

ISSN 1518-4277

Dezembro, 2015

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

Documentos 197

Tecnologia CRISPR-Cas para Edição Genômica

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.

Tecnologia CRISPR-Cas para edição genômica / Maria José Vilaça de Vasconcelos, José Edson Fontes Figueiredo. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2015.

37 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 197).

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 2015

Autores

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Farmacêutica/Bioquímica, PhD e Pesquisadora
Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45,
Cx. Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG,
mariajose.vasconcelos@embrapa.br

José Edson Fontes Figueiredo

Bioquímico, PhD e Pesquisador Embrapa Milho
e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, Cx. Postal 151, CEP
35701-970 Sete Lagoas, MG,
jose.edson@embrapa.br

Apresentação

Nos últimos anos, a tecnologia de edição genômica baseada no uso de nucleases “engenheiradas” ou quiméricas está revolucionando as abordagens de engenharia gênica e ampliando o repertório de animais e plantas geneticamente modificados, o que era impossível de ser obtido com as tecnologias tradicionais de manipulação gênica.

O sistema enzimático quimérico CRISPR-Cas é uma poderosa ferramenta que permite realizar modificações genéticas precisas e específicas nas cadeias de DNA ou gerar rearranjos genômicos.

Entre as aplicações de CRISPR/Cas, destacam-se as alterações da expressão gênica por meio do silenciamento, repressão, indução e ganho de função; modulação e alteração da atividade de proteínas; introdução de genes exógenos para induzir novas características em espécies cultivadas; identificação, alterações em módulos gênicos determinantes de características de interesse agrícola possibilitando acelerar a domesticação de plantas; e sua aplicação como ferramenta na biologia sintética.

As projeções para o futuro próximo indicam o uso de CRISPR/Cas para transferência de genes, tolerância aos estresses bióticos e abióticos, modulação da transcrição, melhoramento do sistema fotossintético de plantas, engenharia de receptores, produção de plantas haploides e a criação de novas espécies para cultivo.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino

Chefe-Geral

Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	7
Tecnologia CRISPR	13
Cas9 – Estrutura e Domínios	16
Aplicações do Sistema CRISPR-Cas9	18
Pespectivas e Conclusões	22
Referências	23

Tecnologia CRISPR-Cas para Edição Genômica

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Introdução

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante nos anos 1970 marcou o início de uma nova era da Biologia que possibilitou a manipulação de moléculas de DNA dos diferentes organismos. Com esse avanço foi possível aprofundar os estudos sobre a regulação e a função dos genes e introduzir características novas em várias espécies de plantas, animais e microrganismos por meio da engenharia de genes que codificavam novas proteínas ou enzimas. A produção da insulina humana recombinante em bactérias representou um marco dessa abordagem (LOPES et al., 2012).

Em plantas, a transferência de DNA por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (T-DNA) é o método mais usado para manipulação de genomas (KRYSAN et al., 1999; JEON et al., 2000). Atualmente, existe uma demanda crescente para a aquisição de mutações em múltiplos genes visando entender as funções dos membros de famílias gênicas ou para produzir alterações de função em genes de plantas (NEKRASOV et al.,

2013). Contudo, os métodos atuais utilizados para a geração de plantas contendo várias mutações gênicas são limitados e requerem tempo e muito esforço. Além disso, a estratégia de inserção gênica usando o T-DNA não pode ser aplicada a todos os genes de interesse. Portanto, o desenvolvimento de abordagens mais precisas e eficientes para edição de genomas é necessário para permitir os estudos funcionais e a manipulação de qualquer tipo de gene, em diferentes tipos celulares e grupos de organismos, incluindo também o desenvolvimento de plantas transgênicas. Nos últimos anos, a tecnologia de edição genômica baseada no uso de nucleases “engenheiradas” ou quiméricas, contendo domínios de ligação para sequências específicas de DNA e fundidas com um módulo de clivagem de DNA não específico, está revolucionando as abordagens de engenharia gênica e ampliando a possibilidade de obtenção de animais e plantas geneticamente modificados que eram impossíveis com as tecnologias tradicionais.

O uso de nucleases quiméricas permite realizar modificações genéticas precisas e específicas por meio da indução de quebras duplas (DSBs, do inglês, *double-strand breaks*) nas cadeias de DNA que estimulam os mecanismos celulares de reparo podendo gerar rearranjos genômicos. Esses mecanismos de reparo podem ser de três tipos: 1- recombinação não homóloga que liga extremidades diferentes do DNA [do inglês: *error-prone non-homologous end joining (NHEJ)*]; 2- ligação de extremidades mediada por micro-homologia (MMEJ, do inglês: *microhomology-mediated end joining*); 3- sistema de reparo direcionado por uma das fitas do DNA (do inglês: *homology-directed repair, HDR*) (GAJ et al., 2013; WATSON et al., 2004; WYMAN; KANAAR, 2006). O sistema de reparo NHEJ é particularmente interessante para estudos de função gênica,

pois introduz mutações durante o reparo aleatório da molécula de DNA que pode gerar perda de função ou silenciamento gênico (*knockout*).

Estratégias de edição de genoma baseadas no reconhecimento DNA-proteína têm sido utilizadas com base na atuação de nucleases em locais específicos na sequência da fita dupla de DNA, com destaque para as técnicas de *Zinc finger nucleases* (ZFN) (DURAI et al., 2005) e *TAL effector nucleases* (TALENs) (LI, T. et al., 2011). No entanto, essas técnicas apresentam como principais limitações a necessidade de desenhar, sintetizar e validar as proteínas “engenheiradas”, o que as tornam inviáveis para o uso rotineiro. A partir de 2012, um novo sistema de edição de genoma que utiliza uma pequena sequência de RNA para guiar a nuclease Cas9 até a sequência específica de DNA a ser clivada surgiu (DNA-alvo) como alternativa às ZFN e TALENs. Essa tecnologia é denominada CRISPR (do inglês - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ou CRISPR-Cas (do inglês - *CRISPR Associated System*). CRISPR-Cas tem se mostrado mais eficiente em estudos de edição de genes ou até mesmo de famílias gênicas ou genomas, quando comparado às técnicas ZFN e TALENs (KENNEDY; CULLEN, 2015; YOUNG et al., 2011).

