



UNIVERSIDADE D COIMBRA



Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "*CRISPR-Cas: Converting a Bacterial Defence Mechanism into a State-of-the-art Genetic Manipulation Tool*" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, do Dr. João Gabriel dos Santos Pinto Pimentel e do Dr. Augusto Santos Costa apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

setembro de 2018

Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*CRISPR-Cas: Converting a Bacterial Defence Mechanism into a State-of-the-art Genetic Manipulation Tool*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva, e do Dr. Augusto Santos Costa e Dr. João Gabriel dos Santos Pinto Pimentel apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

setembro de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Eu, Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013137082, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “CRISPR-Cas: Converting a Bacterial Defence Mechanism into a State-of-the-art Genetic Manipulation Tool” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de setembro de 2018.

Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

(Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio incondicional, e a quem devo tudo aquilo que sou hoje.

À Ana e à Cláudia por serem as minhas referências bibliográficas e por estarem sempre lá.

A todos os antigos e atuais membros da Imperial TAFFUC, por todos os momentos e ensinamentos partilhados.

À Professora Doutora Gabriela Silva, por todo o apoio e disponibilidade.

A todas as amizades traçadas ao longo do meu percurso, que fizeram de mim uma pessoa mais completa.

A Coimbra, meu resguardo, da qual serei sempre filho pródigo.

Índice

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	9
1. Introdução	13
2. PHAGECON - Serviços e Consultoria Farmacêutica	14
3. Análise SWOT	15
3.1 Pontos fortes	16
3.2 Pontos fracos	18
3.3 Oportunidades	19
3.4 Ameaças	21
4. Conclusão	23
5. Bibliografia	24
RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA	25
Lista de Abreviaturas	27
1. Introdução	29
2. Análise SWOT	30
2.1 Pontos Fortes	31
2.2 Pontos Fracos	33
2.3 Oportunidades	35
2.4 Ameaças	36
3. Casos práticos	37
3.1 Caso prático 1 - Dor de estômago	37
3.2 Caso prático 2 - <i>Cross-selling</i>	38
4. Conclusão	39
CRISPR-Cas: Converting a Bacterial Defence Mechanism into a State-of-the-art Genetic Manipulation Tool	41
List of Abbreviations	43
Resumo	45
Abstract	47
1. Introduction	49
2. What is CRISPR?	49
3. Structure of CRISPR loci	50
4. Steps of CRISPR-Cas adaptive immunity	52
4.1. Adaptation	52
4.2. CRISPR RNA biogenesis	54
4.3. Interference	55
5. CRISPR-Cas systems as a gene-editing tool	58
Alexandre Loureiro	7

5.1.	Repurposing CRISPR for genetic engineering	58
6.	Advantages of CRISPR relative to other techniques	61
7.	Limitations of CRISPR systems	62
8.	Novel and enhanced CRISPR/Cas systems	64
8.1.	Cas12a (Cpf1)	64
8.2.	Cas13a (C2c2)	64
8.3.	Cas9n	65
8.4.	eSpCas9, SpCas9-HFI, and HypaCas9	66
9.	Delivering CRISPR systems into the cell	67
10.	Applications of CRISPR-Cas systems	68
10.1.	Oncology	68
10.2.	Genetic Diseases	69
10.3.	Viral Diseases	69
10.4.	Bacterial Infections	70
10.5.	Crop Industry	70
11.	Conclusion	71
12.	Bibliography	73

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE
INDÚSTRIA FARMACÊUTICA
PHAGECON - Serviços e consultoria farmacêutica**

Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

Relatório no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas orientado pelo Dr. Augusto Santos Costa e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

setembro de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Lista de Abreviaturas

AIM	Autorização de Introdução no Mercado
CTD	<i>Common Technical Document</i>
eCTD	<i>electronic Common Technical Document</i>
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
SWOT	<i>Strengths, weaknesses, opportunities, and threats</i>

I. Introdução

A área de ciências farmacêuticas é extremamente diversa e engloba muitas vertentes profissionais, tais como farmácia de oficina, indústria farmacêutica, análises clínicas, investigação laboratorial, entre outras. Com isto em mente, poderá ser difícil para um aluno de MICF sair para o mercado de trabalho tendo já experiência noutras áreas para lá de farmácia de oficina, visto que esta é a única área em que é obrigatório realizar um estágio curricular para terminar este curso.

No entanto, através de protocolos com entidades externas das mais variadas áreas, a FFUC fornece aos seus alunos a oportunidade de adquirirem experiência profissional noutros setores da área farmacêutica além de farmácia comunitária. Assim, os alunos da FFUC têm vantagem no mercado de trabalho sobre os seus homólogos de outras universidades pois são profissionais mais completos e com um maior leque de competências laborais.

De modo a usufruir desta oportunidade, candidatei-me a um estágio curricular de três meses no departamento de Assuntos Regulamentares da PHAGECON - Serviços e Consultoria Farmacêutica. A cadeira de Assuntos Regulamentares, no segundo semestre do quarto ano, suscitou-me curiosidade nesta área, daí o meu interesse em aplicar os conhecimentos teóricos adquiridos nessa cadeira a um ambiente profissional.

O seguinte relatório de estágio está disposto sob a forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, e Threats*), realçando as características mais relevantes do meu período de estágio na PHAGECON que contribuíram para aprofundar o meu conhecimento da área de Assuntos Regulamentares, assim como os objetivos atingidos e os que permanecem por atingir.

2. PHAGECON - Serviços e Consultoria Farmacêutica

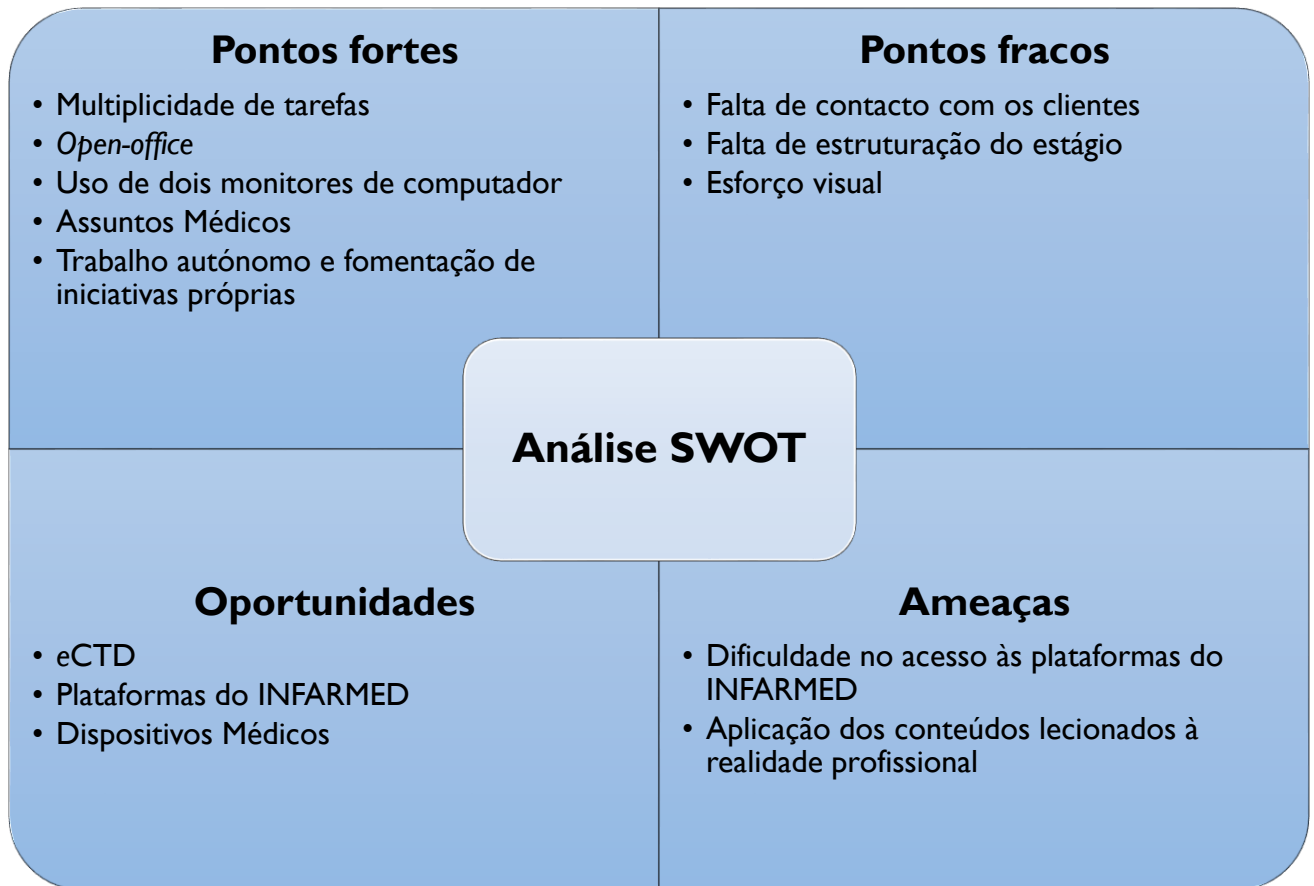
A PHAGECON foi criada em Janeiro de 2006, em Coimbra, com o intuito de responder à crescente procura de determinados serviços na Indústria Farmacêutica, fornecendo conhecimentos técnicos e científicos rigorosos para responder a essa procura. O rápido crescimento da empresa e aumento do número de colaboradores contribuiu para que em duas ocasiões consecutivas, 2014 e 2015, a PHAGECON fosse reconhecida como Empresa Gazela, título atribuído a empresas jovens e com crescimento acelerado e sustentado na região Centro.

Com o aumento do volume de negócios, a PHAGECON deslocaliza-se em 2016 para novas instalações em Lisboa, de modo a expandir internacionalmente a sua marca e aproximar-se das multinacionais farmacêuticas cujos escritórios se situam maioritariamente em Lisboa.

A PHAGECON faz parte do grupo FHC Farmacêutica, um grupo de empresas com as mais diversas atividades no setor farmacêutico e noutras áreas, como por exemplo os Laboratórios Basi, que se dedicam à produção de medicamentos; a Overpharma, associada à comercialização de produtos hospitalares; ou a Zeone, consultora da área informática. Inserida neste contexto, a PHAGECON executa tarefas no âmbito das empresas do grupo ligadas à área farmacêutica e também providencia serviços e atende às necessidades de clientes externos ao grupo FHC.

Além do departamento de Assuntos Regulamentares, a PHAGECON dispõe também de departamentos de Farmacovigilância, Qualidade e Assuntos Científicos, oferecendo um vasto leque de serviços a clientes da indústria farmacêutica em mais de 20 países.

3. Análise SWOT



3.1 Pontos fortes

3.1.1 Multiplicidade de tarefas

Um dos aspetos que mais me agradou ao longo do estágio na PHAGECON foi a diversidade de tarefas com que era confrontado no dia-a-dia. A área de Assuntos Regulamentares envolve os mais variados aspetos relacionados com a legislação de medicamentos, dispositivos médicos, produtos veterinários, suplementos, etc., acompanhando os trâmites regulamentares do produto desde o processo de registo, entrada no mercado e pós-comercialização.

Ao longo do meu estágio tive oportunidade de executar diferentes tarefas envolvendo diferentes tipos de produtos: elaboração e tradução do ou para o inglês de documentos técnicos como folhetos informativos, resumos de características do medicamento, e rotulagens; verificação desta documentação para auferir a conformidade com a legislação em vigor; preparação e submissão de pedidos de Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e de alterações aos dossiers de AIM. Esta variedade deu-me a conhecer as atividades que constituem o quotidiano da área de Assuntos Regulamentares no contexto de consultoria farmacêutica, confrontando-me com novos desafios que me tiravam da minha zona de conforto numa base diária. Desenvolvi assim a minha capacidade de me adaptar e interiorizar rapidamente essas novas tarefas, nunca descurando o rigor que a área de Assuntos Regulamentares exige.

3.1.2 Open-office

O departamento de Assuntos Regulamentares dentro da PHAGECON está organizado sob forma de *open-office*, no sentido em que não existe separação física completa entre as secretárias dos vários colaboradores. Esta disposição em *open-office* facilita o entrosamento entre os colegas de trabalho e o trabalho em equipa, contribuindo para um melhor ambiente profissional, e também para uma melhor comunicação de tarefas e particularidades das mesmas, fazendo com que o trabalho final seja mais homogéneo devido a uma constante partilha de informações. Penso que esta disposição do ambiente de trabalho facilitou a minha integração na equipa, assim como simplificou o esclarecimento de dúvidas e a explicação das tarefas que me eram passadas, de modo a que o meu trabalho se aproximasse o mais possível daquilo que me era pedido.

3.1.3 Uso de dois monitores de computador

Apercebi-me ao longo do estágio da importância que assume para as consultoras a celeridade com que as tarefas são executadas. As empresas externas que recorrem aos serviços de consultoras como a PHAGECON requerem resultados muitas vezes com curtos prazos de tempo, e dada a competitividade do setor, a produtividade dos colaboradores tem de ser elevada.

O uso de dois monitores de computador permite maximizar a produtividade e agilizar a execução das tarefas, pois garante uma melhor organização do ambiente de trabalho. Por exemplo, por várias vezes foi necessário comparar duas versões do mesmo documento para identificar erros ou incongruências, e ter cada versão num diferente monitor é mais fácil do que ter ambas abertas no mesmo monitor.

Outro uso que dei a esta disposição foi para averiguar a conformidade de um documento com o enquadramento regulamentar, tendo a legislação aberta num ecrã e o documento a avaliar no outro. Este método permitiu que realizasse o meu trabalho de forma mais rápida, contribuindo para uma melhor experiência de estágio tanto para mim como para a PHAGECON.

3.1.4 Assuntos Médicos

Além da vertente de Assuntos Regulamentares, tive também a possibilidade de aprender sobre a área de Assuntos Científicos. Esta área de Assuntos Científicos envolve principalmente assuntos científicos relacionados com o produto após este estar comercializado. No departamento de Assuntos Científicos da PHAGECON realizei pesquisas para encontrar informação científica e clínica de modo a responder a médicos ou doentes que manifestavam dúvidas sobre um determinado produto, relativamente a possíveis alergéneos que constam dos ingredientes do produto, ou informações relacionadas com o seu uso.

O facto de ter participado também em tarefas deste departamento contribuiu para que desenvolvesse as minhas capacidades de pesquisa científica e de leitura de artigos científicos, visto que para responder às dúvidas que chegavam à PHAGECON era necessário encontrar informação em artigos ou na documentação do produto.

3.1.5 Trabalho autónomo e fomentação de iniciativas próprias

Numa fase inicial do meu estágio, em que ainda não compreendia o que se fazia na prática na área de Assuntos Regulamentares, o ensino e apoio que me foi dado pela equipa do departamento foi indispensável para começar a dar os primeiros passos nessa área. Contudo, assim que mostrava que era capaz de realizar uma determinada tarefa de forma competente, era-me dada uma maior autonomia para a executar sem necessitar de ser guiado, e numa posterior validação do meu trabalho recebia sempre o *feedback* sobre aquilo que tinha feito, tanto positivo como negativo. Isto fez-me sentir que realmente o meu trabalho era tido em conta e que estava a dar o meu contributo à empresa.

Outro aspeto que contribuiu bastante para uma experiência positiva foi o facto de ser incitado a procurar novos modos de fazer o meu trabalho e produzir novas iniciativas. A título de exemplo, no decorrer do estágio fiz uma *checklist* para verificar os elementos que estavam presentes ou em falta em rotulagens, resumos de características de medicamentos, e folhetos informativos, com base na legislação corrente, de modo a facilitar a verificação deste tipo de documentos. Noutra situação, propuseram-me que fizesse uma apresentação aos colaboradores relativamente a um tema oportuno à minha escolha, pelo que elaborei uma apresentação sobre o novo Regulamento Geral de Proteção de Dados que iria entrar em vigor uns meses depois. O facto de ter sido estimulado a ter novas ideias fez de mim uma pessoa mais proativa e com maior iniciativa, qualidades que são fundamentais para singrar no mundo profissional.

3.2 Pontos fracos

3.2.1 Falta de contacto com os clientes

Um dos encargos que ocupava grande parte do tempo dos colaboradores da PHAGECON era a comunicação com os clientes, quer através de e-mails ou através de telefonemas. Era comum mais de metade de um dia de trabalho ser ocupado a responder a dúvidas dos clientes ou a delinear ao pormenor as tarefas que estes nos passavam. Tenho noção da grande responsabilidade que esta tarefa exige, e compreendo que um estagiário com pouco tempo de experiência profissional não seja a pessoa mais indicada para a desempenhar. No entanto, dada a importância que o diálogo com os clientes assume no dia-a-dia da PHAGECON, gostava de ter tido mais oportunidades de praticar este aspeto visto que é algo que durante o curso de MICF é impossível de por em prática.

3.2.2 Falta de estruturação do estágio

Senti ao longo do estágio que as tarefas que me eram apresentadas não seguiam um plano específico, sendo incumbido de as realizar à medida que apareciam e não porque estava previsto desempenhar determinada tarefa naquele dia. Contudo, penso que esta imprevisibilidade das tarefas está associada à natureza da empresa e não a uma despreocupação da PHAGECON para com os estagiários. Como empresa prestadora de serviços, o trabalho que chega à PHAGECON depende das necessidades correntes dos seus clientes, e portanto o trabalho que me era passado estava dependente também destas necessidades. Daí a estrutura maioritariamente errática que, presumo, se estenderá também às restantes consultoras farmacêuticas, mas que dificulta o seguimento lógico e a articulação das tarefas do estágio.

3.2.3 Esforço visual

O trabalho realizado na PHAGECON é altamente dependente do uso de computadores. O trabalho de secretária que é realizado obriga a passar oito horas por dia diante do ecrã, por vezes mais quando é necessário cumprir prazos apertados. Apesar de existirem intervalos, um da parte da manhã e outro da tarde, que permitem relaxar a visão, o facto é que senti que devido a este esforço visual chegava ao fim de um dia de trabalho com a visão cansada, e por vezes custava-me concentrar na tarefa em mãos por este motivo. Este esforço é inevitável pois os computadores são essenciais ao trabalho, e talvez eu seja mais suscetível a sentir cansaço visual, mas senti que necessitava de mais pausas para diminuir os efeitos e a desconcentração provocada pelo uso constante do computador.

3.3 Oportunidades

3.3.1 eCTD

A submissão do dossier contendo informação relativa ao medicamento que é essencial para o seu registo no formato *Common Technical Document* (CTD) é obrigatória desde 2003. De forma a acompanhar a evolução tecnológica, em 2015 tornou-se obrigatório que todos os CTDs fossem submetidos na forma de eCTD, substituindo assim definitivamente o tradicional dossier em papel (1).

Na PHAGECON tive a oportunidade de aprender como se utiliza o *software* para a compilação de dossiers de AIM, permitindo a organização dos ficheiros consoante as diferentes partes do dossier e descomplicando e agilizando o processo da submissão de

alterações e pedidos de AIM. O uso deste *software* permitiu-me ver como um CTD é realmente construído de raiz, algo que tinha bastante curiosidade em saber visto que este dossier constitui a base da área dos Assuntos Regulamentares, e falámos nas aulas daquilo que compõe um CTD mas ver na prática como é feito é completamente diferente.

