008; MOEHLE et al., 2007; PRUETT-MILLER et al., 2009). Várias abordagens têm sido utilizadas para identificar a presença de alvos de ZFN nos genomas, entre elas podem ser destacados o emprego da bioinformática e o sequenciamento dos sítios de integração de vectores lentivirais defectivos para integrase (GABRIEL et al., 2011; HOCKEMEYER et al., 2009; PATTANAYAK et al., 2011; PEREZ et al., 2008). Esses estudos têm demonstrado que os eventos de clivagem por ZFN fora do alvo planejado ocorrem a uma taxa que varia entre 1 e 6% (SIVALINGAM et al., 2016).

## Conclusões

O uso de técnicas de edição genômica está gerando um novo paradigma no melhoramento de plantas. Abordagens clássicas para melhoramento de cultivares com base na hibridação e seleção podem agora ser complementadas com o uso de novas técnicas de manipulação genética que exploram de forma sistemática o conhecimento sobre as sequências regulatórias e de genes específicos. Ao contrário dos métodos clássicos de transformação genética que resultam na inserção de grandes fragmentos de DNA exógeno, a edição genômica altera de forma precisa apenas a sequência do gene ou insere um ou mais genes heterólogos na planta hospedeira, sem que ocorra a inserção do DNA-vetor.

Alterações genéticas geradas através da edição genômica, pelo menos na sua forma mais simples, são indistinguíveis daquelas geradas por meio de mutações naturais ou induzidas. A edição genômica está sendo reconhecida como uma ferramenta

poderosa na pesquisa e desenvolvimento de organismos melhorados com características específicas.

## Referências

BEUMER, K.; BHATTACHARYYA, G.; BIBIKOVA, M.; TRAUTMAN, J. K.; CARROLL, D. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. **Genetics**, Austin, v. 172, p. 2391-2403, 2006.

BIBIKOVA, M.; GOLIC, M.; GOLIC, K. G.; CARROLL, D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. **Genetics**, Austin, v. 161, p. 1169-1175, 2002.

BITINAITE, J.; WAH, D. A.; AGGARWAL, A. K.; SCHILDKRAUT, I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 18, p. 10570-10575, 1998.

BOUHOUCHE, N.; SYVANEN, M.; KADO, C. I. The origin of prokaryotic C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger regulators. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 77-81, 2000.

BROWN, R. S.; SANDER, C.; ARGOS, P. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 186, p. 271-274, 1985.

CAI, C. Q.; DOYON, Y.; AINLEY, W. M.; MILLER, J. C.; DEKELVER, R. C.; MOEHLE, E. A.; ROCK, J. M.; LEE, Y. L.; GARRISON, R.; SCHULENBERG, L.; BLUE, R.; WORDEN, A.; BAKER, L.; FARAJI, F.; ZHANG, L. Targeted transgene integration in plant cells



using designed zinc finger nucleases. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 6, p. 699-709, 2009.

CATHOMEN, T.; JOUNG, J. K. Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 7, p. 1200-1207, 2008.

CHEN, Y.; BATES, D. L.; DEY, R.; CHEN, P. H.; MACHADO, A. C. D.; LAIRD-OFFRINGA, I. A.; ROHS, R.; CHEN, L. DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1197-1206, 2012.

COX, D. B. T.; PLATT, R. J.; ZHANG, F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. **Nature Medicine**, New York, v. 21, n. 2, p. 121-131, 2015.

CRESPAN, E.; CZABANY, T.; MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases and on normal and repetitive DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 40, p. 5577-5590, 2012.

DERIANO, L.; ROTH, D. B. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 47, p. 433-455, 2013.

DOYON, Y.; McCAMMON, J. M.; MILLER, J. C.; FARAJI, F.; NGO, C.; KATIBAH, G. E.; AMORA, R.; HOCKING, T. D.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D.; AMACHER, S. L. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed

zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 702-708, 2008.

DURAI, S.; MANI, M.; KANDAVELOU, K.; WU, J.; PORTEUS, M. H.; CHANDRASEGARAN, S. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 5978-5990, 2005.