O sistema CRISPR-Cas foi descoberto em bactérias e archaea, funcionando como um mecanismo de imunidade adaptativa contra bacteriófagos e elementos móveis, tais como plasmídeos (DEVEAU et al., 2010; HELER et al., 2015; HORVATH; BARRANGOU, 2010; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2008; TERNS; TERNS, 2011). Três tipos diferentes de sistema CRISPR-Cas (tipo I, tipo II e tipo III) e onze subtipos foram identificados em grande número de espécies microbianas. Essa classificação está

baseada no tipo de assinatura (diferentes genes Cas) e no modo como esses genes estão organizados no locus CRISPR (arranjo gênico) em cada um dos tipos e subtipos (BARRANGOU et al., 2007; BARRANGOU; MARRAFFINI, 2014; BROUNS et al., 2008; MAKAROVA et al., 2011; MARRAFFINI; SONTHEIMER, 2008). Os três tipos possuem os genes Cas1 e Cas2 organizados no locus CRISPR com seus respectivos genes CRISPR-associados (SELLE; BARRANGOU, 2015). Embora cada tipo represente mecanismos bioquímicos distintos de interferência, o funcionamento de todos envolve três etapas distintas: adaptação, expressão e interferência (Figura 1).

Ao entrarem na célula hospedeira, moléculas de DNA exógeno ativam o sistema de defesa bacteriano por meio da produção de enzimas (Cas1 e Cas2) que cortam o DNA estranho em pequenos fragmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos. Em seguida, um ou vários fragmentos (*spacers*) são inseridos no locus CRISPR do genoma bacteriano entre as sequências repetidas do *repeat-spacer array*. Nessa etapa, denominada de adaptação, as reações são mediadas pelas enzimas Cas1 e Cas2. As alterações introduzidas no locus CRISPR passam para as gerações futuras, originando uma memória adaptativa que possibilita à bactéria responder rapidamente a novas invasões por DNA exógeno de fagos ou plasmídeos.

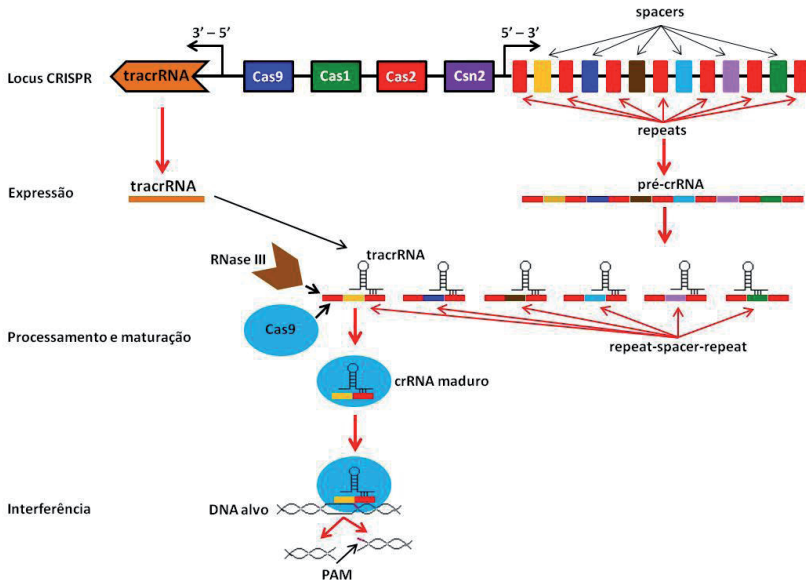


Figura 1. Modelo do Sistema de defesa tipo II de CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes*.

Na segunda etapa (expressão), moléculas de DNA invasoras reincidentes, ativam a transcrição do *lócus* CRISPR da célula bacteriana, especificamente o *repeat-spacer-repeat*, resultando na produção de uma molécula precursora longa de CRISPR RNAs (pré-crRNA), que após processamento direcionado por enzimas Cas específicas e RNase III origina várias moléculas pequenas (~40nt) de crRNAs maduras englobando um *spacer* e uma sequência repetitiva. Em *S. pyogenes*, uma sequência upstream ao *lócus* CRISPR transcreve uma molécula pequena de RNA, o *trans-activating* CRISPR RNA (*tracrRNA*) que é essencial para a maturação do pré-crRNA. O *tracrRNA* permanece ligado ao crRNA maduro, e juntos ativam e guiam a nuclease Cas9 para o DNA-alvo (BARRANGOU et al., 2007). O gene *tracrRNA* foi relatado em 2011 (DELTCHEVA et al., 2011),

e consiste de um pequeno RNA contendo 24 nucleotídeos complementares à região repetida no transcrito precursor do crRNA e uma estrutura secundária com formação de três estruturas em grampo na sua extremidade terminal 3' não complementar ao crRNA (KARVELIS et al., 2013). O tracrRNA é codificado por uma sequência em *trans* localizada 210 nucleotídeos *upstream*, na cadeia complementar dos genes associados à CRISPR01 e ao LRSA (*leader-repeat-spacer array*) (DELTCHEVA et al., 2011). Foi também demonstrado que tracrRNA contém uma sequência específica que confere imunidade contra genomas de vírus e plasmídeos. O funcionamento de CRISPR-Cas9 depende também da existência de uma sequência de duas a três bases imediatamente adjacente à sequência-alvo de Cas9, na região 5' do DNA alvo, denominada PAM (do inglês, *proto-spacer adjacent motive*) que é responsável pelo recrutamento e ativação de Cas9. Os nucleotídeos que definem PAM são específicos para cada categoria de sistema CRISPR (MOJICA et al., 2009). Em *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, a sequência PAM é 5'-NGG-3' (JINEK et al., 2012). A sequência PAM é absolutamente necessária para que a clivagem do DNA possa ocorrer, mas ela não faz parte da sequência crRNA-tracrRNA. PAM é um componente do DNA do vírus ou plasmídeo invasor e não faz parte do loco CRISPR bacteriano. O sítio de clivagem da nuclease Cas9 situa-se três nucleotídeos acima (*upstream*) da sequência PAM no DNA-alvo.

