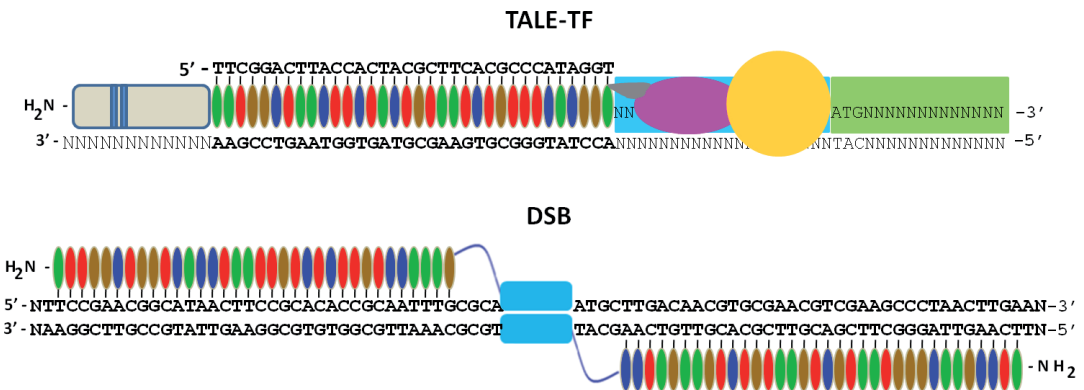


TALEN uma Ferramenta na Edição de Genomas



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

Documentos 180

TALEN uma Ferramenta na Edição de Genomas

Maria José Vilaça de Vasconcelos
José Edson Fontes Figueiredo

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2015

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 (2015)

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.

TALEN uma ferramenta na edição de genomas / Maria José Vilaça de Vasconcelos, José Edson Fontes Figueiredo. -- Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

22 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 180).

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

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2015

Autores

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Farmacêutica/Bioquímica, PhD e Pesquisadora
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG
mariajose.vasconcelos@embrapa.br

José Edson Fontes Figueiredo

Biólogo, PhD e Pesquisador Embrapa Milho e
Sorgo, Sete Lagoas, MG
jose.figueiredo@embrapa.br

Apresentação

Nucleases com efetores do tipo ativador transcricional (do inglês “transcription activator-like effector nucleases” –TALENs) é uma das técnicas incluídas nas chamadas Novas Tecnologias no Melhoramento de Plantas (do inglês “New Plant Breeding Techniques – NPBT”), as quais abrangem um conjunto de novas metodologias e abordagens que diferem da estratégia de melhoramento genético utilizando as técnicas de transgenia clássica que foram desenvolvidas na década de 1990. A tecnologia TALENs apoia-se em novos conhecimentos sobre os processos celulares de expressão e regulação gênica e tanto podem se apresentar como um refinamento das técnicas de modificação por transgenia clássica quanto podem, sob alguns aspectos, produzir eventos de transformação genética temporária ou permanente. Esse documento tem por objetivo mostrar de forma simplificada a tecnologia TALENs e algumas de suas aplicações.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	6
Tecnologia TALEN	8
Descrição Técnica	10
Aplicações da Tecnologia TALENs	11
Aplicação em Animais	11
Aplicação em Plantas	13
Aplicação na Identificação de Função Gênica	13
Aplicação na Edição de Genoma em Larga Escala	14
Avanços e Desafios para o Uso Futuro de TALENs	14
Conclusões	16
Referências	16

TALEN uma Ferramenta na Edição de Genomas

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Introdução

Os genes são as unidades funcionais que compõem o genoma. O DNA de uma célula de qualquer ser vivo contém toda informação genética necessária à sua sobrevivência. A informação genética é controlada pela maquinaria celular, e o surgimento da tecnologia do DNA recombinante foi o primeiro passo para a manipulação in vitro do material genético. Contudo, as técnicas usadas até recentemente não eram precisas para a integração das construções gênicas no local pretendido no genoma, e integrações fora do alvo podiam não funcionar ou serem letais.

