

**ERA DA EDIÇÃO GÊNICA: APLICAÇÕES E FUTURO**

DOI: <https://doi.org/10.56041/9786599841804-2>

**PETRY, Bruna\***

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0001-9559-8559>.

**MOREIRA, Gabriel C. M.**

Universidade de Liège - GIGA/ULg, Liège, Bélgica.

<https://orcid.org/0000-0003-3139-1027>.

\*Autor correspondente: [bruna.petry@alumni.usp.br](mailto:bruna.petry@alumni.usp.br), Avenida Centenário, 303, Laboratório de Genômica Funcional, Piracicaba – SP, Brasil.

## RESUMO

Genes e mutações causadoras de doenças genéticas são uma preocupação para a qualidade de vida dos seres humanos, uma vez que, para a maioria delas, ainda não existe cura ou tratamento eficaz para amenizar os sintomas. Estudos utilizando tecnologias capazes de editar ou modificar a sequência dos genes vem sendo publicados. Recentemente, uma nova tecnologia capaz de cortar o DNA, inserir novas informações, ou até mesmo excluí-las, foi descoberta. Conhecida como CRISPR/Cas9, essa técnica possibilita a edição ou modificação do genoma de qualquer organismo: humano, animal, vegetal ou bactérias. Diversos estudos relacionados ao uso de CRISPR/Cas9 para a edição de genes e mutações em modelos animais já foram publicados. Para humanos, os estudos baseiam-se em identificação e edição de mutações causadoras de doenças genéticas. Essa revisão aborda alguns desses estudos, trazendo também exemplos da aplicação da técnica CRISPR/Cas9 no tratamento de doenças genéticas em seres humanos.

**Palavras-chave:** CRISPR/Cas9. Biologia molecular. Doenças genéticas. Biotecnologia.

### 1. A TÉCNICA CRISPR/CAS9

A técnica conhecida como Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR), que conferiu a Emmanuelle Charpentier (pesquisadora no instituto Max Planck, Berlin – Alemanha) e à Jennifer Doudna (pesquisadora na Universidade da Califórnia, Berkeley – Estados Unidos) o prêmio Nobel em Química, vem fomentando discussões no meio científico principalmente no que diz respeito às possíveis aplicações da técnica na engenharia genética para o tratamento de doenças de origem genética ou para a produção de alimentos impulsionada pela utilização de organismos geneticamente modificados.

Primeiramente descrito como uma alternativa à imunidade adaptativa em procariontes (organismos unicelulares com menor complexidade na organização do material genético), esse mecanismo baseia-se na incorporação de pequenos fragmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) invasor no genoma do hospedeiro intermediado pela enzima Cas, fazendo com que o organismo – anteriormente patogênico ao procarionto – seja reconhecido como semelhante (Burmistrz & Pirc, 2015). A descoberta desse processo de imunidade adaptativa desses micro-organismos, possibilitou que o modelo fosse adotado pela comunidade científica como uma técnica alternativa para edição gênica (Makarova et al., 2011).

A técnica consiste basicamente em utilizar como base um sistema bacteriano (vetor de *Streptococcus pyogenes*) modificado, o qual permite inserir uma sequência de 20 nucleotídeos, que irá conduzir ou guiar a enzima Cas9 até a região alvo do genoma, para então realizar o corte na dupla fita de DNA (Doudna & Charpentier, 2014).

Na natureza, o sistema CRISPR/Cas9 funciona no combate a bacteriófagos (vírus que infectam bactérias), inserindo partes do genoma desse vírus, na região conhecida como CRISPR do genoma bacteriano. Assim, durante a próxima invasão do bacteriófago, o *locus* CRISPR é transcrito em pequenos RNAs (chamados crRNAs) que se ligam a algumas proteínas específicas que reconhecem o DNA invasor como semelhante e o quebram em pequenos fragmentos, fazendo com que ele perca a virulência (Gasiunas et al., 2012).