Na terceira etapa, denominada interferência, o DNA invasor contendo a sequência PAM é identificado e inativado pelo processo mediado por crRNA/Cas. No subtipo I-C do sistema CRISPR-Cas, a interferência envolve os crRNAs e um complexo multiproteico (Csd1, Csd2, Cas5d) denominado de CASCADE

(CASCATA em português) que pode reconhecer e formar pareamento de bases perfeito com o sítio-alvo do DNA exógeno. Em seguida, o complexo crRNA-Cas cliva o DNA exógeno, interferindo na replicação viral ou plasmidial e conferindo imunidade à célula bacteriana hospedeira.

Tecnologia CRISPR

O sistema CRISPR-Cas (PENNISI, 2013; SEGAL, 2013) é uma poderosa ferramenta para quebrar com precisão a fita dupla de DNA baseada na atividade da enzima endonuclease CAS9 (BARRANGOU et al., 2007; HORVATH; BARRANGOU, 2010; JINEK et al., 2012, 2014; NISHIMASU et al., 2014; STERNBERG et al., 2014). A enzima possui um lobo de reconhecimento (REC) do complexo crRNA:tracrRNA e o lobo NUC, que possui atividade de nuclease, e o sítio de reconhecimento da sequência PAM (JINEK et al., 2014; NISHIMASU et al., 2014). O lobo NUC por sua vez possui dois domínios distintos com atividade de nuclease: RuvC, que cliva a cadeia complementar, não alvo, do DNA e HNH, que cliva a cadeia-alvo onde o crRNA está ligado.

Para efeito de edição de genoma eucarioto, os cientistas sintetizam uma única molécula quimérica contendo o crRNA e tracrRNA, referida como sgRNA (do inglês, *single guide RNA*) ou gRNA (do inglês, *guide RNA*) (JINEK et al., 2012; LI, D. et al., 2013). Portanto, o sgRNA contém duas características básicas: a sequência de 20-25 nucleotídeos na posição 5'- que se liga à sequência específica do DNA-alvo (*spacer* ou *protospacer*), e uma sequência repetida complementar no crRNA e tracrRNA, e pareiam entre si formando uma dupla fita em grampo, composta de 42 nucleotídeos conservados que é necessária para o reconhecimento da enzima Cas9. Além disso, o sistema

para edição de genomas baseado em *S. pyogenes* possui outra sequência finalizadora da transcrição, em grampo, composta de 40 nucleotídeos (Figura 2). Essa construção é suficiente para gerar a associação entre CrRNA, tracrRNA e a enzima Cas9, formando um complexo que é direcionado para o sítio de DNA-alvo-específico e clivando a dupla fita de DNA (DSB).

O complexo crRNA:tracrRNA:Cas9 desliza pela fita do DNA invasor até encontrar a sequência PAM adequada que está localizada imediatamente abaixo (*downstream*) da sequência-alvo, na cadeia complementar (não alvo) do DNA genômico. Em seguida, Cas9 promove a abertura da dupla cadeia de DNA na posição imediatamente acima (*upstream*) de PAM e promove o pareamento do sgRNA com a cadeia de DNA complementar ao *spacer* do crRNA (ANDERS et al., 2014; STERNBERG et al., 2014). Os dois domínios com atividade de nuclease em Cas9 (HNH e RuvC) clivam o DNA de forma precisa no terceiro nucleotídeo adjacente à PAM, promovendo a dupla quebra (DSB) da molécula de DNA invasora (Figura 2). DSBs introduzidas por CRISPR/Cas9 podem ser corrigidas pelos mecanismos NHEJ ou HDR de reparo de DNA. Na maioria dos casos, NHEJ gera mutações aleatórias (indels) que podem ser deleções ou inserções de tamanhos variáveis ocasionando mudança na janela de leitura (*frameshift mutations*) e gerando o *knockout* gênico ou interrupção de elementos regulatórios em *cis* nos promotores ou em sequências *enhancers*.

HNH e RuvC-like, cortam as duas fitas do DNA na região que está pareada com os 20 nucleotídeos de crRNA e sempre no mesmo sítio localizado três nucleotídeos de distância abaixo (*downstream*) de PAM na sequência-alvo (JINEK et al., 2012, 2014; NISHIMASU et al., 2014; STERNBERG et al., 2014).

Cas9 – Estrutura e Domínios

A proteína multifuncional Cas9 foi identificada por análises de bioinformática (MAKAROVA et al., 2002) que revelou a existência de dois prováveis domínios de nuclease: HNH (BOLOTIN et al., 2005) e RuvC-like (MAKAROVA et al., 2006). Estudos genéticos indicaram que Cas9 da bactéria *Streptococcus thermophilus* é essencial para a defesa contra a invasão viral (BARRANGOU et al., 2007).

Estudos de cristalografia de Cas9 de *S. pyogenes* complexada com sgRNA e com seu DNA-alvo revelaram que a proteína contém dois lóbulos: um lóbulo de reconhecimento (REC) e outro de nuclease (NUC), que acomodam o heterodúplex sgRNA:DNA. O lóbulo REC pode ser dividido em três regiões, uma hélice referida como a hélice ponte (resíduos 60-93), o REC1 (resíduos 94-179 e 308-713), e o REC2 (resíduos 180-307). O lóbulo NUC é caracterizado por apresentar os dois domínios de nuclease mencionados anteriormente (RuvC e HNH), e também o sítio de reconhecimento da sequência PAM. O HNH é domínio único enquanto que o RuvC é dividido em três subdomínios ao longo da sequência linear da proteína. O subdomínio I se encontra próximo à região N-terminal na proteína Cas9. Os subdomínios II e III flanqueiam o domínio HNH que está localizado próximo ao meio da sequência linear. Trabalhos recentes têm demonstrado o mecanismo de clivagem

do DNA pelo sgRNA-Cas9 (JINEK et al., 2014; NISHIMASU et al., 2014).