ELROD-ERICKSON, M.; ROULD, M. A.; NEKLUDOVA, L.; PABO, C. O. Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. **Structure**, Philadelphia, v. 4, p. 1171-1180, 1996.

FOLGER, K. R.; WONG, E. A.; WAHL, G.; CAPECCHI, M. R. Patterns of integration of DNA microinjected into cultured mammalian cells: evidence for homologous recombination between injected plasmid DNA molecules. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 2, p. 1372-1387, 1982.

GABRIEL, R.; LOMBARDO, A.; ARENS, A.; MILLER, J. C.; GENOVESE, P.; KAEPPPEL, C.; NOWROUZI, A.; BARTHOLOMAE, C. C.; WANG, J.; FRIEDMAN, G.; HOLMES, M. C.; GREGORY, P. D.; GLIMM, H.; SCHMIDT, M.; NALDINI, L.; VON KALLE, C. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, p. 816-823, 2011.

GIL-HUMANES, J.; VOYTAS, D. F. Wheat rescued from fungal disease. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, n. 9, p. 886-887, 2014.

GOMMANS, W. M.; McLAUGHLIN, P. M.; LINDHOUT, B. I.; SEGAL, D. J.; WIEGMAN, D. J.; HAISMA, H. J.; VAN DER ZAAL, B. J.; ROTS, M. G. Engineering zinc finger protein transcription factors to downregulate the epithelial glycoprotein-2 promoter as a novel anti-cancer treatment. **Molecular Carcinogenesis**, New York, v. 46, n. 5, p. 391-401, 2007.

GORBUNOVA, V. V.; LEVY, A. A. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 7, p. 263-269, 1999.

GREISMAN, H. A.; PABO, C. O. A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites. **Science**, Washington, v. 275, n. 5300, p. 657-661, 1997.

HARRISON, M. M.; JENKINS, B. V.; O'CONNOR-GILES, K. M.; WILDONGER, J. A CRISPR view of development. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 28, p. 1859-1872, 2014.

HOCKEMEYER, D.; SOLDNER, F.; BEARD, C.; GAO, Q.; MITALIPOVA, M.; DEKELVER, R. C.; KATIBAH, G. E.; AMORA, R.; BOYDSTON, E. A.; ZEITLER, B.; MENG, X.; MILLER, J. C.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D.; JAENISCH, R. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, p. 851-857, 2009.

HOFFMAN, B. A.; ERTL, H. C. J.; TERHORST, C.; HIGH, K. A.; HERZOG, R. W. Gene therapy at the frontiers of viral immunology. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 182, 2013.

HOLT, N.; WANG, J.; KIM, K.; FRIEDMAN, G.; WANG, X.; TAUPIN, V.; CROOKS, G. M.; KOHN, D. B.; GREGORY, P. D.; HOLMES, M. C.; CANNON, P. M. Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 8, p. 839-847, 2010.

JABALAMELI, H. R.; ZAHEDNASAB, H.; KARIMI-MOGHADDAM, A.; JABALAMELI, M. R. Zinc finger nuclease technology: advances and obstacles in modeling and treating genetics disorders. **Gene**, Amsterdam, v. 558, p. 1-5, 2015.

ISASI, R.; KLEIDERMAN, E.; KNOPPERS, B. M. Editing policy to fit the genome? **Science**, Washington, v. 351, n. 6271, p. 337-339, 2016.

JONES, H. D. Regulatory uncertainty over genome editing. *Nature Plants*, v. 1, n. 14011, p. 1-3, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nplants201411>>. Acesso em: 16 jul. 2016.

JOUNG, J. K.; VOYTAS, D. F.; CATHOMEN, T. Reply to genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 2, p. 91-92, 2010.

KANDAVELOU, K.; RAMALINGAM, S.; LONDON, V.; MANI, M.; WU, J.; ALEXEEV, V.; CIVIN, C. I.; CHANDRASEGARAN, S. Targeted manipulation of mammalian genomes using designed zinc finger nucleases. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, San Diego, v. 388, n. 1, p. 56-61, 2009.