3.3.2 Plataformas do INFARMED, I.P.

O estágio na PHAGECON deu-me a oportunidade de trabalhar com várias ferramentas disponibilizadas pelo INFARMED, I.P.. A submissão de pedidos de AIM, de pedidos de alterações ao dossier técnico, o registo de Dispositivos Médicos, e outras tarefas que realizei a longo do estágio são dependentes de plataformas do INFARMED, sendo que existem diferentes plataformas consoante o tipo de produto (Medicamento de Uso Humano, Dispositivo Médico, etc.) e do tipo de submissão que se pretende fazer (por exemplo, SMUH - AIM para submissão de AIM, SMUH - ALTER para submeter alterações). Além destas plataformas, o INFARMED disponibiliza também diversos serviços *online* quer para profissionais de saúde como para o público em geral. Com o uso repetido fui-me familiarizando com as diferentes plataformas com relevância para o trabalho realizado na PHAGECON, nomeadamente o SMUH-ALTER, SMUH - AIM e o SDIV, e conseqüentemente com a logística envolvida no processo de registo e gestão do ciclo de vida de um produto, conhecimento que certamente me será útil no futuro.

3.3.3 Dispositivos médicos

De acordo com o INFARMED, os dispositivos médicos “são destinados, pelo seu fabricante, a serem utilizados para fins comuns aos dos medicamentos, tais como prevenir, diagnosticar ou tratar uma doença humana. No entanto, os dispositivos médicos devem atingir os seus fins através de mecanismos que não se traduzem em ações farmacológicas, metabólicas ou imunológicas, por isto se distinguindo dos medicamentos” (2). No decorrer do curso de MICEF, o conhecimento que adquirimos sobre este tipo de produtos é muito superficial, visto que a única cadeira que aprofunda as características dos mesmos é uma cadeira opcional, e portanto não abrange todos os alunos do curso.

O estágio na PHAGECON deu-me oportunidade de colmatar esta lacuna, visto que após adquirir conhecimentos sobre a legislação e peculiaridades dos Dispositivos Médicos fui encarregue de preparar e submeter o registo de mais de 80 Dispositivos Médicos. Como esta área é também, paralelamente aos Medicamentos de Uso Humano, uma área com grande

mercado e altamente relevante para a saúde humana, foi bastante enriquecedor conhecer as *nuances* e compreender o contexto regulamentar dos Dispositivos Médicos.

3.4 Ameaças

3.4.1 Dificuldade no acesso às plataformas do INFARMED

Tal como referido previamente, as plataformas elaboradas pelo INFARMED são essenciais para submeter e concluir a maior parte das tarefas executadas na área de Assuntos Regulamentares. Todavia, um dos grandes problemas com que eu e os restantes colaboradores da PHAGECON éramos confrontados quase diariamente era a morosidade destas plataformas, que por vezes se encontravam mesmo inutilizáveis. Numa empresa em que a rapidez de execução é fundamental, o facto de por fatores alheios a esta não haver possibilidade de submeter um trabalho que já está terminado pode gerar atrasos que ultimamente debilitam a relação com os clientes. Este foi um dos aspetos mais complicados de lidar da minha experiência na PHAGECON, que será possível ultrapassar apenas através de alterações a nível dos servidores ou da arquitetura das plataformas *online* do INFARMED.

3.4.2 Aplicação dos conteúdos lecionados à realidade profissional

A cadeira de Assuntos Regulamentares que faz parte do conteúdo letivo do curso de MICF incide principalmente nos diferentes segmentos que compõem um CTD, os diferentes tipos de alterações existentes que podem ser feitas ao CTD, e os diferentes procedimentos de pedidos de AIM. Estes aspetos principalmente teóricos são importantes para compreender o relevo dos Assuntos Regulamentares na gestão do ciclo de vida de um medicamento, e suscitaram em mim interesse em enveredar por um estágio nesta área.

Nesta área é crucial estar familiarizado com a legislação em vigor, e se por um lado a cadeira de Assuntos Regulamentares cobre bastante bem este aspeto no que toca a Medicamentos de Uso Humano, precisei de procurar mais informação e tomar conhecimento da legislação respeitante a Produtos Veterinários, Dispositivos Médicos, Produtos Cosméticos, Suplementos, ou Biocidas. Compreendo que seja impossível aprofundar a regulamentação de todos estes tipos de produtos numa única cadeira, mas notei uma menor segurança da minha parte em situações que requeriam conhecimentos mais sólidos acerca destes tipos de produtos.

Os conhecimentos teóricos que adquiri na cadeira de Assuntos Regulamentares também não me prepararam para lidar com a burocracia e a documentação que é necessário produzir e preencher no âmbito dos Assuntos Regulamentares. Por ser uma empresa prestadora de serviços que não é detentora da propriedade intelectual dos produtos com que trabalha, o trabalho realizado na PHAGECON não lhe permite tomar decisões inerentes ao conteúdo do dossier, como por exemplo alterar um fabricante de um princípio ativo, sem ter o aval do cliente. Daí o trabalho que realizei ser mais englobado na preparação, verificação e submissão de documentos e não tanto nas decisões estratégicas envolvidas na elaboração e gestão de um dossier como aprendemos na faculdade.

4. Conclusão

Os três meses que constituíram o meu estágio na PHAGECON foram para mim um período de sair da minha zona de conforto e procurar em Lisboa um rumo profissional com o qual me identificasse. Na área de Assuntos Regulamentares encontrei o desafio de me adaptar a uma área que requer conhecimentos sólidos da legislação em vigor e onde é crucial uma boa atenção ao detalhe e flexibilidade, pois o mais ínfimo pormenor pode resultar em atrasos que comprometem a entrada de um produto no mercado.

Foi o meu primeiro contacto com a indústria farmacêutica, e permitiu-me compreender a dinâmica de uma empresa que trabalha com bastantes clientes, assim como as tarefas que são executadas na prática numa consultora farmacêutica e o rigor com que estas têm de ser concluídas mesmo em prazos de tempo mais apertados.

Terminada esta experiência, concluo que foi para mim muito proveitosa por me ter conseguido enquadrar bem no seio da empresa, adquirindo competências e vivências essenciais para a área em que estagiei e para o mundo da indústria farmacêutica em geral. Conheci pessoas que me ensinaram muito, tanto a nível profissional como pessoal, e me ajudaram a delinear melhor o rumo que pretendo seguir e pessoa que quero ser. A toda a equipa da PHAGECON, o meu bem-haja.

5. Bibliografia

- (1) EUROPEAN MEDICINES AGENCY – [Acedido a 02 de setembro de 2018] Disponível na internet:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2015/07/news_detail_002359.jsp&mid=WCOB01ac058004d5c1

- (2) INFARMED I.P. – [Acedido a 02 de setembro de 2018] Disponível na internet:
<http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/dispositivos-medicos>

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Farmácia Adriana

Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

Relatório no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas orientado pelo Dr. João Gabriel dos Santos Pinto Pimentel e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Lista de Abreviaturas

MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
SWOT	<i>Strengths, weaknesses, opportunities, and threats</i>

I. Introdução

Os estágios curriculares do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) constituem, para muitos estudantes, o primeiro contato com o mundo profissional. Esta experiência permite-nos consolidar e pôr em prática os conhecimentos teóricos que fomos adquirindo no decorrer dos cinco anos do curso.

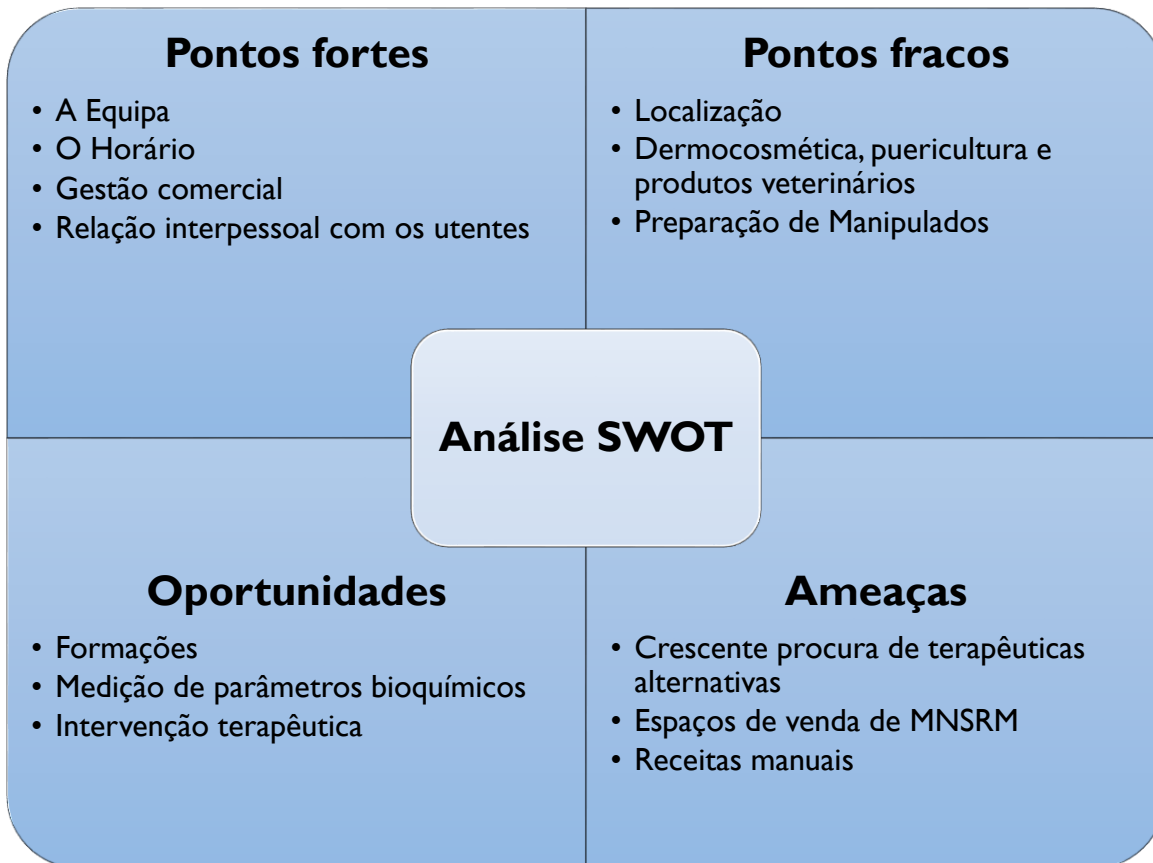
Estagiar e trabalhar numa farmácia comunitária é uma tarefa de grande responsabilidade, dado que o farmacêutico é, muitas vezes, o primeiro elo de ligação entre a população e o acesso desta a cuidados de saúde. Esta relação utente-farmacêutico tem de ser estabelecida com base na confiança do utente no profissional e sustentada pelos conhecimentos científicos do farmacêutico que lhe permitem satisfazer as necessidades dos utentes de uma forma segura e eficaz.

Ao proporcionar um estágio curricular em farmácia comunitária, o curso de MICF garante assim que os alunos adquirem o trato que é necessário na delicada relação utente-farmacêutico, e interiorizem o modo de funcionamento de uma farmácia, contribuindo para uma integração mais fácil no mundo profissional.

Deste modo, e de acordo com o plano de estudos de MICF, realizei entre o período de 2 de abril e 27 de julho o meu estágio curricular em farmácia comunitária, como parte da equipa da Farmácia Adriana. Nesta farmácia, situada em plena Praça da República, fui orientado pelo Diretor Técnico, Dr. João Pimentel, destacando também o apoio e ensino constante recebido por parte da restante equipa técnica.

Serve o presente relatório, estruturado sob forma de análise SWOT (*strengths, weaknesses, opportunities and threats*), como um resumo introspetivo dos aspetos que no decorrer do estágio na Farmácia Adriana mais contribuíram para o meu enriquecimento pessoal enquanto futuro profissional farmacêutico, e das eventuais lacunas de aprendizagem que permanecem por preencher.

2. Análise SWOT



2. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 A Equipa

A equipa da Farmácia Adriana é constituída por uma equipa de profissionais jovens e dinâmicos, contendo três farmacêuticos, o Dr. João Pimentel, Diretor-Técnico, a Dr.^a Joana Machado, e a Dr.^a Ângela Mota, e uma técnica de farmácia, a Sra. Adélia Guerra. A constante disponibilidade e jovialidade da equipa é um dos fatores que faz com que muitos dos utentes que se deslocam à farmácia apenas por conveniência se sintam tentados a regressar, devido à simpatia e ao interesse dos farmacêuticos nos problemas que os afligem. Estes fatores, aliados a um sólido conhecimento científico da equipa sobre a área do medicamento, contribuíram para um estágio enriquecedor em várias vertentes.

O facto de ter sido integrado rapidamente nas tarefas do quotidiano da farmácia permitiu-me familiarizar em pouco tempo com as rotinas e aproximar o meu trabalho daquele realizado pelos demais profissionais, graças à aprendizagem que me era dada. De salientar também que quando porventura cometia um lapso, a primeira intervenção era no sentido de me demonstrarem o que levou a esse lapso e o que poderia fazer para evitar que este voltasse a acontecer. Este tipo de ensino construtivo contribuiu para que me sentisse parte integrante da equipa, senti-me valorizado e nunca pressenti que era menosprezado ou que a minha opinião não era tida em conta por ser “apenas” um estagiário. Destaco portanto a equipa da Farmácia Adriana como um dos principais fatores que contribuiu para uma experiência francamente positiva.

2.1.2 O Horário

O facto da Farmácia Adriana possuir um horário alargado, com encerramento às 20:30 nos dias úteis e estando aberta aos sábados, permitiu-me confrontar uma maior diversidade de situações com as quais de outro modo não teria contacto. Verificava-se ao longo do dia uma flutuação na população que ia à farmácia: de manhã uma população maioritariamente constituída por idosos, à tarde principalmente estudantes e turistas, e ao final do dia uma população mais diversificada. Era normalmente nestas horas mais tardias, em virtude do fim do dia de trabalho e do horário alargado da farmácia, que havia uma maior variedade de casos que punham à prova os meus conhecimentos e os ensinamentos que me foram transmitidos na

Farmácia Adriana e ao longo do curso de MICE, e daí realçar o horário alargado como aspeto positivo do estágio.

2.1.3 Gestão comercial

A reduzida dimensão da Farmácia Adriana significa que esta dispõe de um espaço limitado para a exposição de produtos de venda livre na área de atendimento. Este aspeto exige portanto uma gestão minuciosa e criteriosa dos *stocks* mínimos e máximos de cada produto, de modo a atender às necessidades dos utentes, minimizando a perda de vendas por falta de produtos assim como a perda de produtos por rutura de *stock*. Foi-me inculcida também pela equipa da Farmácia Adriana a importância de prever os desejos da população em função da época do ano, de modo a que o reforço de *stocks* seja adequado à época. Por exemplo no Verão, época balnear, é de prever que haja uma maior procura de protetores solares; na Primavera, época de alergias, a procura de anti-histamínicos aumenta. Logo, no momento de realizar a encomenda para os fornecedores, há que ter em conta que produtos vão ter mais procura de modo a encomendar mais unidades e usufruir de descontos maiores. Este princípio aplica-se também à gestão de montras e de expositores de produtos, que deve ser feita de forma sazonal para suscitar o interesse do utente nos produtos mais relevantes para a época em questão.

Ainda na gestão comercial, apercebi-me também do relevo que assume a escolha dos fornecedores na rentabilidade da farmácia. A escolha dos fornecedores e o estabelecimento de contratos com os mesmos que garantam condições e descontos mais vantajosos exige uma procura constante das melhores oportunidades, adequando-as à situação da farmácia. Ao longo do estágio fui aprendendo a ter especial cuidado na verificação dos descontos oferecidos por vários fornecedores no momento de fazer encomendas. Isto proporcionou-me alguma destreza e proximidade com a plataforma *Sifarma2000*[®], assim como com as plataformas dos fornecedores, utilizando as funcionalidades destes programas para auferir a situação promocional dos produtos. Estes princípios de maximização da rentabilidade que fui pondo em prática ao longo do estágio permitiram-me complementar a aprendizagem teórica obtida na unidade de Organização e Gestão Farmacêutica do curso de MICE, reforçando as minhas noções de gestão dentro do contexto de uma farmácia comunitária.

2.1.4 Relação interpessoal com os utentes

Devido à variabilidade de utentes da Farmácia Adriana, não existia uma rotina típica de atendimento, havendo sempre necessidade de ajustar a conduta de acordo com o utente diante de nós de forma a providenciar um atendimento personalizado mas sempre com base no profissionalismo. Este facto ajudou-me a aplicar princípios de atendimento ao utente que aprendemos na cadeira de Farmácia Clínica, demonstrando sempre importância às queixas dos utentes e tentando aperceber-me de situações subjacentes que pudessem estar a desencadear essas queixas ou que sejam também relevantes para a saúde do utente. Permitiu-me também trabalhar a minha capacidade de comunicação e a prática de outras línguas, nomeadamente inglês e espanhol, devido à afluência de turistas e estudantes estrangeiros; e também a capacidade de persuasão, visto que em raras ocasiões alguns utentes tinham ideias pré-concebidas sobre um tratamento ou medicamento que não correspondiam à verdade, e cabe ao farmacêutico saber refutar de forma fundamentada essas ideias de modo a que o cliente aceite de bom-grado a informação que lhe é transmitida. Esta capacidade de persuasão foi também posta à prova através da prática de técnicas de *cross-selling* e *up-selling*, onde o objetivo é acrescentar valor à venda tanto para a farmácia como para o utente.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Localização

À primeira vista, a localização da Farmácia Adriana poderá parecer uma vantagem, numa zona central da cidade repleta de transportes públicos e alojamento local como o é a Praça da República. No entanto, o contexto dos estabelecimentos em redor da praça é principalmente da área da restauração/bares, atraindo população mais jovem que não constitui a principal demográfica de uma farmácia comunitária. A falta de habitação fixa, estabelecimentos comerciais ou mercados nas redondezas faz com que área seja para grande parte das pessoas apenas uma zona de passagem e não de permanência, diminuindo o fluxo de utentes mais idosos, que têm na zona da Baixa de Coimbra muito mais alternativas de comércio local e serviços do que na Praça da República. Outro aspeto negativo é a falta de locais de estacionamento próximos da farmácia, que dificulta o acesso de clientes com veículo próprio, que poderiam aproveitar a passagem para comprar algo que necessitam mas não têm condições de estacionamento. A presença de uma outra farmácia a cerca de 50 metros e o recente encerramento do posto de correios da Praça da República são outras agravantes que

contribuem para que no geral o número de atendimentos diários seja reduzido, diminuindo assim a minha exposição a uma maior diversidade de casos.