Uma séria limitação para a utilização do sistema Cas9 está relacionada com a sua fidelidade relativamente baixa, que pode gerar alterações no genoma fora do alvo desejado. Isso se deve ao fato de que a Cas9 pode editar DNA que apresenta até cinco erros de pareamento de bases (*mismatches*) com o sgRNA (CRADICK et al., 2013; FU et al., 2013). Esse efeito de edição fora do alvo de interesse foi exaustivamente analisado por experimentos, *in vitro* e *in vivo* por Hsu et al. (2013). Mali et al. (2013) e Pattanayak et al. (2013), que demonstraram que a atividade e a fidelidade de Cas9/gRNA podem ser resumidas do seguinte modo: 1-na maioria dos casos, o complexo Cas9/sgRNA é incapaz de reconhecer sítios de DNA apresentando mais do que três *mismatches*; 2-Cas9/sgRNA não pode reconhecer e editar o DNA-alvo caso ocorra qualquer *mismatche* nos 10-12 nucleotídeos próximos de PAM; 3-quanto maior a concentração de Cas9/sgRNA maior será a probabilidade de ocorrência de erros na identificação dos alvos; 4-alguns sítios PAM 5'-NAG-3' podem ser identificados por Cas9/sgRNA em experimentos *in vitro* e com bactérias, mas Cas9 possui menor afinidade por sequências PAM 5'-NAG-3', do que por sequências PAM 5'-NGG-3'. Recentemente, novas versões de Cas9 intolerantes a qualquer tipo de *mismatche* foram "engenheiradas" pela simples substituição de 3-4 aminoácidos em Cas9 (KLEINSTIVER et al., 2015). Essa alta fidelidade resolve o problema de acesso de Cas9/gRNA aos sítios de DNA não alvo, portanto, não desejáveis, possibilitando a edição precisa de genomas de plantas (DING et al., 2016). Além disso, outros estudos com variantes de Cas9 exibindo maior afinidade ao DNA-alvo e redução de *off-targets* têm sido

publicados em ritmo acelerado, visando reduzir os riscos de obtenção de mutações não desejadas (KLEINSTIVER et al., 2016; FU et al., 2016; KIM et al., 2016; LEDFORD, 2016; REIS et al., 2014).

Aplicações do Sistema CRISPR-Cas9

O sistema CRISPR-Cas9 tem sido usado eficientemente na modificação do genoma em espécies onde as técnicas tradicionais de manipulação genética não têm tido sucesso, bem como em linhagens celulares humanas (CHO et al., 2013; CONG et al., 2013; DICARLO et al., 2013; FENG et al., 2013; FRIEDLAND et al., 2013; HSU et al., 2013, 2014; HWANG et al., 2013; JIANG et al., 2013; LI, W. et al., 2013; MALI et al., 2013; MAO et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013; SHAN et al., 2013; SHEN et al., 2013; XIE; YANG, 2013; YANG et al., 2013).

Entre as múltiplas aplicações do sistema CRISPR-Cas9, destacam-se as possibilidades de inserção ou deleção de bases no DNA de qualquer organismo alvo; inserção ou mesmo a troca de sequências específicas no genoma; produção de grandes deleções ou rearranjos genômicos (inversões, translocações); ativação e repressão gênica; modificação de histonas; metilação de DNA; produção de proteínas fluorescentes e localização de genes no genoma (HSU et al., 2014; LI, D. et al., 2013; LI, W. et al., 2013; WANG et al., 2013).

Na agricultura, o sistema CRISPR/Cas9 tem sido utilizado em várias espécies, tais como milho (LIANG et al., 2014; SHUKLA et al., 2009; SVITASHEV et al., 2015), cevada (LAWRENSEN et al., 2015), soja (JACOBS et al., 2015; LI, Z. et al., 2015), tomate

(BROOKS et al., 2014), arroz (MIAO et al., 2013), trigo (WANG et al., 2014), sorgo (JIANG et al., 2013), tabaco (LI, J. et al., 2013; NEKRASOV et al., 2013), petunia (ZHANG et al., 2016), entre outras, para melhorar características importantes como resistência às doenças e tolerância à seca (BELHAJ et al., 2013; BORTESI; FISCHER, 2015; FENG et al., 2014; JIAN-FENG et al., 2013; JIANG et al., 2013; KHATODIA et al., 2016; NEKRASOV et al., 2013; SHAN et al., 2013; SONG et al., 2016; WOO et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Wang et al. (2014) utilizaram com sucesso as tecnologias TALEN e CRISPR/Cas9 para nocautear os genes do locus MLO responsável pela síntese de proteínas que reprimem o sistema de defesa em algumas espécies de plantas. Os autores obtiveram plantas resistentes ao fungo *Blumeria graminis* sp. *tritici* (*Bgt*) que causa o míldio em trigo. Schwartz et al. (2016) adaptaram o sistema CRISPR/Cas9 para a levedura *Yarrowia lipolytica* objetivando melhorar a produção de hidrocarbonetos de cadeias longas utilizadas na produção de óleo, polímeros, adesivos e fragrâncias que são geralmente obtidas de fontes não renováveis, como o petróleo.