KIM, E.; KIM, S.; KIM, D. H.; CHOI, B. S.; CHOI, I. Y.; KIM, J. S. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 22, p. 1327-1333, 2012.

KIM, H.; KIM, J. S. A guide to genome engineering with programmable nucleases. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 15, p. 321-334, 2014.

KIM, H. J.; LEE, H. J.; KIM, H.; CHO, S. W.; KIM, J. S. Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 1279-1288, 2009.

KIM, J. S.; LEE, H. J.; CARROLL, D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. **Nature Methods**, New York, v. 7, n. 2, p. 91, 2010.

KIM, S.; LEE, M. J.; KIM, H.; KANG, M.; KIM, J. S. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. **Nature Methods**, New York, v. 8, p. 7, 2011.

KIM, Y.; KWEON, J.; KIM, A.; CHON, J. K.; YOO, J. Y.; KIM, H. J.; KIM, S.; LEE, C.; JEONG, E.; CHUNG, E.; KIM, D.; LEE, M. S.; GO, E. M.; SONG, H. J.; KIM, H.; CHO, N.; BANG, D.; KIM, S.; KIM, J. S. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 251-258, 2013a.

KIM, Y.; KWEON, J.; KIM, J. S. TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures. **Nature Methods**, New York, v. 10, p. 185, 2013b.

KIM, Y. G.; CHA, J.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, 1996.

KLUG, A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 79, p. 213-231, 2010.

KRISHNA, S. S.; MAJUMDAR, I.; GRISHIN, N. V. Structural classification of zinc fingers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 532-550, 2003.

LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 11, n. 1, p. 39-46, 2001.

LAITY, J. H.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 295, p. 719-727, 2000.

LEE, H. J.; KIM, E.; KIM, J. S. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 1, p. 81-89, 2009.

LEE, M. S.; GIPPERT, G. P.; SOMAN, K. V.; CASE, D. A.; WRIGHT, P. E. Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. **Science**, Washington, v. 245, p. 635-637, 1989.

LUSCOMBE, N. M.; AUSTIN, S. E.; BERMAN, H. M.; THORNTON, J. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome Biology**, v. 1, n. 1, p. 1-37, 2000.

MAEDER, M. L.; THIBODEAU-BEGANNY, S.; OSIAK, A.; WRIGHT, D. A.; ANTHONY, R. M.; EICHTINGER, M.; JIANG, T.; FOLEY, J. E.; WINFREY, R. J.; TOWNSEND, J. A.; UNGER-WALLACE, E.; SANDER, J. D.; MÜLLER-LERCH, F.; FU, F.; PEARLBERG, J.; GÖBEL, C.; DASSIE, J. P.; PRUETT-MILLER, S. M.; PORTEUS, M. H.; SGROI, D. C.; IAFRATE, A. J.; DOBBS, D.; McCRAY, P. B.; CATHOMEN, T.; VOYTAS, D. F.; JOUNG, J. K. Rapid 'opensource' engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, p. 294-301, 2008.

MANI, M.; SMITH, J.; KANDAVELOU, K.; BERG, J. M.; CHANDRASEGARAN, S. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, San Diego, v. 334, p. 1191-1197, 2005.

MANSOORI, G. A. **Principles of nanotechnology**: molecular-based study of condensed matter in small systems. Singapore: World Scientific Publishing, 2005.

MILLER, J.; McLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **EMBO Journal**, Oxford, v. 4, p. 1609-1614, 1985.

MILLER, J. C.; TAN, S.; QIAO, G.; BARLOW, K. A.; WANG, J.; XIA, D. F.; MENG, X.; PASCHON, D. E.; LEUNG, E.; HINKLEY, S. J.; DULAY, G. P.; HUA, K. L.; ANKOUDINOVA, I.; COST, G. J.; URNOV,

F. D.; ZHANG, H. S.; HOLMES, M. C.; ZHANG, L.; GREGORY, P. D.; REBAR, E. J. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 2, p. 143-148, 2010.