A solução para esse problema foi conseguida com o uso dos sistemas naturais de reparo de quebras da dupla fita de DNA por meio de recombinação homóloga. Essa estratégia possibilitou que as mudanças desejadas fossem direcionadas, e o número de sucessos dos eventos “gene targeting” foi bastante aumentado. A recombinação homóloga é o processo envolvido em muitas fases do ciclo celular, e principalmente na

reprodução, é o mecanismo pelo qual a célula repara danos ou modificações ocorridas entre moléculas idênticas ou similares de DNA. Esse processo é essencial para todas as formas de vida, atuando tanto para assegurar a integridade do genoma como para aumentar a diversidade genética necessária para a evolução dos seres vivos. A manipulação do sistema de reparo da célula tem levado cientistas do mundo inteiro a buscarem entendimento desse sistema. Recentemente, modificações precisas no genoma com nucleases “engenheiradas” (PGE, do inglês: *Precision Genetic Engineering*) têm se mostrado uma potente ferramenta para estudos básicos de biologia e biotecnologia aplicada. As alterações pré-determinadas e precisas utilizando os princípios dessa nova tecnologia, como TALEN (do inglês: transcription-activator-like effector nuclease), têm se tornado uma prática crescente na edição de genomas, para efetuar quebras controladas e localizadas na dupla fita do DNA.

Modificações feitas utilizando-se ferramentas específicas, como TALEN, constituem uma engenharia direcionada dos domínios de ligação e clivagem do DNA. Em razão da simplicidade de reconhecimento do DNA e sua modulação, TALEN pode atuar como tesoura molecular na indução de quebra na dupla fita de DNA em locais específicos do genoma. Assim, essa técnica constitui uma ferramenta valiosa para modificações em alvos específicos no genoma, podendo ser utilizada para introduzir mutações, inserções, substituições ou rearranjos cromossômicos (ROUET et al., 1994). Neste documento, faremos uma descrição do sistema TALENs, resumindo os princípios da mediação de TALEN na edição de genomas, bem como evidenciaremos as estratégias atuais e potenciais usos em pesquisa e melhoramento de plantas.

Tecnologia TALEN

As tecnologias que abordam modificações no genoma com a inibição e inserção de genes em células-alvo representam uma nova expectativa para a compreensão e o desenvolvimento de diversas linhas de pesquisa na área da genética até então sem grandes resultados. Essa nova tecnologia de edição de genoma é importante e possui eficiência comprovada em razão da sua alta especificidade em relação às tecnologias até então utilizadas. A tecnologia de TALENs se mostra como um método fácil de executar que vem sendo empregado em laboratórios tanto acadêmicos como industriais.

Modificações específicas no genoma, mediadas por engenharia de nucleases, têm sido amplamente usadas para estudar funções de genes numa infinidade de organismos, incluindo leveduras, plantas, algas, protozoários, nematoides, peixes, insetos, mamíferos e células humanas (CAPECCHI, 2005; CARLSON et al., 2012; CHRISTIAN et al., 2013; DAHLEM et al., 2012; DE PATER et al., 2009; WRIGHT et al., 2005). Métodos confiáveis e eficientes para a obtenção de modificações sítio-específicos no DNA são metas básicas para pesquisa em melhoramento de plantas (PENNISI, 2010). Embora tenham sido demonstradas pela primeira vez no final dos anos 1980, essas modificações dirigidas em genomas de plantas estão longe de se tornar rotina, por causa da sua baixa eficiência (PASZKOWSKI et al., 1988), pois a etapa de introdução do DNA nas células é um passo crítico para que a modificação genética ocorra. Com o desenvolvimento da engenharia das nucleases, as quais quebram a dupla fita e, conseqüentemente, ativam o reparo do DNA para ligar as fitas cortadas, qualquer modificação pode ser realizada no genoma (ROUET et al., 1994).