Assim, dentre as várias técnicas para manipulação de genomas, o sistema Cas9 apresenta o maior potencial para edição rápida e eficiente de genomas de plantas. De fato, o emprego de Cas9 revelou ser uma poderosa ferramenta para a caracterização e estudos de funções gênicas em plantas, bem como para o melhoramento genético de espécies cultivadas (VAZQUEZ-VILAR et al., 2016). Entre as aplicações de CRISPR/Cas9, destacam-se as alterações da expressão gênica (silenciamento, repressão, indução e ganho de função), alterações em aminoácidos para modular e alterar a atividade de proteínas, introdução de genes exógenos para gerar novas características em espécies cultivadas, identificação e análise de

módulos gênicos determinantes de características fenotípicas de interesse agrícola para acelerar a domesticação de plantas, e sua aplicação na biologia sintética (LIU et al., 2016). As projeções para o futuro próximo indicam o uso de Cas9 para transferência de genes, tolerância aos estresses bióticos e abióticos, modulação da transcrição, melhoramento do sistema fotossintético de plantas, engenharia de receptores, produção de plantas haploides e a criação de novas espécies para cultivo (DING et al., 2016).

Uma inovação na tecnologia CRISPR utiliza uma forma variante de Cas9 que retém a capacidade de ser recrutada pelo sgRNA e ainda ligar-se em sítios alvo específicos no DNA, mas cuja atividade catalítica foi excluída pela indução de mutações de ponto nas posições dos aminoácidos Ruv D10A e HNH H840A (SANDER; JOUNG, 2014). Essa forma denominada de dCas9 (do inglês, *dead* Cas9) está sendo empregada para regular a atividade gênica de várias maneiras diferentes (ativação, repressão ou silenciamento) (JINEK et al., 2012). Desse modo, dCas9 pode servir como uma plataforma geral para bloquear a transcrição (CRISPRi), ou para recrutar domínios efetores heterólogos envolvidos com a ativação, e, ainda, repressão da transcrição e domínios de demetilase em quaisquer *loci* no genoma visando regular a expressão de genes endógenos (JINEK et al., 2012; GASIUNAS et al., 2012). Essa possibilidade de abordagem genômica tem sido denominada “perturbação da expressão gênica por meio de dCas9”. Embora Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9) seja a endonuclease CRISPR mais utilizada para engenharia genômica, ela certamente não é a melhor endonuclease para ser utilizada em todas as aplicações conforme foi mencionado anteriormente. Por exemplo, a sequência PAM para SpCas9 (5'-NGG-3') é abundante no

genoma humano, mas a sequência NGG, na maioria das vezes, pode não estar posicionada corretamente no gene-alvo que se deseja alterar. Essa limitação é particularmente importante quando se pretende usar o sistema HDR, o qual requer que a sequência PAM esteja posicionada muito próxima da região a ser editada. Para tentar contornar esse problema, Kleinstiver et al. (2015) criaram uma variante de SpCas9 que não requer a sequência NGG próxima do DNA-alvo para que ocorra o reconhecimento do complexo crRNA-tracrRNA-Cas9. Outra inovação na tecnologia Cas9 refere-se à descoberta de ortólogos de Cas9 em *Streptococcus thermophilus* (St1Cas9) e *Staphylococcus aureus* (SaCas9), que se ligam a uma variedade de sequências PAM diferentes de 5'-NGG-3'. Em mamíferos, duas endonucleases das famílias Cpf1 e FnCas9, que também são guiadas por RNA, produzem resultados diferentes de Cas9 pois reconhecem sequências PAM 5'-TTN-3' e 5'-YG-3', respectivamente (RAN et al., 2015; HIRANO et al., 2016). A clivagem da dupla fita de DNA mediada por Cpf1 gera uma pequena extremidade coesiva na posição 3' do DNA-alvo, que possibilita a realização de transferência direcionada de genes de forma análoga à clonagem tradicional feita com enzimas de restrição. Além de ampliar a eficiência das edições genômicas, Cpf1 também expande o número de sítios no DNA que podem ser alvos de CRISPR tais como as regiões ricas em AT ou genomas de organismos ricos em AT que não possuem sítios PAM 5'-NGG-3'. Esse conjunto de inovações possibilita o uso quase irrestrito de Cas9 para editar praticamente qualquer sítio alvo nos diferentes genomas.

Perspectivas e Conclusões

Nossa compreensão de como os genomas de organismos superiores se desenvolveu foi dificultada pela falta de ferramentas adequadas para a engenharia precisa e eficiente do genoma. O sistema CRISPR-Cas9, usando pareamento de bases de um RNA guia (gRNA) para identificar sequências de DNA-alvo e a atividade catalítica de Cas9, é uma tecnologia versátil e que tem estimulado abordagens inovadoras na biologia.

Assim como o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante só foi possível por causa das descobertas das enzimas de restrição bacteriana que são fundamentais para a defesa de bactérias contra a infecção por fagos, a tecnologia CRISPR-Cas9, também baseada em outro sistema de defesa das células procarionotas contra DNA exógeno, é considerada atualmente a plataforma mais poderosa e versátil para a engenharia biológica.

Entretanto, a era da edição genômica levanta questões éticas que precisam ser discutidas por cientistas e pela sociedade em geral. Recentemente, cientistas chineses noticiaram a edição de embriões humanos, abrindo a possibilidade de cura para diversas doenças genéticas. Essa abordagem também cria perspectivas para o “design de bebês” objetivando a modificação de genes determinantes de características fenotípicas desejadas pelos pais, tais como cor dos olhos e pele, altura, inteligências, entre outras. Por outro lado, as possibilidades de aplicações de CRISPR como ferramenta para tratamento médico de doenças no futuro (CALLAWAY, 2016) também vem ganhando bastante atenção e destaque nos meios científicos e na mídia. Contudo, essa abordagem

também suscita questões éticas importantes que precisam ser debatidas em profundidade. Como podemos usar esta poderosa ferramenta, de forma a garantir o benefício máximo, minimizando os riscos para as espécies e o meio ambiente? Será imperativo que a sociedade de uma maneira geral entenda os fundamentos desta tecnologia suficientemente bem para facilitar a discussão pública racional. Do mesmo modo, agências regulatórias terão que considerar a melhor maneira de fomentar o uso responsável da tecnologia CRISPR-Cas9 sem inibir a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico.