MINGOZZI, F.; HIGH, K. A. Immune responses for AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. **Blood**, New York, v. 122, n. 1, p. 23-36, 2013.

MOEHLE, E. A.; ROCK, J. M.; LEE, Y. L.; JOUVENOT, Y.; DEKELVER, R. C.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D.; HOLMES, M. C. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 3055-3060, 2007.

MOELLER, L.; WANG, K. Engineering with precision: tools for the new generation of transgenic crops. **BioScience**, Washington, v. 58, n. 5, p. 391-401, 2005.

NAJAFABADI, H. S.; MNAIMNEH, S.; SCHMITGES, F. W.; GARTON, M.; LAM, K. N.; YANG, A.; ALBU, M.; WEIRAUCH, M. T.; RADOVANI, E.; KIM, P. M.; GREENBLATT, J.; FREY, B. J.; HUGHES, T. R. C2H2 zinc finger proteins greatly expand the human regulatory lexicon. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, p. 555-562, 2015.

NOLTE, R. T.; CONLIN, R. M.; HARRISON, S. C.; BROWN, R. S. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 6, p. 2938-2943, 1998.



OSAKABE, Y.; OSAKABE, K. Genome editing with engineered nucleases in plants. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 56, n. 3, p. 389-400, 2015.

PANDEY, K. K. Evidence for gene transfer by the use of sublethally irradiated pollen in *Zea mays* and theory of occurrence by chromosome repair through somatic recombination and gene conversion. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 191, n. 3, p. 358-365, 1983.

PATTANAYAK, V.; RAMIREZ, C. L.; JOUNG, J. K.; LIU, D. R. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by *in vitro* selection. **Nature Methods**, New York, v. 8, p. 765-770, 2011.

PAVLETICH, N. P.; PABO, C. O. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. **Science**, Washington, v. 252, p. 809-817, 1991.

PEREZ, E. E.; WANG, J.; MILLER, J. C.; JOUVENOT, Y.; KIM, K. A.; LIU, O.; WANG, N.; LEE, G.; BARTSEVICH, V. V.; LEE, Y. L.; GUSCHIN, D. Y.; RUPNIEWSKI, I.; WAITE, A. J.; CARPENITO, C.; CARROLL, R. G.; ORANGE, J. S.; URNOV, F. D.; REBAR, E. J.; ANDO, D.; GREGORY, P. D.; RILEY, J. L.; HOLMES, M. C.; JUNE, C. H. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 808-816, 2008.

PETOLINO, J. F. Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 51, n. 1, p. 1-8, 2015.

PETOLINO, J. F.; WORDEN, A.; CURLEE, K.; CONNELL, J.; MOYNAHAN, S. T. L.; LARSEN, C.; RUSSELL, S. Zinc finger nuclease-mediated transgene deletion. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 73, n. 6, p. 617-28, 2010.

PORTEUS, M. H. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. **Genome Biology**, v. 16, p. 286, 2015.

PORTEUS, M. H. Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 438-446, 2006.

PORTEUS, M. H.; CARROLL, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 967-973, 2005.

PORTEUS, M. H.; BALTIMORE, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. **Science**, Washington, v. 300, p. 763, 2003.

PRATT, S. Growers to see new HT canola in 2016. **The Western Producer**, 2014. Disponível em: <<http://www.producer.com/2014/03/growers-to-see-new-ht-canola-in-2016>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

PRUETT-MILLER, S. M.; READING, D. W.; PORTER, S. N.; PORTEUS, M. H. Attenuation of Zinc Finger Nuclease toxicity by small-molecule regulation of protein levels. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 2, p. e1000376, 2009.

PUCHTA, H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 409, p. 1-14, 2005.

PUCHTA, H. Double-strand break-induced recombination between ectopic homologous sequences in somatic plant cells. **Genetics**, Austin, v. 152, n. 3, p. 1173-1181, 1999.

REMY, S.; TESSON, L.; MENORET, S.; USAL, C.; SCHARENBERG, A. M.; ANEGON, I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. **Transgenic Research**, London, v. 19, p. 363-371, 2010.