TALE representa uma grande família de proteínas efetoras do tipo III de *Xanthomonas* spp., um grupo de bactérias gram-negativas patogênicas para plantas, com homólogos em *Ralstonia solanacearum* (BOGDANOVE et al., 2010; HEUER et al., 2007; LI et al., 2013). TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) são enzimas de restrição artificiais criadas pela fusão entre o domínio de ligação ao DNA de um efetor TAL e um domínio de clivagem de DNA. A região C-terminal de TALEs contém um sinal de localização nuclear (NLS) e um domínio de ativação (AD) que funciona como ativador da transcrição do DNA do hospedeiro (BOCH; BONAS, 2010; JANKELE; SVOBODA, 2014). A região central de TALEs constitui o domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês: DNA Biding Domain) sendo responsável pela precisão da ligação ao DNA alvo e pela especificidade do hospedeiro. Essa região é formada por 7-34 repetições modulares altamente conservadas exceto para dois resíduos de aminoácidos polimórficos na posição 12 e 13, chamados de RVD (repetições variáveis dis-resíduos), os quais estão fortemente correlacionados com o reconhecimento de nucleotídeos específicos no DNA (BOCH et al., 2009; MOSCOU; BOGDANOVE, 2009). Repetições com diferentes RVDS reconhecem diferentes pares de bases do DNA, e existe uma correspondência de “um-para-um” entre os RVDS no domínio de repetição e os nucleotídeos na sequência de DNA alvo, que constitui uma cifra ou código único (BOCH et al., 2009; MOSCOU; BOGDANOVE, 2009). A região amino-terminal é caracterizada pelo sinal de translocação (TD, do inglês: Tranlocation Domain) e quatro repetições crípticas que são necessárias para iniciar a ligação de TALEs ao DNA e pelo reconhecimento da base timina, presente na posição 0 (T⁰) do sítio de ligação de TALE na região 5' do DNA alvo.

A função patogênica de TALEs em plantas chamou a atenção dos cientistas, e sua forma simples de ligação no DNA e a facilidade de engenharia foram determinantes para a sua utilização como fatores artificiais de transcrição e nucleases. Resultados aplicados dessa técnica levaram várias décadas para serem descritos em diferentes linhas de pesquisa. Os avanços da edição genômica utilizando TALENs só agora estão sendo aplicados como rotina nos laboratórios.

Descrição Técnica

Durante a infecção, TALE altera a transcrição de genes das células vegetais hospedeiras através da via de secreção do tipo III (BOGDANOVE et al., 2010). Uma vez dentro da célula vegetal, as proteínas TALE entram no núcleo, se ligam por reconhecimento de sequências promotoras específicas, ativando a expressão de genes da planta. Tipicamente, a ativação de genes-alvo aumenta a susceptibilidade da planta à infecção pelo patógeno, mas em alguns casos ela dispara o sistema de defesa da planta (CHRISTIAN et al., 2010). A capacidade de prever a especificidade de ligação de TALENs nativas ou artificiais ao DNA sugere uma grande variedade de aplicações para estas proteínas visando a modificação de genomas. A técnica TALEN consiste na edição de genes individuais sem afetar outras partes do genoma (BOCH et al., 2009; MOSCOU; BOGDANOVE, 2009). Em particular, o domínio de reconhecimento de DNA pode ser associado com uma nuclease que reconhece uma sequência específica de DNA. Além disso, a modularidade aparente das repetições permite a rápida construção de nucleases TALENs com novas especificidades para clivagem de cadeia dupla de DNA em locais específicos no genoma.

Aplicações da Tecnologia TALENs

Modificações direcionadas no genoma mediadas por engenharia de nucleases têm se tornando uma poderosa ferramenta para a engenharia de genoma. Nos últimos anos tem havido uma explosão no número e na diversidade de aplicações desta tecnologia. Desde as primeiras publicações, os cientistas já a apontavam como uma técnica revolucionária por causa da sua simplicidade e sua aplicabilidade. As aplicações de TALENs têm se expandido nos últimos três anos. O seu uso já foi descrito, com sucesso, em uma infinidade de organismos, incluindo plantas e animais (CHRISTIAN et al., 2013; CARLSON et al., 2012). A seguir descreveremos alguns exemplos aplicados dessa tecnologia.