Referências

ANDERS, C.; NIEWOEHNER, O.; DUERST, A.; JINEK, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, London, v. 513, p. 569-573, 2014.

BARRANGOU, R.; FREMAUX, C.; DEVEAU, H.; RICHARDS, M.; BOYAVAL, P.; MOINEAU, S.; ROMERO, D. A.; HORVATH, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. **Science**, Washington, v. 315, p. 1709-1712, 2007.

BARRANGOU, R.; MARRAFFINI, L. A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 234-44, 2014.

BELHAJ, K.; CHAPARRO-GARCIA, A.; KAMOUN, S.; NEKRASOV, V. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods**, v. 9, n. 39, p. 1-10, 2013.

BOLOTIN, A.; QUINQUIS, B.; SOROKIN, A.; EHRLICH, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.

Microbiology, Reading, v. 151, p. 2551-2561, 2005.

BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. **Biotechnology Advances**, New York, v. 33, n. 1, p. 41-52, 2015.

BROOKS, C.; NEKRASOV, V.; LIPPMAN, Z. B.; VAN ECK, J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 166, p. 1292-1297, 2014.

BROUNS, S. J.; JORE, M. M.; LUNDGREN, M.; WESTRA, E. R.; SLIJKHUIS, R. J.; SNIJDERS, A. P.; DICKMAN, M. J.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; VAN DER OOST, J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. **Science**, Washington, v. 321, p. 960-964, 2008.

CALLAWAY, E. UK scientists gain licence to edit genes in human embryos. **Nature News**, v. 530, p. 8, 2016.

CHO, S. W.; KIM, S.; KIM, J. M.; KIM, J. S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 230-232, 2013.

CONG, L.; RAN, F. A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L. A.; ZHANG,

F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, Washington, v. 339, p. 819-823, 2013.

CRADICK, T. J.; FINE, E. J.; ANTICO, C. J.; BAO, G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. 9584-9592, 2013.

DELTICHEVA, E.; CHYLINSKI, K.; SHARMA, C. M.; GONZALES, G.; CHAO, Y.; PIRZADA, Z. A.; ECKERT, M. R.; VOGEL, J.; CHARPENTIER, E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, London, v. 471, p. 602-607, 2011.

DEVEAU, H.; GARNEAU, J. E.; MOINEAU, S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 64, p. 475-493, 2010.

DICARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; MALI, P.; RIOS, X.; AACH, J.; CHURCH, G. M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 41, p. 4336-4343, 2013.

DING, Y.; LI, H.; CHEN, L. L.; XIE, K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. **Frontiers in Plant Science**, v. 24, n. 7, p. 703, 2016.

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.

FENG, Z.; ZHANG, B.; DING, W.; LIU, X.; YANG, D. L.; WEI, P.; CAO, F.; ZHU, S.; ZHANG, F.; MAO, Y.; ZHU, J. K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. **Cell Research**, v. 23, p. 1229-1232, 2013.

FENG, Z. Y.; MAO, Y. F.; XU, N. F.; ZHANG, B. T.; WEI, P. L.; WANG, Z.; ZHANG, Z. J.; YANG, D. L.; YANG, L.; ZENG, L.; LIU, X. D.; ZHU, J.-K. Multi-generation analysis reveals the inheritance, specificity and patterns of CRISPR/Cas induced gene modifications in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, p. 4632-4637, 2014.

FRIEDLAND, A. E.; TZUR, Y. B.; ESVELT, K. M.; COLAIACOVO, M. P.; CHURCH, G. M.; CALARCO, J. A. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. **Nature Methods**, New York, v. 10, p. 741-743, 2013.

FU, Y.; SANDER, J. D.; REYON, D.; CASCIO, V. M.; JOUNG, J. K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, p. 279-284, 2014.

FU, B. X. H.; ONGE, R. P.; FIRE, A. Z.; SMITH, J. D. Distinct patterns of Cas9 mismatch tolerance in vitro and in vivo. **Nucleic Acids Research**, Oxford, 2016.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, p. 397-405, 2013.

GASIUNAS, G.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 39, p. E2579-E2586, 2012.

HELER, R.; SAMAI, P.; MODELL, J. W.; WEINER, C.; GOLDBERG, G. W.; BIKARD, D.; MARRAFFINI, L. A. Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. **Nature**, London, v. 519, p. 199-202, 2015.

HIRANO, H.; GOOTENBERG, J. S.; HORII, T.; ABUDAYYEH, O. O.; KIMURA, M.; HSU, P. D.; NAKANE, T.; ISHITANI, R.; HATADA, I.; ZHANG, F.; NISHIMASU, H.; NUREKI, O. Structure and engineering of *Francisella novicida* Cas9. **Cell**, Cambridge, v. 164, p. 950-961, 2016.

HORVATH, P.; BARRANGOU, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. **Science**, Washington, v. 327, p. 167-170, 2010.

HSU, P. D.; SCOTT, D. A.; WEINSTEIN, J. A.; RAN, F. A.; KONERMANN, S.; AGARWALA, V.; LI, Y.; FINE, E. J.; WU, X.; SHALEM, O.; CRADICK, T. J.; MARRAFFINI, L. A.; BAO, G.; ZHANG, F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 827-832, 2013.

HSU, P. D.; LANDER, E. S.; ZHANG, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. **Cell**, Cambridge, v. 157, p. 1262-1278, 2014.

HWANG, W. Y.; FU, Y.; REYON, D.; MAEDER, M. L.; TSAI, S. Q.; SANDER, J. D.; PETERSON, R. T.; YEH, J. R.; JOUNG, J. K. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 227-229, 2013.

JACOBS, T. B.; LAFAYETTE, P. R.; SCHMITZ, R. J.; PARROTT, W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 16, 2015.