2.2.2 Dermocosmética, puericultura e produtos veterinários

O baixo número de atendimentos diários e a reduzida dimensão da farmácia reflete-se também numa diminuída oferta de produtos de dermocosmética, puericultura, e veterinária. A falta de algumas marcas de produtos de dermocosmética ocasionou-me pessoalmente a perda de vendas. Mesmo tendo sido instruído adequadamente pela equipa técnica acerca dos diferentes produtos disponibilizados pela Farmácia Adriana, e oferecendo alternativas nas situações em que não podíamos satisfazer as necessidades do utente, as pessoas são muitas vezes fiéis às marcas e produtos que já conhecem e ficam bastante relutantes em trocar por outro produto. Nestas situações, fui aprendendo a ter a destreza de perguntar à pessoa se preferia encomendar o produto em questão, e na maior parte das vezes a pessoa assentia. A puericultura é outra área com pouca procura e, conseqüentemente, com pouca oferta na Farmácia Adriana, e portanto não tive muitas oportunidades de desenvolver os meus conhecimentos acerca destes produtos. No que toca a produtos veterinários, devido à reduzida percentagem de utentes com necessidade deste tipo de produtos, fiquei ainda com algumas lacunas nesta área que mais tarde procurarei complementar.

2.2.3 Preparação de Manipulados

A preparação de manipulados é um dos serviços que desde a antiguidade sempre acompanhou a atividade farmacêutica. No entanto, graças à industrialização e vulgarização da produção em série, as prescrições de medicamentos manipulados sob a forma de Fórmulas Magistrais ou Oficiais têm caído em desuso, reservando-se apenas para terapêuticas individuais específicas. No decorrer dos quatro meses de estágio não me deparei com nenhuma prescrição de medicamentos manipulados, e portanto não tive a oportunidade de acrescentar à minha formação a preparação deste tipo de medicamentos, apesar da Farmácia Adriana providenciar um espaço adequado à sua preparação.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Formações

É comum os laboratórios que se encontram representados nas farmácias convidarem as respetivas equipas técnicas para formações com o intuito de familiarizar os farmacêuticos com novos produtos ou aprofundar conhecimentos de produtos já comercializados, e assim aprimorar o aconselhamento destes produtos junto dos utentes. No decorrer do estágio, a equipa da Farmácia foi convidada para várias formações, nas quais tive também a oportunidade de participar. Estas deram-me a conhecer novos produtos e permitiram-me desenvolver as minhas competências em várias áreas terapêuticas, nomeadamente contraceção hormonal, dermocosmética, terapêutica de conjuntivites, suplementos alimentares, entre outras.

Valorizo então a oportunidade de participar nestas formações, pois garantiram-me conhecimentos que pude pôr em prática aquando da dispensa dos produtos que foram o foco das formações, contribuindo assim para um maior à vontade durante atendimentos envolvendo estes produtos.

2.3.2 Medição de parâmetros bioquímicos

Na farmácia Adriana pude também aplicar na prática o que aprendemos na cadeira de Anatomofisiologia Humana II sobre a medição de parâmetros bioquímicos, nomeadamente medições de glicémia e colesterol. Este é mais um dos serviços prestados pelos farmacêuticos à comunidade, e um que assume bastante importância tanto no controlo de patologias que já são de conhecimento do utente, como num rastreio em que se poderá aconselhar alterações do estilo de vida em valores pouco aumentados, ou, face a medições mais afastadas dos valores de referência, reencaminhar mesmo para uma consulta médica. Durante o estágio tive a oportunidade de fazer algumas destas medições, tendo sempre o cuidado de perguntar o contexto em que se realizam as medições (em jejum ou pós-prandial, no caso da glicémia), e perante um resultado pouco afastado dos valores de referência aconselhar o utente a tentar controlar com uma alimentação mais saudável e prática de exercício físico, ou sugerindo suplementos como o arroz vermelho e o crómio que ajudam a controlar os níveis fisiológicos de colesterol e glicémia, respetivamente.

2.3.3 Intervenção terapêutica

Destaco também a oportunidade de poder ter um papel ativo e interventivo no seguimento da terapêutica de alguns utentes da Farmácia Adriana. A localização da farmácia e a atenção dispensada a cada utente é propícia a que alguns destes fiquem fidelizados à Farmácia Adriana e recorram a esta como farmácia de eleição. Isto possibilita um melhor acompanhamento dos tratamentos deste tipo de utentes e conseqüentemente melhores resultados terapêuticos. Quando o utente regressava à farmácia após ter levado uma nova prescrição, procurava inteirar-me de como a estava a tomar, se sentia melhorias, e procurava também sinais de possíveis efeitos secundários da terapêutica. Em raras ocasiões, as respostas do utente davam a entender que estava a fazer a terapêutica incorretamente, por exemplo tomar três comprimidos por dia em vez de dois, ou tomar um comprimido em jejum quando se devia tomar após o almoço, e coube-me a mim nesses casos intervir e relembrar o utente de como deveria fazer a medicação.

2.4 Ameaças

2.4.1 Crescente procura de terapêuticas alternativas

Nos dias que correm, cada vez mais pessoas recorrem à medicina alternativa em detrimento da terapêutica medicamentosa convencional, o que contribui para descredibilizar a atividade farmacêutica. Por várias ocasiões atendi utentes que procuravam medicamentos homeopáticos ou produtos naturais para tratar situações que seriam facilmente resolvidas com medicamentos. Dado que a oferta desse tipo de produtos na Farmácia Adriana é limitada, tentava sempre persuadir o utente a levar um medicamento adequado à situação, mas em quase todos os casos o utente recusou, argumentando que procurava uma solução mais natural e menos “química” que os medicamentos. Como muitos destes produtos não são regulados, a eficácia dos mesmos é discutível, e situações ligeiras que seriam revertidas com terapêutica farmacológica podem desenvolver complicações caso a terapêutica alternativa não seja eficaz.

2.4.2 Espaços de venda de MNSRM

A possibilidade de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica em espaços que não farmácias constitui uma das grandes ameaças ao setor farmacêutico nos tempos mais recentes. Se antes as farmácias enfrentavam já concorrência na venda de produtos de dermocosmética, puericultura, produtos de higiene, entre outros, hoje em dia encontram

também competição na venda de MNSRM noutros espaços comerciais. Apesar da conveniência de poder encontrar medicamentos “inofensivos” noutras superfícies, a ausência de aconselhamento por parte de um farmacêutico, profissional dotado de conhecimento sobre a área do medicamento, propicia uma trivialização do uso dos medicamentos e pode ocasionar situações de risco. O facto de alguns destes espaços se encontrarem em grandes superfícies comerciais garante-lhes uma maior afluência de clientes e uma maior capacidade negocial para com os fornecedores, possibilitando a venda de MNSRM a preços baixos com os quais as farmácias dificilmente conseguem competir.

2.4.3 Receitas manuais

A adoção das receitas eletrónicas como prática corrente é conveniente tanto para os farmacêuticos, pois os dados da receita são inseridos automaticamente na plataforma, como para os utentes, pois podem levantar apenas uma embalagem de cada vez, e levantar medicamentos em diferentes farmácias e durante um determinado período de tempo. No entanto, em situações de falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição ao domicílio, ou até um limite de 40 receitas por mês, as receitas manuais ainda são ocasionalmente utilizadas. Estas podem por vezes gerar problemas de interpretação, visto que a caligrafia de alguns prescritores é ilegível, e a falta de algum dado na receita como a dosagem, o número de embalagens ou o tipo de embalagem leva à necessidade de contactar o prescriptor, levando a um atendimento mais prolongado. Apesar das receitas manuais estarem a entrar em desuso, muitas vezes são estas que mais dificuldades geram aos farmacêuticos.

3. Casos práticos

3.1 Caso prático I - Dor de estômago

Utente do sexo masculino, com cerca de 20 anos, desloca-se à farmácia com queixas de desconforto abdominal. Procurando averiguar a etiologia do desconforto, pergunto se este surgiu após a toma de algum alimento ou medicamento, ou após algum esforço físico. Posto isto, o utente responde que estava a tomar clonixina (*Clonix*[®]) devido a uma intervenção dentária que lhe provocava odontalgia. Sabendo que a clonixina é um anti-inflamatório não esteróide cujos efeitos secundários incluem úlceras gástricas, náuseas e pirose, sugeri ao utente interromper o tratamento com *Clonix*[®] e trocar por outro analgésico, acrescentando também omeprazol 10mg de venda livre para proteção gástrica. O utente refere que já não tem dores

de dentes nem inflamação, acabando por levar apenas o omeprazol. Após assegurar a inexistência de contraindicações e indicar para não tomar durante mais de 14 dias, aviso também o utente para visitar o médico caso o desconforto continue ou evolua para dores. O utente retorna passado uma semana indicando que o desconforto passou.

3.2 Caso prático 2 - Cross-selling

Uma utente do sexo feminino, por volta de 40 anos, dirige-se à farmácia com uma prescrição de amoxicilina + ácido clavulânico. Tendo em conta que este antibiótico provoca frequentemente diarreia por desregular a flora intestinal, pergunto à utente se quer acrescentar à venda um probiótico para prevenir este efeito secundário. A utente acede e acaba por levar em conjunto com o antibiótico uma embalagem de *UL-250*[®], probiótico contendo *Saccharomyces boulardii*. Esta situação ocorreu por outras vezes, e constatei também que muitas prescrições trazem já probióticos associados à toma de antibióticos para prevenir a diarreia induzida por estes.

4. Conclusão

Refletindo após terminado o meu período de estágio na Farmácia Adriana, considero que este assumiu uma importância extrema para me dar a conhecer as diversas vertentes envolvidas no quotidiano de um farmacêutico comunitário.

Após um período de aprendizagem, fui rapidamente envolvido nas tarefas do dia-a-dia executadas na farmácia. Por vezes cometi erros, como é normal em situações de aprendizagem e adaptação a um novo ambiente, mas ensinaram-me sempre como corrigí-los e, principalmente, como evitá-los em situações futuras. Cresci bastante como pessoa e como futuro profissional farmacêutico, desenvolvendo *soft skills*, capacidades de gestão e conhecimentos científicos, e penso ser hoje uma pessoa mais completa e versátil graças à experiência de estágio na Farmácia Adriana.

Por isto e por todos os momentos de aprendizagem e companheirismo que me proporcionaram, resta-me agradecer à equipa técnica da Farmácia Adriana o modo como fui recebido e por me terem tratado como um membro da equipa praticamente desde o início do estágio.

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

CRISPR-Cas: Converting a Bacterial Defence Mechanism into a State-of-the-art Genetic Manipulation Tool

Alexandre Reis Nunes Calhaz Loureiro

Monografia no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge da Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

setembro de 2018



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



List of Abbreviations

AAV	Adeno-Associated Virus
ArgNP	Arginine Gold Nanoparticle
bp	Base Pairs
Cas/cas	CRISPR-associated
Cas9n	Cas9 nickase
Cascade	CRISPR-associated complex for antiviral defence
CPP	Cell-Penetrating Peptides
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
DBD	DNA-binding domains
dCas9	Catalytically “dead” Cas9
DSB	Double-Strand Break
dsDNA	Double-stranded DNA
eSpCas9	Enhanced Specificity <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
GFP	Green Fluorescent Protein
gRNA/sgRNA	Guide RNA
HBV	Hepatitis B Virus
HDR	Homology Directed Repair
HEPN	Higher Eukaryotes and Prokaryotes Nucleotide
HITI	Homology-Independent Targeted Integration
HypaCas9	Hyper-Accurate Cas9
indels	Insertions and deletions
LNP	Lipid Nanoparticle
NHEJ	Non-Homologous End Joining
nt	Nucleotides
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PFS	Protospacer Flanking Site
pre-crRNA	crRNA precursor
RNAP	RNA Polymerase
smFRET	Single-Molecule Förster Resonance Energy Transfer

SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
SpCas9-HFI	High-Fidelity <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
ssDNA	Single-stranded DNA
TAL	Transcription Activator-Like
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
tracrRNA	<i>trans</i> -activating RNA
WT	Wild-Type
ZFN	Zinc-Finger Nuclease

Resumo

Os bacteriófagos são vírus ubíquos que infetam bactérias, utilizando a maquinaria genética destas para se replicarem. De modo a defenderem-se deste tipo de invasores, as bactérias desenvolveram um engenhoso sistema adaptável de defesa, de seu nome *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR na forma abreviada.

Pouco tempo depois, investigadores da área descobriram que um tipo de sistema CRISPR, o sistema CRISPR-Cas9, podia ser transformado numa tecnologia de engenharia genética simples e eficaz, com várias melhorias relativamente às ferramentas utilizadas atualmente. Esta descoberta iniciou uma revolução no campo da genética, com tecnologias CRISPR novas e melhoradas a serem amplamente utilizadas em investigação *in vitro* e *in vivo* nos últimos anos.

Neste trabalho, o autor descreve os mecanismos bacterianos de imunidade dos sistemas CRISPR-Cas contra infeção por fagos, e como estes sistemas foram reprogramados para dar origem a novas ferramentas de manipulação genética. Novas tecnologias CRISPR-Cas e as possíveis aplicações destes sistemas na saúde e outros campos são também contempladas.

Palavras-chave: CRISPR; Cas9; engenharia genética; manipulação genética

Abstract

Bacteriophages are pervasive viruses that infect bacteria, relying on their genetic machinery to replicate. In order to protect themselves from this kind of invaders, bacteria developed an ingenious adaptive defence system, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR in short.

Researchers soon realised that a specific type of CRISPR system, CRISPR-Cas9, could be modified into a simple and efficient genetic engineering technology, with several improvements over currently used systems. This discovery set in motion a revolution in genetics, with new and improved CRISPR systems being used in plenty of *in vitro* and *in vivo* experiments in the latest years.

In this dissertation, the author illustrates the mechanisms behind CRISPR-Cas systems as a means of bacterial immunity against phage invasion and how these systems were engineered to originate new genetic manipulation tools. Newfound CRISPR-Cas technologies and the up-and-coming applications of these systems on healthcare and other fields are also contemplated.

Key-words: CRISPR; Cas9; genetic engineering; gene editing

I. Introduction

Genetic engineering is a subject vastly sought after for its large array of possible uses in a multitude of scientific domains. This set of technologies enables innovative practices such as the development of drought-resistant plant species (H. HU AND XIONG, 2014), the modification of human pluripotent cells (HOCKEMEYER ET AL., 2011), or even the generation of genetically modified monkeys (NIU ET AL., 2014).

The first attempts to achieve genetically modified organisms (apart from rudimentary selective breeding and induced mutagenesis techniques) were unsuccessful up until the 1970s. Transgenesis was effectively used to insert exogenous DNA sequences into *Escherichia coli* plasmids without disrupting the bacteria's biological functions, resulting in the first genetically modified organism (COHEN ET AL., 1973).

However, this technique had its limitations. Since it relied on the random insertion of a DNA fragment, there was a risk of mismatch and interference of the exogenous gene with endogenous sequences that were not meant to be altered.

Homologous recombination was the first precise gene-editing technique to be developed (SZOSTAK ET AL., 1983). The sequences of the DNA fragment delivered to the cell were homologous to the sequences of a target location in the genome, thus providing a way to reduce non-specific binding. Although this technique could and would be used among the scientific community for research purposes, widespread use was restricted due to its inefficiency.

Over the following decades, the increase in knowledge and information about genetics and advances in DNA sequencing technologies would pave the way for the development of more efficient and precise gene-editing tools, with clustered regularly interspaced short palindromic repeats, abbreviated as CRISPR, as the latest to make the headlines all over the scientific community.

2. What is CRISPR?

This complex system was first mentioned in 1987 when Japanese scientists were studying the activity of the *iap* gene in *Escherichia coli* (ISHINO ET AL., 1987). Close to the sequence of the *iap* gene, they noticed an unusual genetic structure composed of alternating repeat and non-repeat DNA sequences, whose biological significance was at the time unclear.

The function of these intriguing systems was only brought to light 20 years later. In a landmark study, experimental evidence established CRISPR as a crucial element of the bacterial defence system against bacteriophage infection (BARRANGOU ET AL., 2007). Scientists identified two different CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus* strains. Sequencing of the spacer sequences of the CRISPR system revealed that these spacers were homologous to some bacteriophage and plasmid sequences, leading to the hypothesis that CRISPR was a defence mechanism of bacteria against foreign elements. To test this possibility, a phage-sensitive wild-type (WT) *S. thermophilus* strain was challenged with two different virulent bacteriophages. This resulted in the generation of nine different phage-resistant *S. thermophilus* strains, and further analysis of CRISPR loci in these mutant strains discovered that new spacers had been inserted next to those of the WT strain. Additionally, the sequences of these new spacers were similar to sequences within the genome of the phages used in the experiment. This confirmed the hypothesis that, with CRISPR, bacteria submitted to viral stress may integrate new spacers from phage genomic sequences that can lead to a diverse phage resistance phenotype of the bacteria. In the same study, researchers also noticed the proximity of CRISPR sites to a particular set of CRISPR-associated (*cas*) genes that coded Cas proteins, which were also relevant to CRISPR-mediated immunity since silencing of these genes disrupted CRISPR function.

Bioinformatic databases (CRISPRdb and CRISPI) dedicated to finding CRISPR motifs and Cas proteins on sequenced genomes predict that these systems are prevalent in Archaea (~87%) and can be found on many bacterial genomes and plasmids (~45%) (GRISSA ET AL., 2007; ROUSSEAU ET AL., 2009).

3. Structure of CRISPR loci

CRISPR stands for “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”. Several types of CRISPR exist with varying sequences and reliant on different Cas proteins, though they all share a similar DNA-encoded, RNA-mediated activity. The CRISPR locus, as the full name dictates, is composed of short repeat sequences, usually ranging from 28 to 37 bp (base pairs) (BARRANGOU AND MARRAFFINI, 2014), separated by spacers each bearing a unique sequence of similar length (Fig. 1). Each repeat is arranged in a palindromic fashion, meaning that the repeat’s sequence on one side of the strand is identical to the opposite strand’s sequence when both are read in their respective 5’ to 3’ direction. Spacer sequences feature phage- or plasmid-derived genetic material and constitute the key elements to the

specificity of CRISPR's defence mechanisms (BARRANGOU AND MARRAFFINI, 2014). These spacers function as an immunological memory bank, storing sequences from previous encounters with invading organisms. The number of spacers within a CRISPR array can range from as few as one to several hundred, depending on the species (GRISSA ET AL., 2007).

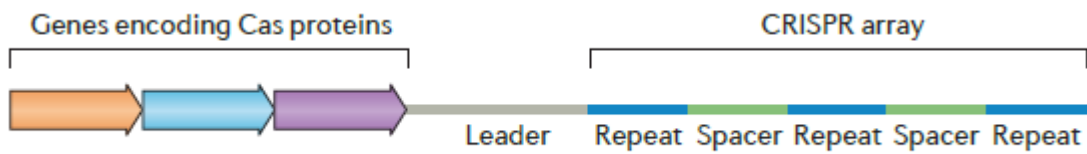


Figure 1 **Simplified structure of a CRISPR locus.** The CRISPR array is composed of alternating spacer and repeat sequences. A leader sequence and *cas* genes precede the array. Adapted from AMITAI AND SOREK., 2016.