No laboratório, a ideia é muito semelhante. Primeiro deve-se saber qual região de interesse do genoma será editada, podendo ser completamente excluída ou modificada. A partir daí, o próximo passo é desenhar uma sequência de RNA com aproximadamente 20 nucleotídeos o qual servirá como guia (gRNA) para o sistema CRISPR/Cas9 no genoma da célula alvo. Uma vez que um gRNA é projetado e expresso na célula de interesse, a enzima Cas9 liga-se a ele, formando um complexo que reconhecerá uma segunda região conhecida como Motivo Adjacente ao Protoespaçador (do inglês *proto-spacer adjacent motif*, PAM). Uma vez reconhecido, a sequência do gRNA ligar-se-á por complementariedade à sequência do DNA, e a enzima Cas9 promoverá a quebra da dupla fita do DNA nessa região (Doudna & Charpentier, 2014).

Quando ocorre o corte na dupla fita de DNA, existem dois mecanismos diferentes de reparo que as células poderão utilizar: a junção das extremidades não homólogas (do Inglês: *Non-homologous end joining*, NHEJ) ou o reparo dirigido por homologia (do Inglês: *Homology-directed repair*, HDR). O NHEJ é mais rápido e mais propenso a erros e mutações do tipo InDels (Inserções ou deleções) pois adiciona nucleotídeos aleatórios para realizar a correção da dupla fita; já o mecanismo de reparo HDR necessita de um molde para que a correção da dupla fita seja realizada; esse mecanismo é frequentemente utilizado para corrigir mutações (Doudna & Charpentier, 2014).

A edição ou nocaute de genes tem sido amplamente utilizada em diversos estudos com modelos animais, vegetais e celulares. Em camundongos, por exemplo, a técnica CRISPR/Cas9 foi utilizada para alterar mutações de uma base/nucleotídeo em células embrionárias, com 100% de eficiência na alteração de uma base de timina para citosina (T>C) (Liang et al., 2017). Além disso, o uso de CRISPR/Cas9 obteve

resultados de 90 a 100% de eficiência no silenciamento de genes completos em células de camundongos e macacos (Zuo et al., 2017).

## 2. CRISPR/CAS9: IMPORTANTE FERRAMENTA NO COMBATE A DOENÇAS EM SERES HUMANOS

Recentemente, foram publicadas pesquisas que abordam o uso do sistema CRISPR/Cas9 na remoção do vírus HIV de células de camundongos, obtendo bons resultados na eliminação do vírus das células hospedeiras (Yin et al., 2017) e demonstrando um passo significativo em direção a ensaios clínicos em seres humanos.

Diversas mutações relacionadas a diferentes tipos de câncer foram estudadas com o intuito de buscar maior conhecimento sobre a origem e os principais mecanismos moleculares ou vias metabólicas relacionadas na manifestação da doença. Esse conhecimento contribuirá não somente para o tratamento adequado ou personalizado bem como, para o avanço nas pesquisas sobre a cura do câncer.

Como exemplo, a tecnologia CRISPR/Cas9 foi usada para diminuir a quantidade de células de leucemia em xenotransplantes em camundongos, pela alteração no gene *ASXL1* (Additional sex combs like 1) (Valetta et al., 2015); o gene SHC SH2-binding (*SHCBP1*) foi editado usando a mesma tecnologia visando inibir a proliferação de células do câncer de mama (Feng et al., 2016). O gene CDK11 (Cyclin-dependent kinase 11) foi silenciado utilizando CRISPR/Cas9 para estudar osteosarcoma (Feng et al., 2015), e o gene da leucemia mieloide (MCL-1) foi deletado em células BL humanas para induzir a apoptose das mesmas células (Aurbey et al., 2015).

A tecnologia de CRISPR/Cas9 também já foi empregada para silenciar a proteína de superfície celular MUC18, responsável por causar alergias em vias aéreas e células nasais (Chu et al., 2016), e para reestabelecer o desenvolvimento normal de células T em células com deficiência de *JAK3*, após episódios de alergias (Malaviya et al., 2015).