Aplicação em Animais

Os primeiros relatos de aplicação TALEN em células animais demonstraram eventos de ligações não homólogas (NHEJ, *non-homologous end joining*) e ligações homólogas (HR, *homologous recombination*) em dois locus de células humanas (MILLER et al., 2011). Naquele estudo, foi demonstrado que TALENs mediou eventos NHEJ no locus NTF3, em mais de 9% das células, e também gerou 21% de recombinação NHEJ e 16% de HR no locus CCR5 de células humanas (MILLER et al., 2011). Em progênies de *Caenorhabditis elegans* foi demonstrada a ocorrência de 3,5% de ligações não homólogas no locus ben-1 (WOOD et al., 2011). Esses resultados têm implicações importantes, pois no evento NHEJ o cromossomo clivado pode ser religado de modo impreciso, resultando em inserções ou deleções no sítio de clivagem que podem gerar a perda da função gênica. Na recombinação homóloga (HR), o DNA

próximo ao sítio de clivagem é reconstituído por um DNA molde com a mesma sequência de nucleotídeos (BOGDANOVE; VOYTAS, 2011).

Em estudo mais amplo de TALENs, em bovinos e suínos, foi demonstrado que 23 de 36 TALENs (64%) tiveram alta atividade em células primárias em 15 loci, resultando em nocautes mono (heterozigoto) e bialélico (homozigoto) para os sítios-alvo. Além disso, até 75% dos embriões injetados com TALEN apresentaram eventos nocauteados (CARLSON et al., 2012). Esses relatos demonstram claramente a eficiência da tecnologia TALENs para mediar a edição de genomas de células de animais. Na área de controle de insetos vetores de doenças existe grande expectativa com relação à aplicação de TALENs para nocaute de genes que controlam a fertilidade dos machos (BASSETT; LIU, 2014). A lista de genes candidatos é muito ampla. Em *Drosophila*, os genes que controlam a fertilidade são divididos em dois grupos: os genes que afetam a espermatogênese e genes que afetam a funcionalidade da maquinaria reprodutiva de machos e fêmeas. Genes ortólogos já foram descritos em várias espécies vetoras importantes e os cientistas nesse campo de pesquisa estão otimistas ao afirmarem que em breve será possível gerar insetos mutantes para genes de fertilidade (GABRIELI et al., 2014).

Sem dúvida, a aplicação mais importante de TALENs está relacionada com a saúde humana. Laboratórios em todo o mundo estão desenvolvendo abordagens utilizando essa tecnologia para tratamentos clínicos de distúrbios patológicos que variam desde o tratamento de hemoglobinopatias (CHANDRAKASAN; MALIK, 2014; SUN; ZHAO, 2013b), doenças

genéticas neurodegenerativas (OKANO et al., 2012; YANG; CHAN, 2011) e câncer (DUPUY et al., 2013; OSBORN et al., 2013).

Aplicação em Plantas

A tecnologia TALENs tem sido utilizada em plantas-modelos, tais como tabaco e *Arabidopsis* (CHRISTIAN et al., 2013), e em monocotiledôneas, como arroz, cevada, trigo e milho (LI et al., 2012; LIANG et al., 2014; WENDT et al., 2013; WANG et al., 2014). Edição de genoma mediada por TALEN em plantas foi relatada pela primeira vez em arroz, em que a região promotora do gene *Os11N3 (OsSWEET14)*, responsável pela ligação do efector TAL de *Xanthomonas*, foi interrompida através NHEJ, o que resultou em plantas resistentes a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (LI et al., 2012). Em milho, TALEN produziu mutações somáticas em quatro loci alvo por meio de NHEJ. Para o gene *ZmIPK*, responsável pela biossíntese de ácido fítico, aproximadamente 39,1% das plantas foram transformadas (LIANG et al., 2014). Esses estudos indicaram que a edição genômica mediada por TALENs pode modificar precisamente loci pré-determinados em plantas para obter variedades melhoradas resistentes aos estresses bióticos e abióticos, levando a uma agricultura mais sustentável.