A region rich in adenine and thymine (A and T, respectively), known as the leader sequence, stands upstream to CRISPR loci (Fig. 1). These leader sequences have a length of approximately 500 bp and carry promoter elements and signals for CRISPR systems adaptation that are crucial to the transcription of crRNA (CRISPR RNA) and the successful integration of foreign genetic material into CRISPR sequences (PUL ET AL., 2010; YOSEF ET AL., 2012).

The CRISPR array and the leader sequence are preceded by CRISPR-associated genes, otherwise known as *cas* genes. Cas proteins (proteins encoded by *cas* genes) pair together with crRNA transcribed from CRISPR loci, forming CRISPR-Cas effector complexes which mediate the silencing and cleavage of alien nucleic acids. Variations in *cas* genes and different arrangements of CRISPR loci originate several types of CRISPR-Cas systems. These were originally broken down into three major types, I, II, and III, each bearing a signature gene specific to the type, *cas3*, *cas9*, and *cas10*, respectively (CHYLINSKI ET AL., 2014). Recent studies suggest different classifications, with two classes and five (MAKAROVA ET AL., 2015) or most recently six types of CRISPR-Cas systems (WRIGHT ET AL., 2016) having been described. Class I systems include types I, III, and IV, which all depend on multiprotein crRNA-complexes to execute their function; class 2 systems encompass types II, V, and VI, whose effector complex is composed of a single multi-domain protein (MAKAROVA ET AL., 2015; SHMAKOV ET AL., 2017). Further subgroups exist within each type, with varied genetic composition and spacer structure.

Cas proteins constitute the backbone of CRISPR systems. The distribution of Cas proteins among different types is highly variable. Some are present in most systems, such as Cas I and Cas2, which participate in adaptation (MAKAROVA ET AL., 2006), while others are the signature proteins of specific types or subtypes (SHMAKOV ET AL., 2015). MAKAROVA ET AL. proposed the division of Cas proteins into four modules depending on their roles in CRISPR

adaptive immunity: adaptation, for proteins involved in the adaptation step (see below *Adaptation*); expression, with proteins that are required for crRNA maturation and target binding (see below *CRISPR RNA biogenesis*); interference, for proteins that cleave the target molecules (see below *Interference*); and ancillary, proteins with regulatory or auxiliary functions in CRISPR systems (MAKAROVA ET AL., 2015). The specific functions of the most relevant Cas proteins for each CRISPR-Cas system will be highlighted in the following chapters.

4. Steps of CRISPR-Cas adaptive immunity

4.1. Adaptation

The first step for CRISPR-Cas mediated defence is known as adaptation or acquisition. In this phase, genetic material of the invading phage is incorporated into the CRISPR-Cas system, thus providing the organism with a way of recognizing and adjusting its response to further invasions by that phage strain in particular (Fig. 2). CasI and Cas2 are the key proteins that mediate the adaptation step, and they are ubiquitous in CRISPR-Cas systems, irrespective of the type (MAKAROVA ET AL., 2006). Both proteins are required for this step since the expression of CasI or Cas2 on their own does not potentiate spacer acquisition (YOSEF ET AL., 2012). Further experiments showed that mutations on either *casI* or *cas2* genes in *E. coli* render spacer acquisition impossible, while overexpression of both CasI and Cas2 improved spacer incorporation (DATSENKO ET AL., 2012), confirming the crucial role of both proteins on spacer acquisition.

In *E. coli*, the most widely studied adaptation model, CasI and Cas2 form a symmetric heterohexameric protein complex (CasI-Cas2) that is required for spacer acquisition, featuring two CasI dimers (CasIa, CasIa', CasIb and CasIb') and a single Cas2 dimer (NUÑEZ, HARRINGTON, ET AL., 2015). Both proteins have nuclease activity (BABU ET AL., 2012; WIEDENHEFT ET AL., 2009), although Cas2 nuclease activity is not crucial for spacer acquisition (NUÑEZ ET AL., 2014).

The CasI-Cas2 complex plays a dual role on the adaptation step, both in the excision of protospacer DNA (segment present in the foreign DNA molecule that precedes the spacer sequence) and its incorporation into the CRISPR sequence (NUÑEZ ET AL., 2014) (Fig. 2).

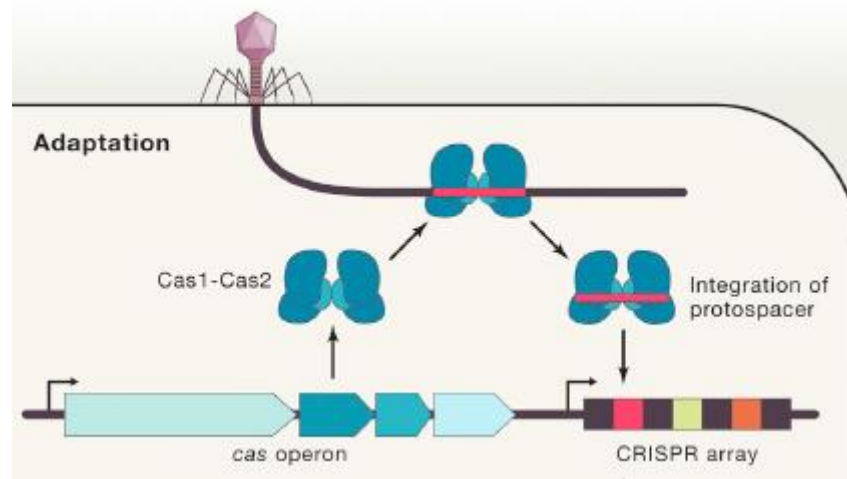


Figure 2 **Adaptation step of CRISPR bacterial immunity.** The Cas I-Cas2 complex cleaves a segment of the invading DNA and incorporates the sequence into the CRISPR array, originating a new spacer. Adapted from HILLE ET AL., 2018.

Selection of protospacer sequences seems to be mediated by short motifs located near the target sequence, denominated protospacer adjacent motifs (PAMs). PAMs are short sequences (2-5 nucleotides), specific to each CRISPR-Cas subtype and bacteria, which determine the spacer alignment within the CRISPR array in type I and II systems, the better understood models of adaptation (MOJICA ET AL., 2009). In type I systems, CasI binds to the PAM-complementary sequence in its ssDNA form. As for type II systems, Cas9 recognizes the PAM sequence in the double-strand form (ANDERS ET AL., 2014). Furthermore, PAMs seem to participate in the interference phase and in self/non-self distinction as well (SHAH ET AL., 2013).

Spacer acquisition in the *E. coli* type I-E CRISPR-Cas system begins with the recognition of PAM complementary sequences in ssDNA by CasIa and CasIa' subunits (MOJICA ET AL., 2009). Tyrosine residues (Tyr22) in CasI subunits bracket the foreign genetic material, acting as a ruler that limits the central dsDNA region of the protospacer to a length of 23 nucleotides (nt) (NUÑEZ, HARRINGTON, ET AL., 2015; J. WANG ET AL., 2015). The Cas2 dimer of the CasI-Cas2 complex acts as a stabilizer to the central dsDNA region. Two ssDNA strands at least 7-nt long overhang from each 3' end of the central duplex region. The last 3 nt (positions 5-7 in the overhangs) correspond to the PAM complementary sequence. These 3 nt are cleaved by nCasI domains, generating two 3'-OH groups and resulting in a mature protospacer with a length of 33 nt from end to end.

Integrase activity of the Cas I-Cas2 complex mediates integration of protospacer DNA into the CRISPR array. 3'-OH groups of the protospacer intermediate catalyse 2 sequential nucleophilic attacks at both 5' ends of the first repeat of the CRISPR array (NUÑEZ, LEE, ET AL., 2015). The result is an expanded CRISPR array with a new spacer in between two incomplete

ssDNA repeats, which are afterwards repaired by unknown enzymes. This selection bias for the repeat that is the closest to the leader sequence means that the most recently acquired spacer is the first on CRISPR array. Therefore, spacers are arranged chronologically within the array, with a few exceptions (ERDMANN AND GARRETT, 2012; SHMAKOV ET AL., 2014).

Some type I, II and V systems also rely on Cas4 nuclease activity for the adaptation step (MAKAROVA ET AL., 2015; SHMAKOV ET AL., 2015). The type III-B Cas-system of *Marinomonas mediterranea* is particularly interesting because CasI is linked to a reverse transcriptase, meaning that spacers can be obtained from RNA-based invaders and subsequently reverse transcribed into DNA (SILAS ET AL., 2016). The need to further comprehend the adaptation machineries for other types of Cas systems persists, although since CasI and Cas2 are widely present in nearly all CRISPR systems (MAKAROVA ET AL., 2006), the function of this complex in most CRISPR systems is thought to be similar to the well understood adaptation mechanisms of type I and type II systems.

4.2. CRISPR RNA biogenesis

The transcription and processing of the CRISPR array and *cas* genes into small crRNAs involves subtype-specific processes and enzymes. In all types of CRISPR-Cas systems, the CRISPR locus is transcribed into a crRNA precursor (pre-crRNA), which is subsequently cleaved and processed by Cas proteins or cellular ribonucleases, yielding smaller units of mature crRNA (MARRAFFINI AND SONTHEIMER, 2010) (Fig. 3). This mature crRNA features a single spacer sequence flanked by fragments of the repeat region.

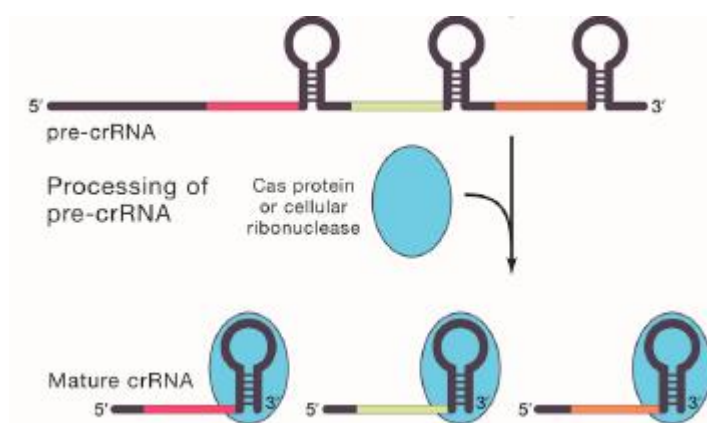


Figure 3 **crRNA biogenesis and processing step.** After the CRISPR array is transcribed, the resulting pre-crRNA molecule is cleaved by either Cas proteins or host RNases, depending on the subtype, producing mature crRNA molecules. Adapted from HILLE ET AL., 2018.

In type I systems, a Cas6 variant (formerly Cse3) is the enzyme that processes the pre-crRNA into mature crRNA fragments. As an example, spacers in type I-E form a stem-loop shape after transcription that is recognised and cleaved by Cas6e. This type I-E specific protein remains attached to the 3' end of the crRNA after cleavage (GESNER ET AL., 2011). Type III

systems also require Cas6 for crRNA processing, even though their repeats do not originate stem-loop structures (NIEWOEHNER ET AL., 2014). Biogenesis of type IV systems still awaits further investigation.

Type II systems do not carry the gene for Cas6 and instead rely on host RNase III, Cas9 proteins, and small *trans*-activating RNA molecules (tracrRNA). tracrRNA is complementary to the repeat sequence and contains 3 stem-loop hairpin structures (CHYLINSKI ET AL., 2013; NISHIMASU ET AL., 2015). After transcription, tracrRNA binds to pre-crRNA molecules originating dsRNA repeats alternated with ssRNA spacers. Cas9 acts as a molecular anchor which stabilizes the tracrRNA:pre-crRNA interaction for later recognition and cleavage of pre-crRNA by RNase III for complete processing (DELTCHEVA ET AL., 2011).

In type V and type VI, Cas12 and Cas13, respectively, are the proteins that process pre-crRNA into a mature crRNA, without need for tracrRNA molecules (FONFARA ET AL., 2016; SHMAKOV ET AL., 2015). However, in subtype VI-A the processing step is not essential, since pre-crRNA molecules can be used as guides for target cleavage (EAST-SELETSKY ET AL., 2017).

Both type II and III systems require a further trimming step through a ruler-based mechanism for complete crRNA processing. Trimming occurs at the 5' end in type II systems and at the 3' end in type III systems (HATOUM-ASLAN ET AL., 2011).

4.3. Interference

Upon infection, the mature crRNA molecules direct the subtype-specific interference machinery towards invading nucleic acids to enable the silencing of foreign genetic material (Fig. 4).

In type I systems a Cascade system (CRISPR-associated complex for antiviral defence) is formed, composed of a multiprotein backbone with different Cas protein subunits linked to the crRNA molecule (BROUNS ET AL., 2008). The Cascade complex recognizes the PAM site in the invading molecule and unwinds the DNA, enabling the pairing of crRNA with the homologous invading DNA strand. This pairing induces a triple-stranded R-loop formation, which in turn prompts the recruitment of Cas3, the signature protein of type I systems (HAYES ET AL., 2016; XIAO ET AL., 2017). Cas3 cleaves the ssDNA strand not linked to the Cascade complex. Though this degradation handicaps the invader, it might not lead to the full destruction of the target. Complete degradation might be induced by other cellular nucleases

or by Cascade-independent Cas3 nuclease activity, which has been previously documented (MULEPATI AND BAILEY, 2013; REDDING ET AL., 2015; SINKUNAS ET AL., 2013).

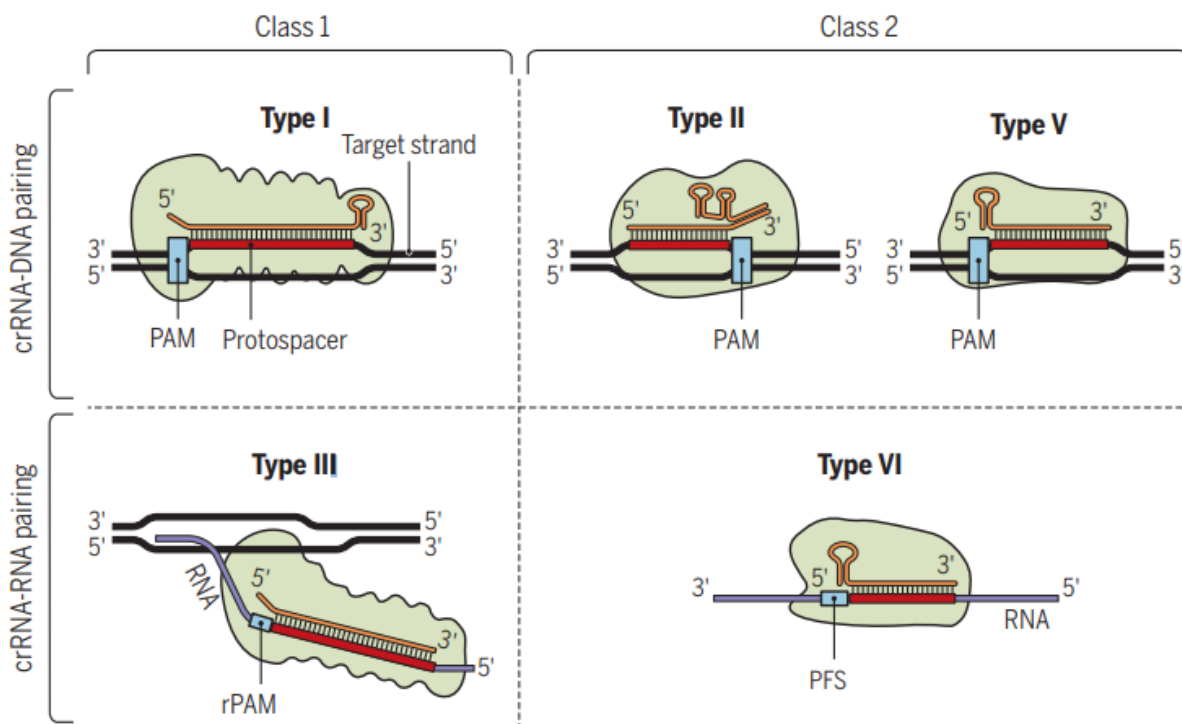


Figure 4 **The different interactions between CRISPR systems and the target locus.** In types I, II and V, the crRNA molecule (orange) recognises the PAM site (blue) of the target DNA sequence, prompting the binding between the crRNA and the protospacer (red). Type III targets nascent RNA molecules, requiring transcription of the complementary DNA and an RNA PAM (rPAM). Type VI cleaves RNA depending on the recognition of a protospacer-flanking motif (PFS), similar to a PAM. Adapted from JACKSON ET AL., 2017.

Type III systems are similar to Type I in the sense that they also depend on multiprotein Cascade complexes that encompass crRNA, Csm in subtype III-A and Cmr in III-B, although Cas6 is absent in these complexes (OSAWA ET AL., 2015). Type III-A and type III-B share in common the signature protein of type III systems, Cas10, and are unique in relation to other interference mechanisms because they target both RNA and DNA substrates (KAZLAUSKIENE ET AL., 2016; ROUILLON ET AL., 2013). Interference by type III systems occurs when the target DNA is being transcribed, since the cascade complex binds to a nascent ssRNA transcript. This binding enables Cas10-mediated cleavage of the complementary DNA duplex and Cas7-guided cleavage of the ssRNA molecule in intervals of 6 nucleotides (OSAWA ET AL., 2015; SAMAI ET AL., 2015). Recent studies also suggest that Cas10 has a further role in activating non-specific RNase Csm6, by producing cyclic oligoadenylates from ATP molecules. Csm6 is activated by these oligoadenylates, and even though it is not a part of the Cascade effector

complex, it has an auxiliary action by degrading foreign transcripts in a non-specific fashion (KAZLAUSKIENE ET AL., 2017; NIEWOEHNER ET AL., 2017).

Akin to the biogenesis step, interference in Type II CRISPR-Cas systems depends on both Cas9 and tracrRNA. In interference, Cas9 acts as an endonuclease guided by two RNAs, crRNA and tracrRNA, which pair together due to tracrRNAs complementarity to spacer sequences carried by crRNA, forming a dual RNA complex (tracrRNA:crRNA) (DELTCHEVA ET AL., 2011; GASIUNAS ET AL., 2012; JINEK ET AL., 2012). Binding of this dual RNA structure induces conformational changes on Cas9, leading to its activation (JINEK ET AL., 2012). Upon activation, the guide RNA-bound complex screens foreign genetic elements for the correct PAM site, opposite to the target strand. Once identified, the dsDNA is unwound and crRNA binds to the target ssDNA leading to an R-loop shape and ultimately to a blunt double-strand break by both catalytic sites of Cas9, RuvC and HNH, 3 nt upstream of the PAM site (ANDERS ET AL., 2014; GASIUNAS ET AL., 2012; JINEK ET AL., 2012).