A doença genética conhecida como distrofia muscular de Duchenne é uma desordem que acomete a musculatura em humanos. É caracterizada por uma deficiência no gene da distrofina (do Inglês: *dystrophin*, gene DMD) e já existem pesquisas utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9 para corrigir as mutações no gene DMD (Long et al., 2014). A correção de outras doenças genéticas por meio da edição gênica vem tornando-se importante fonte de esperança para pessoas que sofrem com essas desordens,

geralmente em modelos de camundongos ou em cultura celular *in vitro*. O gene PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) foi corrigido utilizando CRISPR/Cas9 em células de camundongo com arteriosclerose (Seidah et al., 2013). A mesma técnica foi utilizada para suprimir a expressão do gene mHTT (HTT gene) em células de camundongo para prevenir a doença de Huntington (Yang et al., 2017). Para o Alzheimer, importante doença genética que afeta neurônios e memória, CRISPR/Cas9 foi utilizado para corrigir uma mutação ancestral relacionada ao gene PSEN1 (Presenilin 1) e PSEN2 (Presenilin 2) (Pires et al., 2016; Rohn et al., 2018).

Além das doenças genéticas, a edição de genes relacionados a desordens metabólicas vem sendo realizadas na busca por tratamentos eficazes. As doenças metabólicas são causadas por defeitos nas proteínas transportadoras, que resultam em um anormal metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras. O gene *Pah* foi editado em camundongos usando CRISPR/Cas9 com o intuito de reverter a fenilcetonúria, doença autossômica recessiva que acomete o fígado (Villiger et al., 2018); outro estudo, também utilizando camundongos, corrigiu mutações no gene *Fah*, responsável pela tirosenemia hereditária (Shao et al., 2018). Outras doenças metabólicas importantes como beta-talassemia (Xie et al., 2014), fibrose cística (Schwank et al., 2013) e catarata (Yuan et al., 2017) tem sido estudadas utilizando a tecnologia de edição gênica para corrigir as suas mutações.

Infecções virais são importantes meios de alterações imunológicas e sistêmicas em humanos. Visando tornar-nos resistentes à vírus patogênicos, a tecnologia de CRISPR/Cas9 vem sendo empregada. Estudos modificando e até mesmo excluindo proteínas receptoras de vírus em macrófagos, é o foco principal para evitar a infecção em células humanas. Exemplo disso são estudos relacionados ao vírus HIV (Ebina et al., 2013), hepatite B (Dong et al., 2015), e infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) (Yoshida et al., 2019).

### 3. CRISPR EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Em animais de produção, a técnica CRISPR/Cas9 também apresentou resultados promissores. Em um estudo relacionado ao bem-estar e controle de zoonoses em bovinos, foram inseridas bases no genoma do animal para torná-lo resistente à tuberculose (Gao et al., 2017). Neste estudo, os autores obtiveram sucesso na formação de células fibroblásticas (responsáveis pela síntese de colágeno e elastina)

transgênicas ao inserir uma sequência de DNA responsável pela formação de proteínas macrofágicas (NRAMP1) responsável por aumentar a resistência à tuberculose em bovinos.

Em galinhas, estudos também demonstram a importância da técnica de edição de genes responsáveis por características de interesse econômico. Um exemplo disso foi um estudo onde a diferenciação de células-tronco embrionárias (ECSs) em espermatozoides (SSCs) foi investigada por nocaute do gene *Stra8* - um gene relacionado ao processo de divisão e multiplicação celular em células de mamíferos (Zhang et al., 2017). Como resultado, o nocaute do gene foi confirmado e a geração de SSCs foi bloqueada nestas células, indicando que o sistema CRISPR/Cas9 foi eficaz para realizar o nocaute do gene *Stra8* em células de frango, inibindo a diferenciação de ECSs em SSCs (Zhang et al., 2017). Além disso, o CRISPR/Cas9 foi usado para deletar um único aminoácido no gene *NHE1*, conferindo resistência das galinhas a um importante patógeno chamado subgrupo J do vírus da leucose aviária (Koslová et al., 2020).