JIAN-FENG, L. I.; NORVILLE, J. E.; AACH, J.; McCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G. M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 688-691, 2013.

JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D. P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 1-12, 2013.

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, Washington, v. 337, p. 816-821, 2012.

JINEK, M.; JIANG, F.; TAYLOR, D. W.; STERNBERG, S. H.; KAYA, E.; MA, E.; ANDERS, C.; HAUER, M.; ZHOU, K.; LIN, S.; KAPLAN, M.; IAVARONE, A. T.; CHARPENTIER, E.; NOGALES, E.; DOUDNA, J. A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. **Science**, Washington, v. 343, n. 6176, 2014.

JEON, J. S.; LEE, S.; JUNG, K. H.; JUN, S. H.; JEONG, D. H.; LEE, J.; KIM, C.; JANG, S.; YANG, K.; NAM, J.; AN, K.; HAN, M. J.; SUNG, R. J.; CHOI, H. S.; YU, J. H.; CHOI, J. H.; CHO, S. Y.; CHA, S. S.; KIM, S. I.; AN, G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. **Plant Journal**, Oxford, v. 22, p. 561-570, 2000.

KARVELIS, T.; GASIUNAS, G.; MIKSYS, A.; BARRANGOU, R.; HORVATH, P.; SIKSNYS, V. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. **RNA Biology**, v. 10, n. 5, p. 841-851, 2013.

KENNEDY, E. M.; CULLEN, B. R. Bacterial CRISPR/Cas DNA endonucleases: a revolutionary technology that could dramatically impact viral research and treatment. **Virology**, New York, n. 479/480, p. 213-220, 2015.

KHATODIA, S.; BHATOTIA, K.; PASSRICHA, N.; KHURANA, S. M. P.; TUTEJA, N. The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. **Frontiers in Plant Science**, v. 19, p. 1-10, 2016.

KIM, D.; KIM, J.; HUR, J. K.; BEEN, K. W.; YOON, S. H.; KIM, J. S. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 34, p. 863-868, 2016.

KLEINSTIVER, B. P.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; TOPKAR, V. V.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z.; GONZALES, A. P.; LI, Z.; PETERSON, R. T.; YE, J. R.; ARYEE, M. J.; JOUNG, J. K. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. **Nature**, London, v. 523, n. 7561, p. 481-485, 2015.

KLEINSTIVER, B. P.; PATTANAYAK, V.; PREW, M. S.; TSAI, S. Q.; NGUYEN, N. T.; ZHENG, Z.; JOUNG, J. K. High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. **Nature**, London, v. 529, p. 490-495, 2016.

KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; SUSSMAN, M. R. T-DNA as an insertional mutagen in arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 2283-2290, 1999.

LAWRENSON, T.; SHORINOLA, O.; STACEY, N.; LI, C.; OSTERGAARD, L.; PATRON, N.; UAUY, C.; HARWOOD, W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. **Genome Biology**, v. 16, p. 258, 2015.

LEDFORD, H. Enzyme tweak boosts precision of CRISPR genome edits: engineered enzyme drives genome-editing errors below detection limit. **Nature**, London, 2016.

LI, D.; QIU, Z.; SHAO, Y.; CHEN, Y.; GUAN, Y.; LIU, M.; LI, Y.; GAO, N.; WANG, L.; LU, X.; ZHAO, Y.; LIU, M. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 681-683, 2013.

LI, J. F.; NORVILLE, J. E.; AACH, J.; McCORMACK, M.; ZHANG, D.; BUSH, J.; CHURCH, G. M.; SHEEN, J. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 688-691, 2013.

LI, W.; TENG, F.; LI, T.; ZHOU, Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using

CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 684-686, 2013.

LI, T.; HUANG, S.; ZHAO, X.; WRIGHT, D. A.; CARPENTER, S.; SPALDING, M. H.; WEEKS, D. P.; YANG, B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, p. 1-11, 2011.

LI, Z.; LIU, Z. B.; XING, A.; MOON, B. P.; KOELLHOFFER, J. P.; HUANG, L.; WARD, R. T.; CLIFTON, E.; FALCO, S. C.; CIGAN, A. M. Cas9-guide RNA directed genome editing in Soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 169, p. 960-970, 2015.

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.

LIU, D.; HU, R.; PALLA, K. J.; TUSKAN, G. A.; YANG, X. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 30, p. 70-77, 2016.

LOPES, D. A. S.; PESSOA, M. H. N.; SANTOS, R. S.; BARBOSA, M. S. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, p. 234-245, 2012.

MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K. M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J. E.; NORVILLE, J. E.; CHURCH, G. M. RNA-guided

human genome engineering via Cas9. **Science**, Washington, v. 339, p. 823-826, 2013.

MAO, Y.; ZHANG, H.; XU, N.; ZHANG, B.; GAO, F.; ZHU, J. K. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. **Molecular Plant**, v. 6, n. 6, p. 2008-2011, 2013.

MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; GRISHIN, N. V.; ROGOZIN, I. B.; KOONIN, E. V. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, p. 482-496, 2002.

MAKAROVA, K. S.; GRISHIN, N. V.; SHABALINA, S. A.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. **Biology Direct**, v. 1, p. 7, 2006.

MAKAROVA, K. S.; DANIEL, H. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 9, p. 467-477, 2011.

MARRAFFINI, L. A.; SONTHEIMER, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. **Science**, Washington, v. 322, p. 1843-1845, 2008.

MIAO, J.; GUO, D.; ZHANG, J.; HUANG, Q.; QIN, G.; ZHANG, X.; WAN, J.; GU, H.; QU, L. J. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. **Cell Research**, v. 23, p. 1233-1236, 2013.

MOJICA, F. J.; DÍEZ-VILLASEÑOR, C.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALMENDROS, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology**, Reading, v. 155, n. 3, p. 733-40, 2009.