Type V CRISPR systems depend on subtype-specific Cas12 proteins, Cas12a (formerly Cpf1), Cas12b and Cas12c for subtypes V-A, V-B, and V-C, respectively (SHMAKOV ET AL., 2015). These proteins bear some degree of similarity to Cas9, as noted by phylogenetic analysis and the bilobed structure they share in common (DONG ET AL., 2016; SHMAKOV ET AL., 2015; STELLA ET AL., 2017). After PAM site recognition and crRNA binding to target DNA, Cas12a and Cas12b asymmetrically cleave the DNA duplex in both strands, originating staggered breaks with 5- and 7-nt overhangs on Cas12a and Cas12b, accordingly. However, unlike Cas9 or Cas12b, the interference mechanism of Cas12a does not depend on tracrRNA for successful cleaving, and instead relies solely on crRNA (FONFARA ET AL., 2016). Cas12c still awaits further investigation on its structure and activity.

The recently characterised type VI is defined by the presence of the Cas13 protein (formerly C2c2). This protein contains higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide (HEPN)-binding domains, which are ubiquitous in RNases (SHMAKOV ET AL., 2015, 2017). Cas13 is unique relative to other class 2 systems due to its ability to cleave ssRNA molecules homologous to crRNA, which is complemented with non-specific cleaving of other ssRNAs, similar to the Csm6 enzyme of type III systems (ABUDAYYEH ET AL., 2016; EAST-SELETSKY ET AL., 2016). Cleaving occurs preferably before uridine (U) residues. A species-dependent protospacer flanking site (PFS), analogous to PAMs in DNA targets, is also of relevance for activation of Cas13 proteins (ABUDAYYEH ET AL., 2016). Binding to crRNA induces conformational changes in Cas13 that promote ssRNA pairing. Upon linking to the target,

Cas13 RNase activity is prompted by the approximation of the catalytic sites of both HEPN domains (L. LIU ET AL., 2017).

5. CRISPR-Cas systems as a gene-editing tool

In a landmark paper released in June 2012, JINEK ET AL. laid the foundation to what would ultimately become a revolution in genome editing and transcriptional control (JINEK ET AL., 2012). Jinek and his peers hypothesised that in Type II systems, the dual guide RNA complex tracrRNA:crRNA of Cas9 could be fused into a single chimeric RNA by linking the 3' end of crRNA to the 5' end of tracrRNA. Such technique would allow for programmed DNA cleavage through engineering of the chimeric RNA molecule, later designated as sgRNA or gRNA (guide RNA). This hypothesis was proven with the design five different gRNA molecules to target the green fluorescent protein (GFP) gene, which resulted in precise and efficient cleavage of a plasmid containing the GFP gene by the programmed Cas9 for all five gRNA molecules.

Shortly thereafter, further discoveries would unravel the full potential of CRISPR as a tool for genetic editing. In early 2013, JIANG ET AL. used the CRISPR-Cas9 system to induce targeted mutations (insertions, deletions, and single-nucleotide substitutions) in the genome of *Streptococcus pneumoniae* and *E. coli* strains (JIANG ET AL., 2013).

Later in the same year, BIKARD ET AL. demonstrated how CRISPR could be used as a new tool to regulate gene expression by either activating or repressing the transcription of bacterial genes (BIKARD ET AL., 2013).

As experimenting with CRISPR started to become widespread, scientists moved from bacteria to other kinds of cells. Soon, all sorts of cells and some multicellular organisms would be the object of CRISPR-mediated manipulation, such as human cell cultures, mice, plants, yeasts, and the list goes on (DING ET AL., 2013; GENEROSO ET AL., 2016; SHAN ET AL., 2013; H. WANG ET AL., 2013).

5.1. Repurposing CRISPR for genetic engineering

Of both CRISPR-Cas classes, class 2 systems are the most widespread among the scientific community due to the simplicity of their mechanism. Whereas class I systems require a convoluted multiprotein Cascade complex, class 2 systems depend only on small RNA molecules, apart from the type's specific Cas protein (MAKAROVA ET AL., 2015).

As previously mentioned (see *Interference*), type II Cas9 systems rely solely on a dual RNA complex of crRNA:tracrRNA, which can be effortlessly engineered into a single chimeric gRNA molecule (JINEK ET AL., 2012). gRNA molecules contain both a scaffold sequence that binds to Cas9 and a targeting sequence which directs the system towards the target locus (ANDERS ET AL., 2014). As Cas9-gRNA screens for a potential target, the first 8-12 PAM-proximal bases of gRNA's targeting sequence, also known as the seed sequence, will begin pairing with the target DNA in the 3'-5' direction, provided a PAM site is recognised (SEMENOVA ET AL., 2011). While mismatches in the seed sequence terminate pairing and compromise Cas9 cleaving activity, mismatches towards the 5' PAM-distal end do not always jeopardise Cas9 function (LIU ET AL., 2016). Homology between gRNA and the target sequence results in a double-strand break (DSB) in the DNA, catalysed by both catalytic domains of Cas9, HNH and RuvC.

DSB repair is mediated either by non-homologous end joining (NHEJ) or by homology-directed repair (HDR) (Fig. 5). NHEJ is an active and error-prone mechanism where random DNA fragments align with both ends of the DSB and are linked by endogenous repair machinery, provided the bases at both ends share some degree of complementarity (MOORE AND HABER, 1996). This pathway requires no repair template and constitutes the main route by which Cas9-induced DSBs are repaired. NHEJ can lead to small nucleotide insertions or deletions (indels) in the DSB region, which in turn can originate a vast host of insertions, deletions, or frameshift mutations (BENNARDO ET AL., 2009; WATERS ET AL., 2014). These mutations derived from Cas9-induced DSBs can be beneficial when trying to attain a knockout in the targeted gene, since indels often result in premature stop codons and consequently render the gene inoperative. However, NHEJ is a highly random and unpredictable process not suitable for the generation of single-base editing or the insertion of specific sequences.

Homology-directed repair arises as a more precise method for DSB repair and incorporation of specific sequences after Cas9 cleavage. Contrarily to NHEJ, HDR requires a DNA template containing the sequence to be delivered to the cell (PARDO ET AL., 2009; SHRIVASTAV ET AL., 2008), along with Cas9 and the gRNA. For HDR to be successful, both ends of the template must be homologous to the terminal region of the DSB. In order to prevent Cas9 linking and eventual cleavage of the inserted sequence, the PAM sequence should be absent from the repair template. Due to the high efficiency of Cas9 activity and the relatively higher efficiency of NHEJ when compared to HDR, three kinds of entities coexist in this process: wild-type sequences, NHEJ-repaired sequences, and a smaller population of the

intended HDR-repaired sequence (K. LI ET AL., 2014). Thus, isolation and amplification of the desired sequence are of utmost importance to enhance the *in vitro* efficiency of HDR.

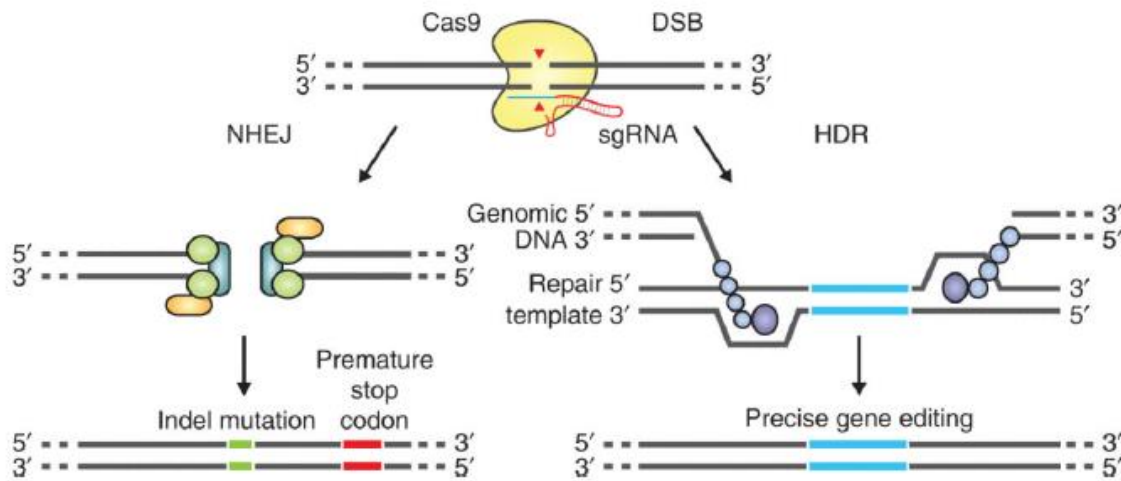


Figure 5 **NHEJ and HDR repair mechanisms.** Cleavage of target DNA by Cas9 (yellow) results in a DSB, which is then repaired by NHEJ or HDR mechanisms. NHEJ is the most active and error-prone repair mechanism, where host repair enzymes rejoin the blunt ends, often resulting in indel mutations. HDR requires a DNA repair template, enabling precise gene editing, although with lower efficiency when compared with NHEJ. Adapted from RAN ET AL., 2013.

Apart from mutations and gene editing, CRISPR systems have also been manipulated to increase or reduce gene expression. By introducing two mutations in the RuvC and HNH catalytic domains of Cas9, scientists engineered a 'dead' Cas9 (dCas9) that could still bind to DNA but had no cleaving activity (BIKARD ET AL., 2013). Repression is possible using dCas9 linked to gRNA molecules complementary to a selected gene region. Binding to the targeted gene prevented transcription, seemingly by sterically inhibiting RNA polymerase (RNAP) binding and activity. Moreover, both the initiation and elongation steps of transcription can be prevented through this method, depending on the gene region towards which dCas9 is directed. Another particularly interesting finding was the possibility to modulate the strength of transcription repression by weakening RNA/DNA interactions through the introduction of mismatches in the gRNA/target connection, induced by mutations in the 5' end of crRNA. Transcription activation was achieved by fusing dCas9 to the omega (ω) subunit of RNAP. dCas9 is directed to the target region, subsequently recruiting and activating the RNAP and culminating in an increase of gene transcription. Novel strategies of Cas9-based transcription modulators rapidly appeared prompted by the fusion of dCas9 or gRNA to different activator or repressor elements, with multiple degrees of modulation and specificity, and enabling single or multiplexed transcriptional control (DOMINGUEZ ET AL., 2016; HAWKINS ET AL., 2015; KONERMANN ET AL., 2015). Due to its catalytically inactive nature, modifications of gene

expression caused by dCas9 are transient, since the genomic DNA is not altered (BIKARD ET AL., 2013; QI ET AL., 2013). However, persistent modifications can be achieved with dCas9 by fusing it to acetyltransferase, histone/DNA demethylase or methyltransferase, altering histone acetylation/methylation or DNA methylation marks and inducing potentially inheritable epigenetic expression modulation when dividing cells are targeted (AMABILE ET AL., 2016; FEINBERG ET AL., 2016; LO AND QI, 2017).

If the objective is to correct or induce a point mutation that requires only a base substitution, there are simpler methods that do not require a DNA template and are have greater efficiency than HDR. By introducing an aspartate-to-alanine (D10A) mutation in the RuvC active domain of Cas9, the resulting mutant, Cas9 nickase, (Cas9n) will nick the target DNA, originating single-stranded breaks rather than DSB (CONG ET AL., 2013; JINEK ET AL., 2012). Coupling this Cas9n or dCas9, the catalytically “dead” variant of Cas9, with a cytidine deaminase enzyme enables the gRNA-mediated deamination of cytosine (C) bases in the non-target DNA strand into uracil (U), which shares the base-pairing properties of thymine (T) (KOMOR ET AL., 2016). Through endogenous DNA replication or DNA repair, the U base is repaired to a T base, thereby creating a C→T (or G→A) substitution without inducing a DSB. In the same paper, with enhanced third-generation base editors, KOMOR ET AL. achieved >30-fold greater editing efficiency in various human cell lines when compared to HDR-mediated Cas9 editing, with fewer indel formation. Later base editors’ generations built upon this system to increase efficiency and reduce off-target indel formation (Y. B. KIM ET AL., 2017; KOMOR ET AL., 2017; REES ET AL., 2017).

6. Advantages of CRISPR relative to other techniques

CRISPR is the latest addition to a set of gene editing tools that keeps evolving and producing new possibilities in the field of genome engineering. Zinc-finger nucleases (ZFN) and transcription activator-like effector nucleases (TALENs) are the other vastly used approaches that complete the lot.

ZFN and TALENs both derive from the fusion of the DNA cleavage domain of the non-specific *FokI* restriction endonuclease with DNA-binding elements that direct the enzyme to the desired locus. In ZFNs, the *FokI* cleaving domain is coupled to an assemblage of zinc finger proteins, each recognizing and binding to a triplet of nucleotide (Y. G. KIM ET AL., 1996; Q. LIU ET AL., 1997). The design of a ZFN pair targeting opposite strands with an offset of 6 bp

results in a DSB in the targeted DNA and can subsequently be repaired by NHEJ or HDR (BIBIKOVA ET AL., 2002). On the other hand, TALENs were engineered through the fusion of the *FokI* domain with transcription activator-like (TAL) effectors, proteins found in plant pathogens whose DNA-binding domains (DBD) contain tandem repeats of 33-35 amino acids (BOCH ET AL., 2009; CHRISTIAN ET AL., 2010). Each repeat binds to a single nucleotide, and the amino acids residues in the positions 12 and 13 of that repeat determine which nucleotide is bound (JOUNG AND SANDER, 2013). By knowing this, it is possible to direct TALENs towards a target locus by programming specific DBDs that can recognize DNA sequences with a length of 15-20 base pairs, originating a DSB when a pair of TALENs is used (MILLER ET AL., 2011).

These two methods have seen use as genetic editing mechanisms, for gene insertion, deletion, and modulation in multiple species and cell lines (BEERLI ET AL., 2000; CRISTEA ET AL., 2013; ORLANDO ET AL., 2010; SEGAL ET AL., 1999; F. ZHANG ET AL., 2011). Nevertheless, both techniques encompass some drawbacks that the use of CRISPR/Cas systems overcomes.

For starters, whereas ZFNs and TALENs require custom-made proteins to guide the enzyme towards its target, Cas9 systems depend solely on the engineering of short gRNA molecules, without the need for laborious and costly protein programming and validation and therefore saving time and resources. The need for specific proteins tailored for each gene also makes multiplex gene editing a strenuous task for ZFNs and TALENs, while with Cas9 systems multiple genes can be targeted simply by delivering multiple gRNAs to the cells (JAO ET AL., 2013; H. WANG ET AL., 2013). Additionally, the fact that ZFNs and TALENs work as dimers deters the use of some delivery systems, such as adeno-associated virus, due to the limited loading capacity of these vectors and the hefty dimensions of ZFN and TALEN systems (Z. WU ET AL., 2010). The markedly high efficiency of CRISPR/Cas systems coupled with the above-mentioned advantages over other methods justify the CRISPR “epidemic” that the scientific community experienced in 2013 (CONG ET AL., 2013; DING ET AL., 2013; MALI ET AL., 2013; PENNISI, 2013).

7. Limitations of CRISPR systems

Despite the referred qualities of CRISPR systems, some limitations need to be taken into consideration for CRISPR to see use in therapeutic and clinical applications on a larger scale.

CRISPR-Cas systems require a short PAM sequence next to the 3' end of the target sequence (DELTCHEVA ET AL., 2011; MOJICA ET AL., 2009). As an example, the most common Cas9 system, SpCas9, recognises NGG motifs and therefore only sequences adjacent to that motif can be targeted (JIANG ET AL., 2013). This feature of CRISPR limits its use when no such PAM exists in the neighbourhood of the locus one wishes to target. However, various conditions lessen the impact of this obstacle: NGG motifs occur rather frequently, on average every 8 bp in the human genome (CONG ET AL., 2013; HSU 2013); SpCas9 can also recognise NAG motifs, albeit with lower efficiency (JIANG ET AL., 2013); and the fact that Cas9 systems from different bacteria recognise other PAM sites (SHAH ET AL., 2013), meaning that researchers can pick whatever system better suits their needs. Hu and colleagues recently engineered a SpCas9 variant, xCas9, that recognises additional PAM sites, such as NG, GAA, and GAT, and at the same time displaying significantly lower off-target effects (J. H. HU ET AL., 2018).

One of the most significant hurdles that stalls CRISPR adoption is its propensity to generate off-target effects. While TALEN target sites can have a length of ~30nt, making them unique targets in the genome and lowering the chance of mismatches (JUILLERAT ET AL., 2014; WEFERS ET AL., 2013), Cas9 is guided by a 20-nt fraction of the gRNA, and it maintains cleaving activity even with 3-5 mismatches at the PAM-distal end of the gRNA molecule (CONG ET AL., 2013; HSU ET AL., 2013; L. LIU ET AL., 2017). Defective off-target binding and cleaving can result in collateral mutagenesis induced by the error-prone repair of DSB by NHEJ (CHO ET AL., 2014; FU ET AL., 2013). Harmful consequences can arise from off-target mutations, such as activation of oncogenes or silencing of tumour suppressor genes (BRUNET ET AL., 2009). New CRISPR variants that minimise off-target effects will be discussed in the next chapter.

Some aspects of HDR of DSBs can also impair CRISPR's efficiency. For precise gene editing with CRISPR to be a reliable therapeutic alternative, HDR needs to be the main repair mechanism after Cas9-mediated cleavage. Due to the low rate of HDR recombination (Y. WU ET AL., 2013), and because it is only readily available in dividing cells (HEYER ET AL., 2010; ORTHWEIN ET AL., 2015), this method needs to become more robust and flexible in order to see use in disease therapy. Techniques like synchronisation of cell cycle and use of repair templates of single-stranded oligonucleotide DNA (S. LIN ET AL., 2014), or inhibiting the NHEJ pathway (MARUYAMA ET AL., 2015) have shown to be useful as means of increasing the efficiency of HDR after Cas9 cleavage. Researchers have also developed a homology-independent targeted integration (HITI) strategy as an alternative to HDR, a technique that allows DNA

integration in both dividing and non-dividing cells *in vitro* and *in vivo* (HE ET AL., 2016; SUZUKI ET AL., 2016).

8. Novel and enhanced CRISPR/Cas systems

With the aforementioned limitations in minds, researchers have made efforts to improve upon CRISPR systems in order to develop their specificity, efficiency and consistency even further.

8.1. Cas12a (Cpf1)

As established previously (See *Interference*), type V Cas12a shares some similarities to Cas9 in the sense that it depends only on RNA molecules to originate DSBs, and therefore is classified as a Class 2 CRISPR system (FONFARA ET AL., 2016; SHMAKOV ET AL., 2015). However, in contrast to Cas9, it requires only a crRNA molecule to guide it towards its target, in contrast with the crRNA:tracrRNA dual guide of Cas9; and the resulting DSBs are staggered cuts with 5-nt 5'-overhangs as opposed to the blunt cuts generated by Cas9 (ZETSCHE ET AL., 2015). Furthermore, while Cas9 enzymes recognise G-rich PAMs, Cas12a preferably links to targets with T-rich PAM sites, this range of recognisable PAMs having increased lately thanks to engineered versions of Cas12a (GAO ET AL., 2017). Additional advantages of Cas12a over Cas9 are the fact that it has lower mismatch tolerance, reducing off-target effects (D. KIM ET AL., 2016); and Cas12a can process its own crRNA through RNase III activity, thus facilitating multiplex gene editing, as one pre-crRNA template can be delivered to the cell where it is subsequently cleaved by Cas12a into various crRNA molecules targeting different genes (ZETSCHE ET AL., 2016). The overhangs left after Cas12a cleaves the target DNA also facilitate HDR, as staggered cuts are preferably repaired through this mechanism rather than NHEJ (BOTHMER ET AL., 2017). Cas12a variants from *Acidaminococcus sp. BV316* and *Lachnospiraceae bacterium ND2006*, AsCpf1 and LbCpf1, correspondingly, display similar on-target efficiency to SpCas9 in human cells (KLEINSTIVER, TSAI, ET AL., 2016).