Aplicação na Identificação de Função Gênica

A simplicidade e a velocidade de obtenção de resultados com a tecnologia TALENs possibilita a identificação do papel de milhares de genes cujas funções permanecem desconhecidas. Por exemplo, o gene nuclear *NDUFA9* (NADH desidrogenase1, subcomplexo 9 de 39 kDa), uma subunidade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, foi nocauteado e seu

produto, a proteína NDUFA9, foi identificado como um fator que estabiliza a junção entre a membrana mitocondrial e o braço periférico do sistema I (STROUD et al., 2013).

Aplicação na Edição de Genoma em Larga Escala

A estratégia mediada por TALENs tem muitas vantagens quando estudamos clusters de genes, microRNAs e grandes RNAs não codificantes que não respondem a mutações, ou quando o objetivo é produzir grandes efeitos de rearranjos genômicos. Estudos têm demonstrado que o tamanho da deleção pode variar de 795 pb para 5,5 Mb quando se utiliza uma estratégia de duplo TALEN (MA et al., 2012). Além de exclusões de sequências nucleotídicas, os eventos de inversão também foram relatados (SHAN et al., 2013). Deleções e rearranjos direcionados em longos segmentos cromossômicos são importantes para a edição genômica e apresentam ampla gama de aplicação em várias áreas da biologia, biotecnologia e terapia gênica (MA et al., 2012).

Avanços e Desafios para o Uso Futuro de TALENs

Além de TALENs, existem outras ferramentas disponíveis para edição genomas, como *zinc finger nucleases*, *homologous gene targeting*, *transposases*, *site-specific recombinases*, *meganucleases* e *integrating viral vectors*. Contudo, nos últimos três anos, verificou-se um enorme progresso da tecnologia TALENs para edição de genomas em uma infinidade de organismos e diferentes tipos celulares. TALENs têm a vantagem da alta especificidade e alta modulação, mas também existem limitações que continuam a ser abordadas para

melhorar a metodologia no futuro. O tamanho das construções TALENs pode limitar as suas aplicações nos casos em que o gene-alvo não pode ser alcançado eficientemente. Por exemplo, nas células eucarióticas, o DNA empacotado em cromatina, cromossomos e protegido por modificações epigenéticas limita a acessibilidade de TALENs.

A combinação de modificações epigenéticas e a tecnologia TALEN poderá expandir a gama de alvo para modificações do genoma, e deverá ser uma área potencial para futura exploração (SUN; ZHAO, 2013a).

Embora o desenvolvimento dessa tecnologia tenha ocorrido em ritmo acelerado ao longo dos últimos anos, muitas questões importantes precisam ser resolvidas para que essas proteínas sejam usadas rotineiramente em pesquisa ou de forma aplicada. Embora TALEN possa induzir mutações direcionadas por recombinação não homóloga, ela também pode levar a mutações indesejadas. Em alguns casos, a recombinação homóloga também pode alterar o alelo-alvo. Assim, será importante desenvolver métodos que representem um equilíbrio na direção da recombinação não homóloga e o reparo mediado por recombinação homóloga. Por exemplo, Barampuram e Zhang (2011) demonstraram que ZFN (do inglês: *Zinc Finger Nucleases*) que clivam apenas uma fita de DNA, em vez de ambas, pode mudar esse equilíbrio, embora a frequência de reparo mediada por recombinação não homóloga seja menor do que as induzidas pelas ZFNs a partir do qual as quebras são derivadas. O desenvolvimento de métodos que permitam definição das especificidades do genoma de TALENs será crucial para minimizar as mutagêneses fora do alvo

mediadas pela recombinação não homologa (CHRISTIAN et al., 2010).

Conclusões

O desenvolvimento de TALENs está crescendo em um ritmo acelerado. A estrutura de fácil utilização já mudou a percepção de engenharia de edição de DNA, de um nível de dificuldade muito grande, para o de facilidade, o que já acarretou o envolvimento de um maior número de pesquisadores interessados em sua utilização. Uma resposta positiva ao uso dessa tecnologia foi o volume de dados que têm sido publicados, demonstrando a edição genômica mediada por TALENs e a utilidade dessa tecnologia na imensa variedade de organismos. A tecnologia ainda apresenta alguns desafios, e há muitas incógnitas. Espera-se que, ao longo do tempo, as soluções sejam apresentadas e muitas descobertas sejam feitas. A história de TALEN parece estar posicionada diretamente na manipulação do genoma muito além das plataformas anteriores, e isto faz com que essa tecnologia cada vez mais seja aplicada para edição controlada de genomas de interesse.