#### 4. CRISPR NA AGRICULTURA E PRODUÇÃO VEGETAL

O método CRISPR/Cas9 de edição de genes foi adotado em mais de 20 espécies cultiváveis (Ricroch et al., 2017) para várias características, incluindo melhoria de rendimento, gerenciamento de estresse biótico e abiótico. A edição de genoma baseada em CRISPR/Cas9 tem sido utilizada para aumentar a resistência de culturas às doenças e para melhorar a tolerância a grandes estresses abióticos, como seca e salinidade.

Estudos demonstraram a aplicação da abordagem de edição de genoma em arroz relatando a utilização da técnica para melhorar os estresses bióticos e abióticos (Zhou et al., 2015). No trigo, a quantidade de ferro foi alterada utilizando o sistema CRISPR/Cas9 para edição (Connorton et al., 2017), bem como a resistência a alguns compostos químicos (Wang et al., 2014).

Para soja, a biossíntese de carotenoides foi estudada utilizando o sistema de edição de genomas (Du et al., 2016) e, além disso, melhorias no amadurecimento do tomate bem como sua tolerância e resistência a seca também foram estudados trazendo bons resultados para a produção vegetal (Ito et al., 2015; Wang et al., 2017). Devido às suas vantagens de simplicidade e alta eficiência, o sistema de edição de genoma baseado em CRISPR/Cas9 está tornando-se uma ferramenta poderosa na pesquisa em ciência de plantas, proporcionando melhorias para a agricultura e produção vegetal.

## 5. CRISPR/CAS9: RESULTADOS PROMISSORES

Os resultados positivos que os estudos com CRISPR/Cas9 vêm obtendo sugerem que esta técnica pode ser utilizada na edição de genes candidatos para regular diferentes características, sejam elas de interesse econômico para a produção de alimentos ou para o tratamento de doenças de origem genética ou ainda, para caracterizar a função de genes, uma vez que algumas características podem ser reguladas por um ou mais genes.

O uso de ferramentas de engenharia genética tem contribuído para entendermos quais genes estão envolvidos com os mecanismos moleculares que determinam os fenótipos ou características em diversos organismos. Mais especificamente a técnica CRISPR/Cas9, provou-se como uma metodologia poderosa para a edição de genes e combate às doenças, criação de organismos mais resistentes e eliminação de patógenos.

Aqui, podemos ver um breve resumo de como a tecnologia de edição gênica vem contribuindo para os avanços na área animal e medicina humana. Muitos estudos ainda precisam ser realizados para validar todos esses resultados até que seja possível aplicá-los. Entretanto, uma nova Era se inicia e junto dela a esperança para novos tratamentos capazes de conter e corrigir as doenças genéticas, trazendo benefícios e melhoria na qualidade de vida dos seres humanos.

### CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### REFERÊNCIAS

Aubrey, B.J., Kelly, G.L., Kueh, A.J., Brennan, M.S., O'Connor, L., Milla, L., Wilcox, S., Tai, L., Strasser, A., and Herold, M.J. (2015). An inducible lentiviral guide RNA platform enables the identification of tumor-essential genes and tumor-promoting mutations in vivo. *Cell Rep.* 10, 1422–1432.

Burmistrz, M.; Krzysztof, P. CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. *Polish Journal of Microbiology* 64: 193–202, 2015.

Chu, H.W., Rios, C., Huang, C., Wesołowska-Andersen, A., Burchard, E.G., O'Connor, B.P., Fingerlin, T.E., Nichols, D., Reynolds, S.D., and Seibold, M.A. (2015). CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. *Gene Ther.* 22, 822–829.