8.2. Cas13a (C2c2)

The most recent addition to the CRISPR family is particularly unique in comparison to its counterparts. Although type VI Cas13a is also a class 2 CRISPR system, it has the ability to cleave exclusively RNA through the activity of two HEPN domains (ABUDAYYEH ET AL., 2016), in contrast with the DNA cleaving ability of Cas9 and Cas12a. It shares with Cas12a the ability to process its own crRNA, which enables the targeting of multiple loci with one pre-crRNA

template (ABUDAYYEH ET AL., 2017). The RNA-cleaving properties of Cas13a can be harnessed for post-transcriptional repression, with comparable efficiency to RNA interference (RNAi) methods of RNA silencing (ELBASHIR ET AL., 2001; JACKSON ET AL., 2003), albeit with more specificity and the ability to cleave nuclear transcripts, that is minimal with RNAi (ABUDAYYEH ET AL., 2017). Due to alternative splicing, the transcription of one DNA sequence results in various splicing isoforms, which means that by targeting DNA with CRISPR systems all mRNA isoforms are affected. By using Cas13a, it is possible to target specifically a single isoform to study its function or interfere with its effect without hampering the activity of the other isoforms (MAHAS ET AL., 2018). Cas13a can also target pre-mRNA, which can be useful in diseases caused by mis-splicing (SCOTTI AND SWANSON, 2016), since the enzyme can act before the defective splicing occurs. However, Cas13a demonstrated indiscriminate RNA cleaving ability (EAST-SELETSKY ET AL., 2016), which could hinder its usefulness as a therapeutic agent. In a turn of events, a recent study found no such effects when the *Leptotrichia wadei* variant, LwaCas13a, was used in mammalian cells (ABUDAYYEH ET AL., 2017), implying that this collateral effect is absent or undetectable in eukaryotic cells.

8.3. Cas9n

In situations where gene knockouts are not in order, the NHEJ pathway serves no other purpose than to hinder the repair of DSB by the desired HDR mechanism. As previously stated (see *Repurposing CRISPR for genetic engineering*), by introducing a specific mutation in the RuvC domain of Cas9, a Cas9 nickase variant, Cas9n, is produced (CONG ET AL., 2013; JINEK ET AL., 2012). Single nicked DNA is preferably repaired through base excision repair (DIANOV AND HUBSCHER, 2013), thus Cas9n can be used to improve the efficiency of the process by reducing the number of indel mutations resulting from unwanted NHEJ repairs. In addition, nickases can be employed to further increase the specificity of Cas9-directed genome editing. Scientists engineered a double nicking scheme featuring a pair of Cas9n targeting opposite strands where neighbouring gRNA targets are offset by a certain number of base pairs (MALI ET AL., 2013). The pairing of Cas9n systems results in DSBs with gRNA-defined overhangs, which can lead to highly specific gene edits when combined with HDR, or originate precise deletions in critical alleles through NHEJ (REN ET AL., 2014; SHEN ET AL., 2014). Double nicking dramatically increases specificity, since even if one of Cas9n acts off-target the resulting nick is easily repaired through high-fidelity BER (DIANOV AND HUBSCHER, 2013), unlike wild-type Cas9 where the blunt off-target DSB can result in undesired mutations when repaired by the NHEJ pathway. However, this method has the drawback of requiring the simultaneous design and delivery of two distinct gRNA molecules.

8.4. eSpCas9, SpCas9-HFI, and HypaCas9

A distinct approach to improve CRISPR targeting specificity relies on the modification of the interactions between the Cas9 system and the bound DNA strands. SLAYMAKER ET AL. entertained the possibility that Cas9 cleavage is more efficient when the separation of the target and non-target strands is stable, so undermining this separation in unwanted targets would reduce off-target effects (SLAYMAKER ET AL., 2016). Upon binding of *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) to the target site, a stable strand separation is maintained through two kinds of interactions: the binding of gRNA to the target strand, and a positively-charged groove resulting from the unspecific interaction of both HNH and RuvC domains with the negatively-charged non-target strand (NISHIMASU ET AL., 2015). Weakening the interactions on the non-target strand by reducing positive charges potentiates the re-hybridization between the target and non-target strand. Off-target effects are therefore reduced since rigorous base pairing between gRNA and the target DNA is required in order to maintain a stable separation of the target and non-target strands. To weaken groove interactions, scientists engineered SpCas9 mutants with a substitution of a single positively-charged amino acid residue, from which resulted two “enhanced specificity” SpCas9 variants (eSpCas9(1.0) and eSpCas9(1.1)), which displayed similar on-target efficiency to WT SpCas9 while having significantly lower levels of off-target cleavage.

Focusing also on the binding between Cas9 and the target locus, KLEINSTIVER ET AL. developed the high-fidelity SpCas9-HFI, a variant that produced undetectable genome-wide off-target cleavage (KLEINSTIVER, PATTANAYAK, ET AL., 2016). However, instead of disrupting the non-target strand interactions, Kleinstiver and his colleagues modified four SpCas9 residues that formed hydrogen bonds with the phosphate backbone of the target strand, therefore impairing gRNA binding to DNA targets in the presence of any mismatches. Alanine substitutions in all four residues originated SpCas9-HFI, which along with eSpCas9 also showed comparable on-target activity with WT SpCas9, without impactful off-target effects.

Most recently, CHEN ET AL. utilised single-molecule Förster resonance energy transfer (smFRET) to find out how SpCas9-HFI and eSpCas9(1.1) differentiate between targets (J. S. CHEN ET AL., 2017). Throughout their research, scientists found that SpCas9-HFI and eSpCas9(1.1) halt in an inactive conformation after they bind to mismatched sequences. Furthermore, they characterised the functions of REC3, a non-catalytic domain of Cas9 that regulates target complementarity and HNH catalytic activity. Using this newfound knowledge, they induced mutations in the REC3 domain, originating a hyper-accurate Cas9 variant

(HypaCas9) with the same on-target efficacy as WT Cas9 and similar or improved specificity when compared with SpCas9-HFI or eSpCas9(1.1).

9. Delivering CRISPR systems into the cell

One of the most important elements for CRISPR to work is the successful delivery of these systems to the cells that are meant to be altered. Different strategies and techniques have been developed and employed, some with better outcomes for *in vitro* or *in vivo* research applications, and others which yield more auspicious results for therapeutic and clinical uses.

Traditional physical methods such as microinjection (CRISPO ET AL., 2015; HORII ET AL., 2014) or electroporation (KANEKO ET AL., 2014; VÉRON ET AL., 2015) have been successfully used with CRISPR to engineer embryonic stem cells and zygotes that later originate genetically modified animals. However, microinjection is an intrusive method that can damage the cell and requires the individual injection of each cell, thus constituting a laborious and time-consuming task (Y. ZHANG AND YU, 2008); and although electroporation is less invasive and allows for the editing of multiple cells at the same time (KANEKO ET AL., 2014), both techniques are only suitable for *in vitro* use. Hydrodynamic injection is another physical means of gene delivery that has been used to modify liver cells with CRISPR *in vivo* (XUE ET AL., 2014; YIN ET AL., 2014). Even though said techniques are widely used in research labs, these shortcomings combined with low efficiency limit their use in human gene therapy (KAMIMURA ET AL., 2011; VALSALAKUMARI ET AL., 2013).

Viral vectors compose a versatile means of delivery with diverse *in vitro* and *in vivo* practical applications depending on the chosen vector. For example, adeno-associated viral (AAV) vectors have been used in a dual-cassette system as a way of delivering up to three plasmid- incorporated sgRNAs to the same cell to study gene function *in vivo* by multiplex gene editing (SWIECH ET AL., 2015) or to create disease models (PLATT ET AL., 2014). Due to the different tissue tropism of each AAV serotype, the encapsulated systems can easily be directed towards the tissue of interest by choosing the serotype that better suits the experiment (ZINCARELLI ET AL., 2008). Genome-wide screening of gene function is another use for viral vectors, through lentiviral gRNA libraries (KOIKE-YUSA ET AL., 2014; SHALEM ET AL., 2014). Viral vectors are one of the main means of gene therapy delivery in clinical trials (The Journal of Gene Medicine, 2017), though their utility and great efficiency might be hindered by several factors, such as immunogenicity, limited insertion capacity (AAV), carcinogenesis

(mainly lenti- and retroviruses), and off-target effects (lentiviruses) (BIASCO ET AL., 2012; HOLKERS ET AL., 2014; SOMIA AND VERMA, 2000; Z. WU ET AL., 2010).

Recently developed non-viral vectors have shown promising uses as fitting alternatives to viral and physical methods. As an example for *in vitro* and *ex vivo*, cell-penetrating peptides (CPP), conjugated with Cas9 and complexed with gRNA enabled efficient gene silencing in human cell lines and disease models featuring fewer off-target effects when compared to plasmid transfection (RAMAKRISHNA ET AL., 2014; SURESH ET AL., 2017). Another prospect for *in vitro* and *ex vivo* CRISPR delivery is through cationic arginine gold nanoparticles (ArgNPs) with engineered Cas9 systems, enhancing the cytosolic delivery of Cas9-gRNA, with an editing efficiency of 30% (MOUT ET AL., 2017). As for *in vivo*, DNA-conjugated gold nanoparticles complexed with endosomal disruptive polymers were used to deliver Cas9, gRNA, and a DNA template to treat Duchenne muscular dystrophy in mice through homology-directed repair, by correcting the mutation that causes this congenital myopathy (LEE ET AL., 2017). Lipid nanoparticles (LNP) are another way to tackle the delivery of CRISPR systems to the cells, with the advantages of being biodegradable and well tolerated. One of such LNP-mediated delivery systems, LNP-INT01, was used with CRISPR to repair the mutated *Ttr* gene that causes transthyretin (TTR)-mediated amyloidosis due to the accumulation of amyloid proteins (FINN ET AL., 2018). A single dose of LNP-INT01 achieved a reduction of more than 97% in serum TTR.

10. Applications of CRISPR-Cas systems

The versatility and ease of use of the CRISPR methodology, combined with the constant developments to mitigate its flaws, have gathered the attention of researchers from all fields of science who look for ways in which they can use CRISPR to improve and hasten their scientific endeavours.

10.1. Oncology

CRISPR can be used to dissect the diverse genetic and epigenetic factors that are involved in cancer and tumorigenesis. Through HDR- or NHEJ-mediated silencing or knock-in of oncogenes and tumour suppressor genes *in vitro*, *ex vivo*, or *in vivo*, researchers have used CRISPR systems to create cell lines and animal models of certain types of cancer (PLATT ET AL., 2014; XUE ET AL., 2014) as well as to study the impact of specific genes on the progression of the disease (S. CHEN ET AL., 2016; MATANO ET AL., 2015). Therapeutic uses for CRISPR in cancer

disease are also being researched. As an example, *in vivo* CRISPR-mediated knockout of *NANOG* and *NANOGP8*, genes involved in prostate cancer, resulted in a decrease of tumorigenic potential in mice (KAWAMURA ET AL., 2015). Another example is the knockout of *MDR1* in osteosarcoma cells with Cas9, which reduced cell resistance to chemotherapeutic agents (T. LIU ET AL., 2016). Clinical trials using CRISPR as a therapeutic agent in cancer are currently underway. In China, researchers from Sichuan University are studying the use of CRISPR-Cas9 for *ex vivo* engineering of autologous human T-cells, as a treatment for metastatic lung cancer (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02793856). In the United States of America, another clinical trial based on CRISPR-mediated editing of human T-cells is set to start in 2018, focusing on the treatment of multiple myeloma, sarcoma and melanoma patients (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03399448).

10.2. Genetic Diseases

The correction of diseases arising from genetic aberrations is one of the most obvious use cases for CRISPR methodologies, due to its ability to produce specific changes in the genome. This includes diseases like cystic fibrosis, caused by a mutation in the *CFTR* gene (KEREM ET AL., 1989), or sickle cell disease, prompted by inheriting two dysfunctional copies of the β -globin (*HBB*) gene, where at least one of those expresses the sickle hemoglobin (HbS) mutation (STEINBERG AND SEBASTIANI, 2012). These inheritable and chronic diseases shorten the life expectancy and quality of life of the carriers (LANZKRON ET AL., 2013; RATJEN AND DÖRING, 2003), and can only be attenuated by symptomatic treatments, since the only potential cure available at the moment is stem cell transplant for sickle cell disease (ÖZDOĞU AND BOĞA, 2015). Using CRISPR, researchers were able to correct mutant intestinal stem cells from cystic fibrosis patients and restore their function *in vitro* (SCHWANK ET AL., 2013), providing the first step to advance gene therapy in cystic fibrosis patients with CRISPR. Sickle cell disease has also seen promising breakthroughs, Li and colleagues having successfully corrected the disease-causing mutations in pluripotent stem cells with HDR-mediated Cas9 activity, without noticeable off-target effects (C. LI ET AL., 2016). Clinical trial applications for treatment of sickle cell disease using CRISPR/Cas9 systems have already been submitted, and the clinical trials are set to start in 2018 (“Vertex and CRISPR Therapeutics”, 2017).

10.3. Viral Diseases

CRISPR systems can be employed to combat viral diseases by disrupting the viral replication mechanisms and restoring the infected cell to normality. Cas9 has been used to target conserved regions of the hepatitis B virus (HBV), which are responsible for virus

persistence and replication and are not directly targeted by current anti-viral therapies (ZEISEL ET AL., 2015). With Cas9, several research groups targeted this core region of HBV genome, both *in vivo* and *in vitro*, successfully suppressing the virus with significant and long-lasting reductions in viral load and antigen production, which are related to the severity of the disease (KENNEDY ET AL., 2015; S. R. LIN ET AL., 2014). Researchers have also eradicated HIV-1 from human CD4+ T-cells, by removing parts of its integrated genome using Cas9 (KAMINSKI ET AL., 2016). Interestingly, the cured cells were also less susceptible to future infection by HIV-1. CRISPR/Cas13a systems also emerge as an answer to RNA viruses do their capacity to cleave RNA molecules, although due to its novelty ongoing research still focuses on identifying the most potent and specific Cas13 variants (COX ET AL., 2017; MAHAS AND MAHFOUZ, 2018)

10.4. Bacterial Infections

The emergence of antimicrobial-resistant bacteria is one of the most concerning aspects for public health specialists nowadays. Misuse and overuse of antibiotics have led to an increasing number of multidrug-resistant strains (THABIT ET AL., 2015), urging the need for new ways to fight back bacterial infections. CRISPR systems might be an alternative or a tool to use in combination with conventional antibiotics, either by disabling antibiotic-resistance genes or by developing toxicity in bacteria through the cleavage of crucial domains of their genome. With CRISPR/Cas9, CITORIK ET AL. targeted chromosomal sequences that enabled virulence in enterohemorrhagic *E. coli* strains (CITORIK ET AL., 2014), using larvae of *Galleria mellonella* (wax moth) as an intestinal infection model. Treatment with Cas9 improved survival and was more effective than treatment with chloramphenicol, an antibiotic to which the *E. coli* strain was resistant. A different research group focused on reprogramming CRISPR to target virulence genes in *Staphylococcus aureus* (BIKARD ET AL., 2014). In an *in vivo* skin colonization model of *S. aureus* infection, treatment with CRISPR resulted in a significant reduction of antibiotic-resistant bacteria. Both experiments also highlight the specificity of CRISPR as a useful aspect in the treatment of bacterial infections, since it acts selectively on virulent bacteria without disturbing the neighbouring bacterial flora.

10.5. Crop Industry

Diseases are not the only application for the newfound CRISPR technology, with many industry fields experimenting with CRISPR systems to come up with new methodologies and techniques. One such field is crop science, where researchers consistently breed new varieties of plants to improve agricultural output, confer resistance to certain pathogens, or change specific traits like fruit size. Crop engineering with CRISPR is already in motion, with

researchers developing cucumbers with broad virus resistance without affecting plant development (CHANDRASEKARAN ET AL., 2016), improving the yield of maize crops under drought stress (SHI ET AL., 2017), or for the generation of seedless tomatoes (UETA ET AL., 2017). The ease of use and precise editing provided by CRISPR systems will reduce costs and breeding time in crop engineering, improving over genome editing technologies (JAGANATHAN ET AL., 2018).

II. Conclusion

Gene editing techniques have been around for over forty years, yet the limitations affecting their use are still significant in several fields of science. Ethical issues are one of the key concerns among the scientific community, mainly due to the harmful consequences that can result from the genetic manipulation of human and animal germlines. The insufficient precision and efficiency of currently available techniques are also two of the main deterrents against a more widespread use of genetic manipulation.

With this in mind, CRISPR-Cas systems seem to be rapidly changing the landscape of the genetic engineering field. Although initial Cas systems used for genetic engineering were more efficient and by far simpler than methods such as TALENs and ZFNs, their relatively low specificity and presence of off-target effects meant that they were still not the perfect tool for genetic manipulation.

However, new variants with improved precision and reduced off-target effects while maintaining the original efficiency have been developed, meaning that the main limitation of these systems has been offset. The applicability of CRISPR-Cas systems is yet to be seen on a larger scale, but the results of the upcoming clinical trials using this technology might kick-start a new CRISPR “fever”, leading CRISPR-systems to mainstream use.