Referências

BARAMPURAM, S.; ZHANG, Z. J. Recent advances in plant transformation. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 701, 1-35, 2011.

BASSETT, A. R.; LIU, J.-L. CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 1, p. 7-9, 2014.

BOCH, J.; BONAS, U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 48, p. 419-436, 2010.

BOCH, J.; SCHOLZE, H.; SCHORNACK, S.; LANDGRAF, A.; HAHN, S.; KAY, S.; LAHAYE, T.; NICKSTADT, A.; BONAS, U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science**, Washington, v. 326, p. 1509-1512, 2009.

BOGDANOVE, A. J.; VOYTAS, D. F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. **Science**, Washington, v. 333, p. 1843-1846, 2011.

BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 4, p. 394-401, 2010.

CAPECCHI, M. R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 6, p. 507-512, 2005.

CHRISTIAN, M.; QI, Y.; ZHANG, Y.; VOYTAS, D. F. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases. **G3**, Bethesda, v. 3, n. 10, p. 1697-1705, 2013.

CHRISTIAN, M.; CERMAK, T.; DOYLE, E. L.; SCHMIDT, C.; ZHANG, F.; HUMMEL, A.; BOGDANOVE, A. J.; VOYTAS, D. F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, Austin, v. 186, p. 757-761, 2010.

CARLSON, D. F.; TAN, W.; LILLICO, S. G.; STVERAKOVA, D.; PROUDFOOT, C.; CHRISTIAN, M.; VOYTAS, D. F.; LONG, C.

R.; WHITELAW, C. B.; FAHRENKRUG, S. C. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, 17382-17387, 2012.

CHANDRAKASAN, S.; MALIK, P. Gene therapy for hemoglobinopathies: the state of the field and the future. **Hematology Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 199-216, 2014.

DAHLEM, T. J.; HOSHIJIMA, K.; JURYNEC, M. J.; GUNTHER, D.; STARKER, C. G.; LOCKE, A. S.; WEIS, A. M.; VOYTAS, D. F.; GRUNWALD, D. J. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. **PLoS Genetics**, v. 8, p. 1-15, 2012.

DE PATER, E. de; CLIJSTERS, L.; MARQUES, S. R.; LIN, Y. F.; GARAVITO-AGUILAR, Z. V.; YELON, D.; BAKKERS, J. Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart. **Development**, Cambridge, v. 136, p. 1633-1641, 2009.

DUPUY, A.; VALTON, J.; LEDUC, S.; ARMIER, J.; GALETTO, R.; GOUBLE, A.; LEBUHOTEL, C.; STARY, A.; PÂQUES, F.; DUCHATEAU, P.; SARASIN, A.; DABOUSSI, F. Targeted gene therapy of xeroderma pigmentosum cells using meganuclease and TALEN™. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078678.

GABRIELI, P.; MAROIS, E.; CATTERUCCIA, F. Sexual sterilization of mosquitoes. In: BENEDICT, M. Q. (Ed.). **Transgenic insects:**

techniques and applications. Wallingford: CABI Publishing, 2014. p. 188-201. (CABI Biotechnology Series).

HEUER, H.; YIN, Y. N.; XUE, Q. Y.; SMALLA, K.; GUO, J. H. Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4379-4384, 2007.

JANKELE, R.; SVOBODA, P. TAL effectors: tools for DNA Targeting. Briefings in Functional Genomics, v. 13, n. 5, p. 409-419, 2014.

LI, T.; LIU, B.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. **Nature Biotechnology**, New York, v. 30, p. 390-392, 2012.