RUSSELL, D. W.; HIRATA, R. K. Human gene targeting by viral vectors. **Nature Genetics**, New York, v. 18, p. 325-330, 1998.

SERA, T.; URANGA, C. Rational design of artificial zinc-finger proteins using a nondegenerate recognition code table. **Biochemistry**, Washington, v. 41, n. 22, p. 7074-7081, 2002.

SHUKLA, V. K.; DOYON, Y.; MILLER, J. C.; DEKELVER, R. C.; MOEHLE, E. A.; WORDEN, S. E.; MITCHELL, J. C.; ARNOLD, N. L.; GOPALAN, S.; MENG, X.; CHOI, V. M.; ROCK, J. M.; WU, Y. Y.; KATIBAH, G. E.; ZHIFANG, G.; McCASKILL, D.; SIMPSON, M. A.; BLAKESLEE, B.; GREENWALT, S. A.; BUTLER, H. J.; HINKLEY, S. J.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, London, v. 459, p. 437-441, 2009.

SIVALINGAM, J.; KENANOV, D.; HAN, H.; NIRMAL, A. J.; NG, W. H.; LEE, S. S.; MASILAMANI, J.; PHAN, T. T.; MAURER-STROH, S.; KON, O. L. Multidimensional genome-wide analyses show accurate FVIII integration by ZFN in primary human cells. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 3, p. 607-619, 2016.

SMITHIES, O.; GREGG, R. G.; BOGGS, S. S.; KORALEWSKI, M. A.; KUCHERLAPATI, R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\beta$ -globin locus by homologous recombination. **Nature**, London, v. 317, p. 230-34, 1985.

SONODA, E.; HOCHEGGER, H.; SABERI, A.; TANIGUCHI, Y.; TAKEDA, S. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 5, p. 1021-1029, 2006.

TEIMOURIAN, S.; ABDOLLAHZADEH, R. Technology developments in biological tools for targeted genome surgery. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 29-39, 2015.

TESTA, F.; MAGUIRE, A. M.; ROSSI, S.; PIERCE, E. A.; MELILLO, P.; MARSHALL, K.; BANFI, S.; SURACE, E. M.; SUN, J.; ACERRA, C.; WRIGHT, J. F.; WELLMAN, J.; HIGH, K. A.; AURICCHIO, A.; BENNETT, J.; SIMONELLI, F. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber Congenital Amaurosis Type 2. **Ophthalmology**, Oxford, v. 120, n. 6, p. 1283-1291, 2013.

WAH, D. A.; BITINAITE, J.; SCHILDKRAUT, I.; AGGARWAL, A. K. Structure of *FokI* has implications for DNA cleavage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, n. 18, p. 10564-10569, 1998.

WOLFE, S. A.; NEKLUDOVA, L.; PABO, C. O. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 29, p. 183-212, 2000.

WOLT, J. D.; WANG, K.; YANG, B. The regulatory status of genome-edited crops. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 510-518, 2016.

WUTTKE, D. S.; FOSTER, M. P.; CASE, D. A.; GOTTESFELD, J. M.; WRIGHT, P. E. Solution structure of the first three zinc fingers of TFIIIA bound to the cognate DNA sequence: determinants of affinity and sequence specificity. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 273, n. 1, p. 183-206, 1997.

URNOV, F. D.; REBAR, E. J.; HOLMES, M. C.; ZHANG, H. S.; GREGORY, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews Genetics**, Paris, v. 11, p. 636-646, 2010.

TOWNSEND, J. A.; WRIGHT, D. A.; WINFREY, R. J.; FU, F.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; VOYTAS, D. F. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature*, London, v. 459, p. 442-445, 2009.

VOYTAS, D. F.; GAO, C. Precision genome engineering and agriculture: opportunities and regulatory challenges. **PLoS Biology**, v. 12, n. 6, p. e1001877, 2014.

YU, X.; GABRIEL, A. Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, v. 163, n. 3, p. 843-856, 2003.