12. Bibliography

- ABUDAYYEH, O. O., GOOTENBERG, J. S., ESSLETZBICHLER, P., HAN, S., JOUNG, J., BELANTO, J. J., VERDINE, V., COX, D. B. T., KELLNER, M. J., REGEV, A., LANDER, E. S., VOYTAS, D. F., TING, A. Y., ZHANG, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280-284
- ABUDAYYEH, O. O., GOOTENBERG, J. S., KONERMANN, S., JOUNG, J., SLAYMAKER, I. M., COX, D. B. T., SHMAKOV, S., MAKAROVA, K. S., SEMENOVA, E., MINAKHIN, L., SEVERINOV, K., REGEV, A., LANDER, E. S., KOONIN, E. V., ZHANG, F. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 353(6299), aaf5573
- AMABILE, A., MIGLIARA, A., CAPASSO, P., BIFFI, M., CITTARO, D., NALDINI, L., LOMBARDO, A. (2016). Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell*, 167(1), 219–232.e14.
- ANDERS, C., NIEWOEHNER, O., DUERST, A., JINEK, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573.
- BABU, M., BELOGLAZOVA, N., FLICK, R., GRAHAM, C., SKARINA, T., NOCEK, B., GAGARINOVA, A., POGOUTSE, O., BROWN, G., PHANSE, S., JOACHIMIAK, A., KOONIN, E. V., EMILI, A., GREENBLATT, J., EDWARDS, A. M., YAKUNIN, A. F. (2012). A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair, 79(2), 484–502.
- BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H., RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D. A., HORVATH, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
- BARRANGOU, R., MARRAFFINI, L. A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244.
- BEERLI, R. R., DREIER, B., BARBAS 3RD, C. F. (2000). Positive and negative regulation of endogenous genes by designed transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1495–1500.
- BENNARDO, N., GUNN, A., CHENG, A., HASTY, P., STARK, J. M. (2009). Limiting the persistence of a chromosome break diminishes its mutagenic potential. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000683
- BIASCO, L., BARICORDI, C., AIUTI, A. (2012). Retroviral integrations in gene therapy trials. *Molecular Therapy*, 20(4), 709–716.
- BIBIKOVA, M., GOLIC, M., GOLIC, K. G., CARROLL, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage

and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, *161*(3), 1169–1175.

BIKARD, D., EULER, C., JIANG, W., NUSSENZWEIG, P. M., GOLDBERG, G. W., DUPORETET, X., FISCHETTI, V. A., MARRAFFINI, L. A. (2014). Development of sequence-specific antimicrobials based on programmable CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1146–1150.

BIKARD, D., JIANG, W., SAMAI, P., HOCHSCHILD, A., ZHANG, F., MARRAFFINI, L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, *41*(15), 7429–7437.

BOCH, J., SCHOLZE, H., SCHORNACK, S., LANDGRAF, A., HAHN, S., KAY, S., LAHAYE, T., NICKSTADT, A., BONAS, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, *326*(5959), 1509–1512.

BOTHMER, A., PHADKE, T., BARRERA, L. A., MARGULIES, C. M., LEE, C. S., BUQUICCHIO, F., MOSS, S., ABDULKERIM, H. S., SELLECK, W., JAYARAM, H., MYER, V. E., COTTA-RAMUSINO, C. (2017). Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus. *Nature Communications*, *8*, 1–12.

BROUNS, S. J. J., JORE, M. M., LUNDGREN, M., WESTRA, E. R., SLIJKHUIS, R. J. H., SNIJDERS, A. P. L., DICKMAN, M. J., MAKAROVA, K. S., KOONIN, E. V., VAN DER OOST, J. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, *321*(5891), 960–964.

BRUNET, E., SIMSEK, D., TOMISHIMA, M., DEKELVER, R., CHOI, V. M., GREGORY, P., URNOV, F., WEINSTOCK, D. M., JASIN, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Pnas*, *106*(26), 10620–5.

CHANDRASEKARAN, J., BRUMIN, M., WOLF, D., LEIBMAN, D., KLAP, C., PEARLSMAN, M., SHERMAN, A., ARAZI, T., GAL-ON, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1140–1153.

CHEN, J. S., DAGDAS, Y. S., KLEINSTIVER, B. P., WELCH, M. M., SOUSA, A. A., HARRINGTON, L. B., STERNBERG, S. H., JOUNG, J. K., YILDIZ, A., DOUDNA, J. A. (2017). Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, *550*(7676), 407–410.

CHEN, S., SANJANA, N. E., ZHENG, K., SHALEM, O., SHI, X., SCOTT, D. A., SONG, J., PAN, J. Q., WEISSLEDER, R., ZHANG, F., SHARP, P. A. (2016). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, *160*(6), 1246–1260.

CHO, S. W., KIM, S., KIM, Y., KWEON, J., KIM, H. S., BAE, S., KIM, J. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome research*,

24(1). 132-41.

CHRISTIAN, M., CERMAK, T., DOYLE, E. L., SCHMIDT, C., ZHANG, F., HUMMEL, A., BOGDANOVA, A. J., VOYTAS, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 756–761.

CHYLINSKI, K., LE RHUN, A., CHARPENTIER, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5), 726–737.

CHYLINSKI, K., MAKAROVA, K. S., CHARPENTIER, E., KOONIN, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105.

CITORIK, R. J., MIMEE, M., LU, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*, 32(11). 1141-1145.

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W., HELLING, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240–3244.

CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., ... GUSCHIN, D. Y. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121). 819-823.

COX, D. B. T., GOOTENBERG, J. S., ABUDAYYEH, O. O., FRANKLIN, B., KELLNER, M. J., JOUNG, J., ZHANG, F. (2017). RNA editing with CRISPR-Cas13 David. *Science*, 0180, 1–15.

CRISPO, M., MULET, A. P., TESSON, L., BARRERA, N., CUADRO, F., DOS SANTOS-NETO, P. C., NGUYEN, T. H., CRÉNÉGUY, A., BRUSSELLE, L., ANEGÓN, I., MENCHACA, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18.

CRISTEA, S., FREYVERT, Y., SANTIAGO, Y., HOLMES, M. C., URNOV, F. D., GREGORY, P. D., COST, G. J. (2013). In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(3), 871–880.

DATSENKO, K. A., POUGACH, K., TIKHONOV, A., WANNER, B. L., SEVERINOV, K., SEMENOVA, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communications*, 3, 945–947.

DELTCHEVA, E., CHYLINSKI, K., SHARMA, C. M., GONZALES, K., CHAO, Y., PIRZADA, Z. A., ECKERT, M. R., VOGEL, J., CHARPENTIER, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607.

- DIANOV, G. L., HÜBSCHER, U. (2013). Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. *Nucleic Acids Research*, 41(6), 3483–3490.
- DING, Q., REGAN, S., XIA, Y., OOSTROM, L., COWAN, C., MUSUNURU, K. (2013). Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem*, 12(4), 393–394.
- DOMINGUEZ, A. A., LIM, W. A., QI, L. S. (2016). Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(1). 5-15.
- DONG, D., REN, K., QIU, X., ZHENG, J., GUO, M., GUAN, X., LIU, H., LI, N., ZHANG, B., YANG, D., MA, C., WANG, S., WU, D., MA, Y., FAN, S., WANG, J., GAO, N., HUANG, Z. (2016). The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 522–526.
- EAST-SELETSKY, A., O'CONNELL, M. R., BURSTEIN, D., KNOTT, G. J., DOUDNA, J. A. (2017). RNA Targeting by Functionally Orthogonal Type VI-A CRISPR-Cas Enzymes. *Molecular Cell*, 66(3). 373-383.e3.
- EAST-SELETSKY, A., O'CONNELL, M. R., KNIGHT, S. C., BURSTEIN, D., CATE, J. H. D., TJIAN, R., DOUDNA, J. A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 538(7624), 270–273.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., TUSCHL, T. (2001). Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836), 494–498.
- ERDMANN, S., GARRETT, R. A. (2012). Selective and hyperactive uptake of foreign DNA by adaptive immune systems of an archaeon via two distinct mechanisms. *Molecular Microbiology*, 85(6), 1044–1056.
- FEINBERG, A. P., KOLDOBSKIY, M. A., GÖNDÖR, A. (2016). Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nature Reviews Genetics*, 17(5). 284-299.
- FINN, J. D., SMITH, A. R., PATEL, M. C., SHAW, L., YOUNISS, M. R., VAN HETEREN, J., DIRSTINE, T., CIULLO, C., LESCARBEAU, R., SEITZER, J., SHAH, R. R., SHAH, A., LING, D., GROWE, J., PINK, M., ROHDE, E., WOOD, K. M., SALOMON, W. E., HARRINGTON, W. F., DOMBROWSKI, C., STRAPPS, W. R., CHANG, Y., MORRISSEY, D. V. (2018). A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Reports*, 22(9), 2455–2468.

- FONFARA, I., RICHTER, H., BRATOVIÄ, M., LE RHUN, A., CHARPENTIER, E. (2016). The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme CpfI also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 517–521.
- FU, Y., FODEN, J. A., KHAYTER, C., MAEDER, M. L., REYON, D., JOUNG, J. K., SANDER, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9). 822-826.
- GAO, L., COX, D. B. T., YAN, W. X., MANTEIGA, J. C., SCHNEIDER, M. W., YAMANO, T., NISHIMASU, H., NUREKI, O., CROSETTO, N., ZHANG, F. (2017). Engineered CpfI variants with altered PAM specificities. *Nature Biotechnology*, 35(8). 789-792.
- GASIUNAS, G., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579–E2586.
- GENEROSO, W. C., GOTTARDI, M., OREB, M., BOLES, E. (2016). Simplified CRISPR-Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 203–205.
- GESNER, E. M., SCHELLENBERG, M. J., GARSIDE, E. L., GEORGE, M. M., MACMILLAN, A. M. (2011). Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(6), 688–692.
- GRISSA, I., VERGNAUD, G., POURCEL, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8, 1–10.
- HATOUM-ASLAN, A., MANIV, I., MARRAFFINI, L. A. (2011). Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 21218–21222.
- HAWKINS, J. S., WONG, S., PETERS, J. M., ALMEIDA, R., QI, L. S. (2015). Targeted transcriptional repression in bacteria using CRISPR interference (CRISPRi). *Methods in Molecular Biology*. 349-362.
- HAYES, R. P., XIAO, Y., DING, F., VAN ERP, P. B. G., RAJASHANKAR, K., BAILEY, S., WIEDENHEFT, B., KE, A. (2016). Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I-E Cascade from *E. coli*. *Nature*, 530(7591), 499–503.
- HE, X., TAN, C., WANG, F., WANG, Y., ZHOU, R., CUI, D., YOU, W., ZHAO, H., REN, J., FENG, B. (2016). Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-

dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Research*, 44(9). e85-e85.

HEYER, W.-D., EHMTEN, K. T., LIU, J. (2010). Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 44(1). 113-139.

HILLE, F., RICHTER, H., WONG, S. P., BRATOVIČ, M., RESEL, S., CHARPENTIER, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239–1259.

HOCKEMEYER, D., WANG, H., KIANI, S., LAI, C. S., GAO, Q., CASSADY, J. P., COST, G. J., ZHANG, L., SANTIAGO, Y., MILLER, J. C., ZEITLER, B., CHERONE, J. M., MENG, X., HINKLEY, S. J., REBAR, E. J., GREGORY, P. D., URNOV, F. D., JAENISCH, R. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*, 29(8), 731–734.

HOLKERS, M., MAGGIO, I., HENRIQUES, S. F. D., JANSSEN, J. M., CATHOMEN, T., GONÇALVES, M. A. F. V. (2014). Adenoviral vector DNA for accurate genome editing with engineered nucleases. *Nature Methods*, 11(10), 1051–1057.

HORII, T., ARAI, Y., YAMAZAKI, M., MORITA, S., KIMURA, M., ITOH, M., ABE, Y., HATADA, I. (2014). Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, 4(2), 1–6.

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. (2013). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–32.

HU, H., XIONG, L. (2014). Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 715–741.

HU, J. H., MILLER, S. M., GEURTS, M. H., TANG, W., CHEN, L., SUN, N., ZEINA, C. M., GAO, X., REES, H. A., LIN, Z., LIU, D. R. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556(7699), 57–63.

ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M., NAKATA, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433.

JACKSON, A. L., BARTZ, S. R., SCHELTER, J., KOBAYASHI, S. V., BURCHARD, J., MAO, M., LI, B., CAVET, G., LINSLEY, P. S. (2003). off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 21(6), 635–638.

JACKSON, S. A., MCKENZIE, R. E., FAGERLUND, R. D., KIEPER, S. N., FINERAN, P. C., BROUNS, S. J. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*, 356(6333). eaal5056.

- JAGANATHAN, D., RAMASAMY, K., SELLAMUTHU, G., JAYABALAN, S., VENKATARAMAN, G. (2018). CRISPR for Crop Improvement: An Update Review. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–17.
- JAO, L.-E., WENTE, S. R., CHEN, W. (2013). Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), 13904–13909.
- JIANG, W., BIKARD, D., COX, D., ZHANG, F., MARRAFFINI, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 31(3), 233-239.
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A., CHARPENTIER, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- JOUNG, J. K., SANDER, J. D. (2013). TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1), 49-55.
- JUILLERAT, A., DUBOIS, G., VALTON, J., THOMAS, S., STELLA, S., MARÉCHAL, A., LANGEVIN, S., BENOMARI, N., BERTONAT, C., SILVA, G. H., DABOUSSI, F., EPINAT, J. C., MONTROYA, G., DUCLERT, A., DUCHATEAU, P. (2014). Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Research*, 42(8), 5390–5402.
- KAMIMURA, K., SUDA, T., ZHANG, G., LIU, D. (2011). Advances in gene delivery systems. *Pharmaceutical Medicine*, 25(5), 293–306.
- KAMINSKI, R., CHEN, Y., FISCHER, T., TEDALDI, E., NAPOLI, A., ZHANG, Y., KARN, J., HU, W., KHALILI, K. (2016). Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Scientific Reports*, 6, 1–14.
- KANEKO, T., SAKUMA, T., YAMAMOTO, T., MASHIMO, T. (2014). Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Scientific Reports*, 4, 1–5.
- KAWAMURA, N., NIMURA, K., NAGANO, H., YAMAGUCHI, S., NONOMURA, N., KANEDA, Y. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(26), 22361–74.
- KAZLAUSKIENE, M., KOSTIUK, G., VENCLOVAS, Č., TAMULAITIS, G., SIKSNYS, V. (2017). A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems. *Science*, 357(6351), 605–609.
- KAZLAUSKIENE, M., TAMULAITIS, G., KOSTIUK, G., VENCLOVAS, Č., SIKSNYS, V. (2016). Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with

the Target RNA Recognition. *Molecular Cell*, 62(2), 295–306.

KENNEDY, E. M., BASSIT, L. C., MUELLER, H., KORNEPATI, A. V. R., BOGERD, H. P., NIE, T., CHATTERJEE, P., JAVANBAKHT, H., SCHINAZI, R. F., CULLEN, B. R. (2015). Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology*, 476. 196-205.

KEREM, B., ROMMENS, J. M., BUCHANAN, J. A., MARKIEWICZ, D., COX, T. K., CHAKRAVARTI, A., BUCHWALD, M., TSUI, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1073–80.

KIM, D., KIM, J., HUR, J. K., BEEN, K. W., YOON, S. H., KIM, J. S. (2016). Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34(8), 863–868.

KIM, Y. B., KOMOR, A. C., LEVY, J. M., PACKER, M. S., ZHAO, K. T., LIU, D. R. (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 35(4). 371-376.

KIM, Y. G., CHA, J., CHANDRASEGARAN, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156–1160.

KLEINSTIVER, B. P., PATTANAYAK, V., PREW, M. S., TSAI, S. Q., NGUYEN, N., ZHENG, Z., JOUNG, J. K., UNIT, P., BIOLOGY, I., HOSPITAL, M. G., KONG, H. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 variants with undetectable genome-wide off-targets. *Nature*, 529(7587), 490–495.

KLEINSTIVER, B. P., TSAI, S. Q., PREW, M. S., NGUYEN, N. T., WELCH, M. M., LOPEZ, J. M., MCCAW, Z. R., ARYEE, M. J., JOUNG, J. K. (2016). Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34(8). 869-874.

KOIKE-YUSA, H., LI, Y., TAN, E. P., VELASCO-HERRERA, M. D. C., YUSA, K. (2014). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nature Biotechnology*, 32(3), 267–273.

KOMOR, A. C., KIM, Y. B., PACKER, M. S., ZURIS, J. A., LIU, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 533(7603). 420-424.

KOMOR, A. C., ZHAO, K. T., PACKER, M. S., GAUDELLI, N. M., WATERBURY, A. L., KOBLAN, L. W., KIM, Y. B., BADRAN, A. H., LIU, D. R. (2017). Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and

product purity. *Science Advances*, 3(8), 1–9.

KONERMANN, S., BRIGHAM, M. D., TREVINO, A. E., JOUNG, J., ABUDAYYEH, O. O., BARCENA, C., HSU, P. D., HABIB, N., GOOTENBERG, J. S., NISHIMASU, H., NUREKI, O., ZHANG, F. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517(7536), 583-588.

LANZKRON, S., CARROLL, C. P., HAYWOOD, C., JR. (2013). Mortality rates and age at death from sickle cell disease: U.S., 1979-2005. *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)*, 128(2), 110–6.

LEE, K., CONBOY, M., PARK, H. M., JIANG, F., KIM, H. J., DEWITT, M. A., MACKLEY, V. A., CHANG, K., RAO, A., SKINNER, C., SHOBHA, T., MEHDIPOUR, M., LIU, H., HUANG, W. C., LAN, F., BRAY, N. L., LI, S., CORN, J. E., KATAOKA, K., DOUDNA, J. A., CONBOY, I., MURTHY, N. (2017). Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, 1(11), 889-901.

LI, C., DING, L., SUN, C. W., WU, L. C., ZHOU, D., PAWLIK, K. M., KHODADADI-JAMAYRAN, A., WESTIN, E., GOLDMAN, F. D., TOWNES, T. M. (2016). Novel HDAd/EBV Reprogramming Vector and Highly Efficient Ad/CRISPR-Cas Sickle Cell Disease Gene Correction. *Scientific Reports*, 6, 1–10.

LI, K., WANG, G., ANDERSEN, T., ZHOU, P., PU, W. T. (2014). Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9(8), e105779.

LIN, S. R., YANG, H. C., KUO, Y. T., LIU, C. J., YANG, T. Y., SUNG, K. C., LIN, Y. Y., WANG, H. Y., WANG, C. C., SHEN, Y. C., WU, F. Y., KAO, J. H., CHEN, D. S., CHEN, P. J. (2014). The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3, e186.

LIN, S., STAAHL, B. T., ALLA, R. K., DOUDNA, J. A. (2014). Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *ELife*, 3, e04766.

LIU, L., LI, X., MA, J., LI, Z., YOU, L., WANG, J., WANG, M., ZHANG, X., WANG, Y. (2017). The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell*, 170(4), 714–726.e10.

LIU, Q., SEGAL, D. J., GHIARA, J. B., BARBAS, C. F. (1997). Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5525–5530.

LIU, T., SHEN, J. K., LI, Z., CHOY, E., HORNICEK, F. J., DUAN, Z. (2016). Development and potential

applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma. *Cancer Letters* 373(1). 109-118.

LIU, X., HOMMA, A., SAYADI, J., YANG, S., OHASHI, J., TAKUMI, T. (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6, 1–9.

LO, A., QI, L. (2017). Genetic and epigenetic control of gene expression by CRISPR–Cas systems. *Fl000Research*, 6, 747.

MAHAS, A., MAHFOUZ, M. (2018). Engineering virus resistance via CRISPR–Cas systems. *Current Opinion in Virology*, 32, 1–8.

MAHAS, A., NEAL STEWART, C., MAHFOUZ, M. M. (2018). Harnessing CRISPR/Cas systems for programmable transcriptional and post-transcriptional regulation. *Biotechnology Advances*, 36(1), 295–310.