Connorton, J. M, Jones, E. R, Rodriguez-Ramiro, I., Fairweather-Tait, S, Uauy, C, and Balk, J. (2017). Wheat vacuolar iron transporter TaMT2 transports Fe and Mn and is effective for biofortification. *Plant Physiol.* 174, 2434–2444. doi: 10.1104/pp.17.00672

Doudna, J.A Charpentier, E The new frontiers of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* v. 346. (6213), 1258096 (2014).

Dong, C, Qu, L, Wang, H, Wei, L, Dong, Y., and Xiong, S. (2015). Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.* 118, 110–117.

Du, H, Zeng, X, Zhao, M, Cui, X, Wang, Q, Yang, H, et al. (2016). Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *J. Biotechnol.* 217, 90–97. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.005.

Ebina, H, Msawa, N, Kanemura, Y., and Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510.

Feng, Y., Sassi, S, Shen, J.K, Yang, X, Gao, Y., Osaka, E, Zhang, J, Yang, S, Yang, C, Mankin, H.J., et al. (2015). Targeting CDK1 in osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system. *J. Orthop. Res.* 33, 199–207.

Feng, W, Li, H.C, Xu, K, Chen, Y.F., Pan, L.Y., Mei, Y., Cai, H, Jiang, Y.M, Chen, T., and Feng, D.X (2016). SHCBP1 is over-expressed in breast cancer and is important in the proliferation and apoptosis of the human malignant breast cancer cell line. *Gene* 587, 91–97.

Gasiunas, G, Barrangou, R, Hrvath, P., Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012), pp. 2579–2586.

Gao, Y.; Wu, H; Wang, Y.; Liu, X; Chen, L; Li, Q; Cui, C; Liu, X; Zhang, J.; Zhang, Y. 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology* 18: 1–15.

Ito, Y., Nshizawa-Yokoi, A, Endo, M, Mkami, M, and Toki, S. (2015). CRISPR/Cas9 mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun.* 467, 76–82. doi: 10.1016/j.bbrc. 2015.09.117.

Koslová, A, Trefil, P., Mucksová, J., Reinišová, M, Plachý, J., Kalina, J., et al. (2020). Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHEI gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 117, 2108–2112. doi:10.1073/pnas.1913827117.

Liang, P., Sun, H, Sun, Y., Zhang, X, Xie, X, Zhang, J., et al. (2017). Effective gene editing by high-fidelity base editor 2 in mouse zygotes. *Protein Cell* 8, 601–611. doi:10.1007/s13238-017-0418-2.

Long, C, McAnally, J.R, Shelton, J.M, Mireault, A.A, Bassel-Duby, R, and Olson, E.N (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345, 1184–1188.

Makarova, K.S; Aravind, L; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V. 2011. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct* 6: 1–27.

Malaviya, R, Laskin, DL, and Malaviya, R (2010). Janus kinase-3 dependent inflammatory responses in allergic asthma. *Int. Immunopharmacol.* 10, 829–836.

Fires, C, Schmid, B, Petraus, C, Poon, A, Nmsanor, N, Nelsen, T.T., Wäldemar, G, Hjernind, LE, Nelsen, JE, Hyttel, P, and Freude, KK (2016). Generation of a gene-corrected isogenic control cell line from an Alzheimer's disease patient iPSC line carrying a A79V mutation in PSEN1. *Stem Cell Res. (Amst.)* 17, 285–288.

Ricroch, A, Clairand, P., and Harwood, W (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerg. Top. Life Sci.* 1, 169–182. Doi: 10.1042/etls20170085.

Rohn, T.T., Kim, N, Ishaq, NF, and Mack, JM (2018). The potential of CRISPR/ Cas9 gene editing as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism* 8, 8.

Seidah, NG (2013). Proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia and other pathologies. *Curr. Pharm Des.* 19, 3161–3172.

Schwank, G, Koo, B-K, Sasselli, V, Dekkers, J.F., Heo, I., Demircan, T., Sasaki, N, Bbymans, S, Cuppen, E, van der Ent, CK, et al. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13, 653–658.