LI, L.; ATEF, A.; PIATEK, A.; ALI, Z.; PIATEK, M.; AOUIDA, M.; SHARAKUU, A.; MAHJOUR, A.; WANG, G.; KHAN, S.; FEDOROFF, N. V.; ZHU, J. K.; MAHFOUZ, M. M. Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. **Molecular Plant**, v. 6, p. 1318-1330, 2013.

LIANG, Z.; ZHANG, K.; CHEN, K.; GAO, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 41, n. 2, p. 63-68, 2014.

MA, S.; ZHANG, S.; WANG, F.; LIU, Y.; LIU, Y.; XU, H.; LIU, C.; LIN, Y.; ZHAO, P.; XIA, Q. Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 9, p. 1-7, 2012.

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, p. 143-148, 2011.

MOSCOU, M. J.; BOGDANOVA, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. **Science**, Washington, v. 326, n. 5959, p. 1501, 2009.

OKANO, H.; HIKISHIMA, K.; IRIKI, A.; SASAKI, E. The common marmoset as a novel animal model system for biomedical and neuroscience research applications. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 336-340, 2012.

OSBORN, M. J.; STARKER, C. G.; MCELROY, A. N.; WEBBER, B. R.; RIDDLE, M. J.; XIA, L.; DEFEO, A. P.; GABRIEL, R.; SCHMIDT, M.; VON KALLE, C.; CARLSON, D. F.; MAEDER, M. L.; JOUNG, J. K.; WAGNER, J. E.; VOYTAS, D. F.; BLAZAR, B. R.; TOLAR, J. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. **Molecular Therapy**, v. 21, n. 6, p. 1151-1159, 2013.

PASZKOWSKI, J.; BAUR, M.; BOGUICKI, A.; POTRYKUS, I. Gene targeting in plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 7, p. 4021-4026, 1988.

PENNISI, E. Armed and dangerous. **Science**, Washington, v. 327, p. 804-805, 2010.

ROUET, P.; SMIH, F.; JASIN, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in

mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 91, p. 6064-6068, 1994.

SHAN, Q.; WANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, K.; LIU, J.; VOYTAS, D. F.; ZHENG, X.; ZHANG, Y.; GAO, C. Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. **Molecular Plant**, v. 6, n. 4, p. 1365-1368, 2013.

STROUD, D. A.; FORMOSA, L. E.; WIJEYERATNE, X. W.; NGUYEN, T. N.; RYAN, M. T. Gene knockout using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) reveals that human NDUFA9 protein is essential for stabilizing the junction between membrane and matrix arms of complex I. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 288, p. 1685-1690, 2013.

SUN, N.; ZHAO, H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 110, p. 1811-1821, 2013a.

SUN, N.; ZHAO, H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 9, p. 1-6, 2013b.

SUN, N.; LIANG, J.; ABIL, Z.; ZHAO, H. Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease. **Molecular BioSystems**, v. 8, p. 1255-1263, 2012.

WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C.; QIU, J. L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, p. 947-951, 2014.

WENDT, T.; HOLM, P. B.; STARKER, C. G.; CHRISTIAN, M.; VOYTAS, D. F.; BRINCH-PEDERSEN, H.; HOLME, I. B. TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 83, p. 279-285, 2013.

WOOD, A. J.; LO, T. W.; ZEITLER, B.; PICKLE, C. S.; RALSTON, E. J.; LEE, A. H.; AMORA, R.; MILLER, J. C.; LEUNG, E.; MENG, X.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D.; MEYER, B. J. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. **Science**, Washington, v. 333, n. 6040, p. 307, 2011.

WRIGHT, D. A.; TOWNSEND, J. A.; WINFREY, R. J.; IRWIN, P. A.; RAJAGOPAL, J.; LONOSKY, P. M.; HALL, B. D.; JONDLE, M. D.; VOYTAS, D. F. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. **Plant Journal**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 693-705, 2005.

YANG, S. H.; CHAN, A. W. Transgenic animal models of Huntington's disease. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 7, p. 61-85, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, F.; LI, X.; BALLER, J. A.; QI, Y.; STARKER, C. G.; BOGDANOVA, A. J.; VOYTAS, D. F. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 161, p. 20-27, 2013.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE - 12471