NEKRASOV, V.; STASKAWICZ, B.; WEIGEL, D.; JONES, J. D. G.; KAMOUN, S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 691-693, 2013.

NISHIMASU, H.; RAN, F. A.; HSU, P. D.; KONERMANN, S.; SHEHATA, S. I.; DOHMAE, N.; ISHITANI, R.; ZHANG, F.; NUREKI, O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. **Cell**, Cambridge, v. 156, p. 935-949, 2014.

PATTANAYAK, V.; LIN, S.; GUILINGER, J. P.; MA, E.; DOUDNA, J. Á.; LIU, D. R. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 839-843, 2013.

PENNISI, E. The CRISPR craze. **Science**, Washington, v. 341, p. 833-836, 2013.

RAN, F. A.; CONG, L.; YAN, W. X.; SCOTT, D. A.; GOOTENBERG, J. S.; KRIZ, A. J.; ZETSCHKE, B.; SHALEM, O.; WU, X.; MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V.; SHARP, P. A.; ZHANG, F. Vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. **Nature**, London, v. 520, p. 186-191, 2015.

REIS, A.; BIO, B.; HORNBLOWER, B.; ROBB, B.; TZERTZINIS, G. CRISPR/Cas9 and targeted genome editing: a new era in molecular biology. **NEB Expressions**, n. 1, 2014. Disponível em:

<<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

SANDER, J. D.; JOUNG, J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, p. 347-355, 2014.

SCHWARTZ, C. M.; HUSSAIN, M. S.; BLENNER, M.; WHEELDON, I. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR–Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 4, p. 356-359, 2016.

SEGAL, D. J. Bacteria herald a new era of gene editing. **eLife**, v. 2, p. e00563, 2013.

SELLE, K.; BARRANGOU, R. Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 23, n. 4, p. 225-232, 2015.

SHAN, Q.; WANG, Y.; LI, J.; ZHANG, Y.; CHEN, K.; LIANG, Z.; ZHANG, K.; LIU, J.; XI, J. J.; QIU, J. L.; GAO, C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 686-688, 2013.

SHEN, B.; ZHANG, J.; WU, H.; WANG, J.; MA, K.; LI, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, P.; HUANG, X. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. **Cell Research**, v. 23, p. 720-723, 2013.

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. D.; CHOI, V. M.; ROCK, J. M.; WU, Y. Y.; KATIBAH, G. E.; GAO, Z. F.; McCASKILL, D.; SIMPSON, M. A.; BLAKESLEE, B.; GREENWALT, S. A.; BUTLER, H. J.; HINKLEY, S. J.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URONV, F. D. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, London, v. 459, p. 437-441, 2009.

SONG, G.; JIA, M.; CHEN, K.; KONG, X.; KHATTAK, B.; XIE, C.; LI, A.; MAO, L. CRISPR/Cas9: a powerful tool for crop genome editing. **The Crop Journal**, v. 4, n. 2, p. 75-82, 2016.

STERNBERG, S. H.; REDDING, S.; JINEK, M.; GREENE, E. C.; DOUDNA, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. **Nature**, London, v. 507, p. 62-67, 2014.

SVITASHEV, S.; YOUNG, J. K.; SCHWARTZ, C.; GAO, H.; FALCO, S. C.; CIGAN, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 169, p. 931-945, 2015.

TERNS, M. P.; TERNS, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 14, p. 321-327, 2011.

VAZQUEZ-VILAR, M.; BERNABÉ-ORTS, J. M.; FERNANDEZ-DEL-CARMEN, A.; ZIARSOLO, P.; BLANCA, J.; GRANELL, A.; ORZAEZ, D. A modular toolbox for gRNA-Cas9 genome engineering in plants based on the GoldenBraid standard. **Plant Methods**, v. 12, p. 10, 2016.

WANG, H.; YANG, H.; SHIVALILA, C. S.; DAWLATY, M. M.; CHENG, A. W.; ZHANG, F.; JAENISCH, R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. **Cell**, Cambridge, v. 153, p. 910-918, 2013.

WANG, Y.; CHENG, X.; SHAN, Q.; ZHANG, Y.; LIU, J.; GAO, C. 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.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. **Molecular biology of the gene**. 5th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2004.

WYMAN, C.; KANAAR, R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 40, p. 363-383, 2006. WOO, J. W.; KIM, J.; KWON, S. I.; CORVALÁN, C.; CHO, S. W.; KIM, H.; KIM, S. G.; KIM, S. T.; CHOE, S.; KIM, J. S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, p. 1162-1164, 2015.

XIE, K.; YANG, Y. RNA-guided genome editing in plants using A CRISPR-Cas system. **Molecular Plant**, v. 6, p. 1975-1983, 2013.

YANG, H.; WANG, H.; SHIVALILA, C. S.; CHENG, A. W.; SHI, L.; JAENISCH, R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/ Cas-mediated genome engineering. **Cell**, Cambridge, v. 154, p. 1370-1379, 2013.

YOUNG, J. J.; CHERONE, J. M.; DOYON, Y.; ANKOUDINOVA, I.; FARAJI, F. M.; LEE, A. H.; NGO, C.; GUSCHIN, D. Y.; PASCHON, D. E.; MILLER, J. C.; ZHANG, L.; REBAR, E. J.; GREGORY, P. D.; URNOV, F. D.; HARLAND, R. M.; ZEITLER, B. Efficient targeted gene disruption in the soma and germ line of the frog *Xenopus tropicalis* using engineered zinc-finger nucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 26, p. 7052-7057, 2011.

ZHANG, B.; YANG, X.; YANG, C.; LI, M.; GUO, Y. Exploiting the CRISPR/Cas9 system for targeted genome mutagenesis in petunia. **Scientific Reports**, v. 6, n. 20315, 2016.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; WEI, P.; ZHANG, B.; GOU, F.; FENG, Z.; MAO, Y.; YANG, L.; ZHANG, H.; XU, N.; ZHU, J. K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 12, p. 797-807, 2014.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE - 13213