Shao, Y, Wang, L, Guo, N, Wang, S, Yang, L, Li, Y, Wang, M, Yin, S, Han, H, Zeng, L, et al. (2018). Cas9-nickase-mediated genome editing corrects hereditary tyrosinemia in rats. *J. Biol. Chem* 293, 6883–6892.

Valletta, S, Dolatshad, H, Bartenstein, M, Yip, BH, Bello, E, Gordon, S, Yu, Y., Shaw, J, Roy, S, Scifo, L, et al. (2015). ASXL1 mutation correction by CRISPR/ Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* 6, 44061–44071.

Villiger, L, Grisch-Chan, HM, Lindsay, H, Ringnalda, F, Pogliano, CB, Allegri, G, Fingerhut, R, Häberle, J, Matos, J, Robinson, MD, et al. (2018). Treatment of a metabolic liver disease by in vivo genome base editing in adult mice. *Nat. Med.* 24, 1519–1525.

Wang, L, Chen, L, Li, R, Zhao, R, Yang, M, Sheng, J, et al. (2017). Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SLMAPK3 mutagenesis in tomato plants. *J. Agric. Food Chem* 65, 8674–8682. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02745.

Wang, Y., Cheng, X, Shan, Q, Zhang, Y., Liu, J, Gao, C, et al. (2014). Simultaneous editing of three homeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat. Biotechnol.* 32, 947–951. doi: 10.1038/nbt.2969.

Yin, C; Zhang, T.; Qu, X; Zhang, Y.; Putatunda, R; Xiao, X; Li, F.; Xiao, W; Zhao, H; Dai, S; Qin, X; Mo, X; Young, W; Khalili, K; Hu, W 2017. In vivo excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Molecular Therapy* 25: 1168-1186.

Zhang, Y.; Wang, Y.; Zuo, Q; Li, D; Zhang, W; Wang, F.; Ji, Y.; Lu, Z; Wang, M; Zhang, C; Li, B CRISPR/Cas9 mediated chicken Stra8 gene knockout and inhibition of male germs cell differentiation. *Plos One* v. 12, 1-12 (2017).

Zhou, J, Peng, Z, Long, J, Sossa, D, Liu, B, Eom, J. S, et al. (2015). Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J.* 82, 632–643. doi: 10.1111/tpj.12838.

Zuo, E; Cai, Y.; Li, K; Wang, B; Sun, Y.; Liu, Z; Hu, X; Wei, W; Huo, X; Shi, L; Tang, C; Liang, D; Wang, Y.; Ne, Y.; Zhang, C.; Yao, X; Wang, X; Zhou, C; Ying, W; Wang, Q; Chen, R; Shen, Q; Xu, G; Li, J; Sun, Q; Xiong, Z; Yang, H 2017. One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Research* 27: 1-13.

Yang, S, Chang, R, Yang, H, Zhao, T., Hong, Y., Kong, HE, Sun, X, Qin, Z, Jin, P., Li, S, and Li, X.J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J. Clin. Invest.* 127, 2719–2724.

Yuan, L, Yao, H, Xu, Y., Chen, M, Deng, J, Song, Y., Sui, T., Wang, Y., Huang, Y., Li, Z, and Lai, L (2017). CRISPR/Cas9-mediated mutation of  $\alpha$ A-crystallin gene induces congenital cataracts in rabbits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, B034– B041.

Xie, F, Ye, L, Chang, J.C, Beyer, AI., Wang, J., Muench, MO, and Kan, Y.W (2014). Seamless gene correction of  $\beta$ -thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* 24, 1526–1533.

Yoshihara, T., Saga, Y., Urabe, M, Uchibori, R, Matsubara, S, Fujiwara, H, and Mizukami, H (2019). CRISPR/Cas9-mediated cervical cancer treatment targeting human papillomavirus E6. *Oncol. Lett.* 17, 2197–2206.