MAKAROVA, K. S., GRISHIN, N. V., SHABALINA, S. A., WOLF, Y. I., KOONIN, E. V. (2006). 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*, 1, 1–26.

MAKAROVA, K. S., WOLF, Y. I., ALKHNABASHI, O. S., COSTA, F., SHAH, S. A., SAUNDERS, S. J., BARRANGOU, R., BROUNS, S. J. J., CHARPENTIER, E., HAFT, D. H., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA, F. J. M., TERNS, R. M., TERNS, M. P., WHITE, M. F., YAKUNIN, A. F., GARRETT, R. A., VAN DER OOST, J., BACKOFEN, R., KOONIN, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722–736.

MALI, P., AACH, J., STRANGES, P. B., ESVELT, K. M., MOOSBURNER, M., KOSURI, S., YANG, L., CHURCH, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9). 833-838

MARRAFFINI, L. A., SONTHEIMER, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3). 181-190.

MARUYAMA, T., DOUGAN, S. K., TRUTTMANN, M. C., BILATE, A. M., INGRAM, J. R., PLOEGH, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*, 33(5). 538-542.

MATANO, M., DATE, S., SHIMOKAWA, M., TAKANO, A., FUJII, M., OHTA, Y., WATANABE, T., KANAI, T., SATO, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine*, 21(3), 256–262.

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. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2), 143–150.

MOJICA, F. J. M., DíEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., ALMENDROS, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733–740.

MOORE, J. K., HABER, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5), 2164–2173.

MOUT, R., RAY, M., YESILBAG TONGA, G., LEE, Y. W., TAY, T., SASAKI, K., ROTELLO, V. M. (2017). Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein for Efficient Gene Editing. *ACS Nano*, 11(3), 2452–2458.

MULEPATI, S., BAILEY, S. (2013). In vitro reconstitution of an *Escherichia coli* RNA-guided immune system reveals unidirectional, ATP-dependent degradation of DNA Target. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), 22184–22192.

NIWEOEHNER, O., GARCIA-DOVAL, C., ROSTØL, J. T., BERK, C., SCHWEDE, F., BIGLER, L., HALL, J., MARRAFFINI, L. A., JINEK, M. (2017). Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature* 548(7669). 543-548.

NIWEOEHNER, O., JINEK, M., DOUDNA, J. A. (2014). Evolution of CRISPR RNA recognition and processing by Cas6 endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 42(2), 1341–1353.

NISHIMASU, H., RAN, F. A., HSU, P. D., KONERMANN, S., SHEHATA, S., DOHMAE, N., ISHITANI, R., ZHANG, F., NUREKI, O. (2015). Crystal Structure of Cas9 in Complex with gRNA and target DNA, 156(5), 935–949.

NIU, Y., SHEN, B., CUI, Y., CHEN, Y., WANG, J., WANG, L., KANG, Y., ZHAO, X., SI, W., LI, W., XIANG, A. P., ZHOU, J., GUO, X., BI, Y., SI, C., HU, B., DONG, G., WANG, H., ZHOU, Z., LI, T., TAN, T., PU, X., WANG, F., JI, S., ZHOU, Q., HUANG, X., JI, W., SHA, J. (2014). Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 156(4), 836–843.

NUÑEZ, J. K., HARRINGTON, L. B., KRANZUSCH, P. J., ENGELMAN, A. N., DOUDNA, J. A. (2015). Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 527(7579), 535–538.

- NUÑEZ, J. K., KRANZUSCH, P. J., NOESKE, J., WRIGHT, A. V., DAVIES, C. W., DOUDNA, J. A. (2014). Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6), 528–534.
- NUÑEZ, J. K., LEE, A. S. Y., ENGELMAN, A., DOUDNA, J. A. (2015). Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 519(7542), 193–198.
- ORLANDO, S. J., SANTIAGO, Y., DEKELVER, R. C., FREYVERT, Y., BOYDSTON, E. A., MOEHLE, E. A., CHOI, V. M., GOPALAN, S. M., LOU, J. F., LI, J., MILLER, J. C., HOLMES, M. C., GREGORY, P. D., URNOV, F. D., COST, G. J. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Research*, 38(15), 1–15.
- ORTHWEIN, A., NOORDERMEER, S. M., WILSON, M. D., LANDRY, S., ENCHEV, R. I., SHERKER, A., MUNRO, M., PINDER, J., SALSMAN, J., DELLAIRE, G., XIA, B., PETER, M., DUROCHER, D. (2015). A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature*, 528(7582), 422–426.
- OSAWA, T., INANAGA, H., SATO, C., NUMATA, T. (2015). Crystal structure of the crispr-cas RNA silencing cmr complex bound to a target analog. *Molecular Cell*, 58(3), 418–430.
- ÖZDOĞU, H., BOĞA, C. (2015). Erişkin orak hücre hastalığında hematopoietik kök hücre nakli: Problemler ve çözüm önerileri. *Turkish Journal of Hematology*, 32(3), 195–205.
- PARDO, B., GÓMEZ-GONZÁLEZ, B., AGUILERA, A. (2009). DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), 1039–1056.
- PENNISI, E. (2013). The CRISPR craze. *Science*, 341(6148), 833–836.
- PLATT, R. J., CHEN, S., ZHOU, Y., YIM, M. J., SWIECH, L., KEMPTON, H. R., DAHLMAN, J. E., PARNAS, O., EISENHAURE, T. M., JOVANOVIC, M., GRAHAM, D. B., JHUNJHUNWALA, S., HEIDENREICH, M., XAVIER, R. J., LANGER, R., ANDERSON, D. G., HACOEN, N., REGEV, A., FENG, G., SHARP, P. A., ZHANG, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 159(2), 440–455.
- PUL, Ü., WURM, R., ARSLAN, Z., GEIBEN, R., HOFMANN, N., WAGNER, R. (2010). Identification and characterization of E. coli CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, 75(6), 1495–1512.
- QI, L. S., LARSON, M. H., GILBERT, L. A., DOUDNA, J. A., WEISSMAN, J. S., ARKIN, A. P., LIM, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene

expression. *Cell*, 152(5), 1173–1183.

RAMAKRISHNA, S., KWAKU DAD, A. B., BELOOR, J., GOPALAPPA, R., LEE, S. K., KIM, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*, 24(6), 1020–1027.

RAN, F. A., HSU, P. D. P., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D. A., ZHANG, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308.

RATJEN, F., DÖRING, G. (2003). Cystic fibrosis. *The Lancet*, 361(9358), 681–689.

REDDING, S., STERNBERG, S. H., MARSHALL, M., GIBB, B., BHAT, P., GUEGLER, C. K., WIEDENHEFT, B., DOUDNA, J. A., GREENE, E. C. (2015). Surveillance and Processing of Foreign DNA by the Escherichia coli CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(4), 854–865.

REES, H. A., KOMOR, A. C., YEH, W. H., CAETANO-LOPES, J., WARMAN, M., EDGE, A. S. B., LIU, D. R. (2017). Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nature Communications*, 8, 1–10.

REN, X., YANG, Z., MAO, D., CHANG, Z., QIAO, H.-H., WANG, X., SUN, J., HU, Q., CUI, Y., LIU, L.-P., JI, J.-Y., XU, J., NI, J.-Q. (2014). Performance of the Cas9 Nickase System in *Drosophila melanogaster*. *G3 & Genes|Genomes|Genetics*, 4(10), 1955–1962.

ROUILLON, C., ZHOU, M., ZHANG, J., POLITIS, A., BEILSTEN-EDMANDS, V., CANNONE, G., GRAHAM, S., ROBINSON, C. V., SPAGNOLO, L., WHITE, M. F. (2013). Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. *Molecular Cell*, 52(1), 124–134.

ROUSSEAU, C., GONNET, M., LE ROMANCER, M., NICOLAS, J. (2009). CRISPI: A CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, 25(24), 3317–3318.

SAMAI, P., PYENSON, N., JIANG, W., GOLDBERG, G. W., HATOUM-ASLAN, A., MARRAFFINI, L. A. (2015). Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-cas immunity. *Cell*, 161(5), 1164–1174.

SCHWANK, G., KOO, B. K., SASSELLI, V., DEKKERS, J. F., HEO, I., DEMIRCAN, T., SASAKI, N., BOYMANS, S., CUPPEN, E., VAN DER ENT, C. K., NIEUWENHUIS, E. E. S., BEEKMAN, J. M., CLEVERS, H. (2013). Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, 13(6), 653–658.

SCOTTI, M. M., SWANSON, M. S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nature Reviews Genetics*, 17(1), 19–32.

SEGAL, D. J., DREIER, B., BEERLI, R. R., BARBAS, C. F. (1999). Toward controlling gene expression at will: Selection and design of zinc finger domains recognizing each of the 5'-GNN-3' DNA target sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2758–2763.

SEMENOVA, E., JORE, M. M., DATSENKO, K. A., SEMENOVA, A., WESTRA, E. R., WANNER, B., VAN DER OOST, J., BROUNS, S. J. J., SEVERINOV, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10098–10103.

SHAH, S. A., ERDMANN, S., MOJICA, F. J. M., GARRETT, R. A. (2013). Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity. *RNA Biology*, 10(5), 891–899.

SHALEM, O., SANJANA, N. E., HARTENIAN, E., SHI, X., SCOTT, D. A., HECKL, D., EBERT, B. L., ROOT, D. E., DOENCH, J. G. (2014). Genome - scale CRISPR - Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 343(6166), 84–87.

SHAN, Q., WANG, Y., LI, J., ZHANG, Y., CHEN, K., LIANG, Z., ZHANG, K., LIU, J., XI, J. J., QIU, J. L., GAO, C. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(8), 686–688.

SHEN, B., ZHANG, W., ZHANG, J., ZHOU, J., WANG, J., CHEN, L., WANG, L., HODGKINS, A., IYER, V., HUANG, X., SKARNES, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods*, 11(4), 399–402.

SHI, J., GAO, H., WANG, H., LAFITTE, H. R., ARCHIBALD, R. L., YANG, M., HAKIMI, S. M., MO, H., HABBEN, J. E. (2017). ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 15(2), 207–216.

SHMAKOV, S., ABUDAYYEH, O. O., MAKAROVA, K. S., WOLF, Y. I., GOOTENBERG, J. S., SEMENOVA, E., MINAKHIN, L., JOUNG, J., KONERMANN, S., SEVERINOV, K., ZHANG, F., KOONIN, E. V. (2015). Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, 60(3), 385–397.

SHMAKOV, S., SAVITSKAYA, E., SEMENOVA, E., LOGACHEVA, M. D., DATSENKO, K. A., SEVERINOV, K. (2014). Pervasive generation of oppositely oriented spacers during CRISPR adaptation. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 5907–5916.

SHMAKOV, S., SMARGON, A., SCOTT, D., COX, D., PYZOCHA, N., YAN, W., ABUDAYYEH, O. O., GOOTENBERG, J. S., MAKAROVA, K. S., WOLF, Y. I., SEVERINOV, K., ZHANG, F., KOONIN, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*,

15(3), 169–182.

SHRIVASTAV, M., DE HARO, L. P., NICKOLOFF, J. A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18(1), 134–147.

SILAS, S., MOHR, G., SIDOTE, D. J., MARKHAM, L. M., SANCHEZ-AMAT, A., BHAYA, D., LAMBOWITZ, A. M., FIRE, A. Z. (2016). Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas I fusion protein. *Science*, 351(6276). aad4234-aad4234.

SINKUNAS, T., GASIUNAS, G., WAGHMARE, S. P., DICKMAN, M. J., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V. (2013). In vitro reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in *Streptococcus thermophilus*. *EMBO Journal*, 32(3), 385–394.

SLAYMAKER, I. M., GAO, L., ZETSCHKE, B., SCOTT, D. A., YAN, W. X., ZHANG, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268). 84-88.

SOMIA, N., VERMA, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews. Genetics*, 1(November), 91–99.

STEINBERG, M. H., SEBASTIANI, P. (2012). Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 87(8), 795–803.

STELLA, S., ALCÓN, P., MONTOYA, G. (2017). Structure of the CpfI endonuclease R-loop complex after target DNA cleavage. *Nature*, 546(7659), 559–563.

SURESH, B., RAMAKRISHNA, S., KIM, H. (2017). Eukaryotic Transcriptional and Post-Transcriptional Gene Expression Regulation, 1507, 81–94.

SUZUKI, K., TSUNEKAWA, Y., HERNANDEZ-BENITEZ, R., WU, J., ZHU, J., KIM, E. J., HATANAKA, F., YAMAMOTO, M., ARAOKA, T., LI, Z., KURITA, M., HISHIDA, T., LI, M., AIZAWA, E., GUO, S., CHEN, S., GOEBL, A., SOLIGALLA, R. D., QU, J., JIANG, T., FU, X., JAFARI, M., ESTEBAN, C. R., BERGGREN, W. T., LAJARA, J., NUÑEZ-DELICADO, E., GUILLEN, P., CAMPISTOL, J. M., MATSUZAKI, F., LIU, G. H., MAGISTRETTI, P., ZHANG, K., CALLAWAY, E. M., ZHANG, K., BELMONTE, J. C. I. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 540(7631). 144-149.

SWIECH, L., HEIDENREICH, M., BANERJEE, A., HABIB, N., LI, Y., TROMBETTA, J., SUR, M., ZHANG, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 33(1). 102-106.

SZOSTAK, J. W., ORR-WEAVER, T. L., ROTHSTEIN, R. J., STAHL, F. W. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33(1), 25–35.

THABIT, A. K., CRANDON, J. L., NICOLAU, D. P. (2015). Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 16(2), 159–177.

THE JOURNAL OF GENE MEDICINE - Vectors Used In Gene Therapy Clinical Trials (2017). [Accessed on September 4th, 2018]. Retrieved from; <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>

UETA, R., ABE, C., WATANABE, T., SUGANO, S. S., ISHIHARA, R., EZURA, H., OSAKABE, Y., OSAKABE, K. (2017). Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8.

VALSALAKUMARI, J., BABY, J., BIJIN, E., CONSTANTINE, I., MANJILA, S., PRAMOD, K. (2013). Novel gene delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3(1), 1.

VÉRON, N., QU, Z., KIPEN, P. A. S., HIRST, C. E., MARCELLE, C. (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental Biology*, 407(1), 68–74.

Vertex and CRISPR Therapeutics to Co-Develop and Co-Commercialize CTX001 as CRISPR/Cas9 Gene Edited Treatment for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. (2017, December 12). [Accessed on September 4th, 2018]. Retrieved from: <http://ir.crisprtx.com/news-releases/news-release-details/vertex-and-crispr-therapeutics-co-develop-and-co-commercialize?ID=2322215&c=254376&p=irol-newsArticle;>

WANG, H., YANG, H., SHIVALILA, C. S., DAWLATY, M. M., CHENG, A. W., ZHANG, F., JAENISCH, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–918.

WANG, J., LI, J., ZHAO, H., SHENG, G., WANG, M., YIN, M., WANG, Y. (2015). Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 163(4), 840–853.

WATERS, C. A., STRANDE, N. T., PRYOR, J. M., STROM, C. N., MIECZKOWSKI, P., BURKHALTER, M. D., OH, S., QAQISH, B. F., MOORE, D. T., HENDRICKSON, E. A., RAMSDEN, D. A. (2014). The fidelity of the ligation step determines how ends are resolved during nonhomologous end joining. *Nature Communications*, 5(1). 4286.

WEFERS, B., PANDA, S. K., ORTIZ, O., BRANDL, C., HENSLER, S., HANSEN, J., WURST, W., KÜHN, R. (2013). Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nature Protocols*, 8(12), 2355–2379.

- WIEDENHEFT, B., ZHOU, K., JINEK, M., COYLE, S. M., MA, W., DOUDNA, J. A. (2009). Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense. *Structure*, 17(6), 904–912.
- WRIGHT, A. V., NUÑEZ, J. K., DOUDNA, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1–2), 29–44.
- WU, Y., LIANG, D., WANG, Y., BAI, M., TANG, W., BAO, S., YAN, Z., LI, D., LI, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 13(6), 659–662.
- WU, Z., YANG, H., COLOSI, P. (2010). Effect of genome size on AAV vector packaging. *Molecular Therapy*, 18(1), 80–86.
- XIAO, Y., LUO, M., HAYES, R. P., KIM, J., NG, S., DING, F., LIAO, M., KE, A. (2017). Structure Basis for Directional R-loop Formation and Substrate Handover Mechanisms in Type I CRISPR-Cas System. *Cell*, 170(1), 48–60.e11.
- XUE, W., CHEN, S., YIN, H., TAMMELA, T., PAPAGIANNAKOPOULOS, T., JOSHI, N. S., CAI, W., YANG, G., BRONSON, R., CROWLEY, D. G., ZHANG, F., ANDERSON, D. G., SHARP, P. A., JACKS, T. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 514(7522), 380–384.
- YIN, H., XUE, W., CHEN, S., BOGORAD, R. L., BENEDETTI, E., GROMPE, M., KOTELIANSKY, V., SHARP, P. A., JACKS, T., ANDERSON, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, 32(6), 551–553.
- YOSEF, I., GOREN, M. G., QIMRON, U. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5569–5576.
- ZEISEL, M. B., LUCIFORA, J., MASON, W. S., SUREAU, C., BECK, J., LEVRERO, M., KANN, M., KNOLLE, P. A., BENKIRANE, M., DURANTEL, D., MICHEL, M. L., AUTRAN, B., COSSET, F. L., STRICK-MARCHAND, H., TRÉPO, C., KAO, J. H., CARRAT, F., LACOMBE, K., SCHINAZI, R. F., BARRÉ-SINOUSI, F., DELFRAISSY, J. F., ZOULIM, F. (2015). Towards an HBV cure: State-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*, 64(8), 1314–1326.
- ZETSCHKE, B., GOOTENBERG, J. S., ABUDAYYEH, O. O., SLAYMAKER, I. M., MAKAROVA, K. S., ESSLETZBICHLER, P., VOLZ, S., JOUNG, J., VAN DER OOST, J., REGEV, A., KOONIN, E. V., ZHANG, F. (2015). Cpf1 is a single-RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759–71.
- ZETSCHKE, B., HEIDENREICH, M., MOHANRAJU, P., FEDOROVA, I., KNEPPERS, J., DEGENNARO, E. M.,

WINBLAD, N., CHOUDHURY, S. R., ABUDAYYEH, O. O., GOOTENBERG, J. S., WU, W. Y., SCOTT, D. A., SEVERINOV, K., VAN DER OOST, J., ZHANG, F. (2016). Multiplex gene editing by CRISPR-CpfI using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, 35(1), 31-34.

ZHANG, F., CONG, L., LODATO, S., KOSURI, S., CHURCH, G., ARLOTTA, P. (2011). Programmable Sequence-Specific Transcriptional Regulation of Mammalian Genome Using Designer TAL Effectors. *Nature Biotechnology*, 29(2), 149–153.

ZHANG, Y., YU, L. C. (2008). Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays*, 30(6), 606–610.

ZINCARELLI, C., SOLTYS, S., RENGO, G., RABINOWITZ, J. E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy*, 16(6), 1073–1080.