

DOI: 10.13376/j.cblls/2018120

文章编号: 1004-0374(2018)09-1003-07



冯波, 博士, 香港中文大学生物医学学院副教授。2006年毕业于新加坡国立大学淡马锡生命科学学院, 获得博士学位; 随后, 在新加坡科技局属下的基因组研究院任职博士后/副研究员。在此期间, 冯博士从事了大量有关诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells) 的研究, 建立了由小鼠和人类成纤维细胞转化形成 iPS cell 的技术平台, 并首次发现和证实了一些新基因在重编程 (reprogramming) 过程中的重要作用, 有关文章发表在国际著名科学期刊 *Nature*、*Nat Cell Biol* 以及 *Cell Stem Cell* 上。

目前, 冯博士所带领课题组主要从事有关干细胞分子调控及基因组编辑技术的研究, 探索干细胞及分子技术的转化及应用。最近, 以最具突破性的 CRISPR/Cas9 技术为基础, 冯博士所带团队开展了在人类细胞中进行同源介导及非同源介导的基因敲入的研究工作, 成功建立了在人类细胞中高效敲入目的基因的新方法, 填补了基础理论及技术方法上的空白, 有关成果于 2016 年发表在 *Nucleic Acids Res* 上。

同源重组及非同源末端连接修复途径介导的基因编辑: CRISPR技术的认知、应用及展望

朱娉慧^{1#}, 罗群^{1#}, 王曜峰^{1,2}, 冯波^{1,2*}

(1 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 华南干细胞与再生医学研究所, 广州 510530;

2 香港中文大学生物医学学院, 中国香港)

摘要: CRISPR 系统具有精确识别及剪切特异性 DNA 序列功能而被开发成一种高效的基因编辑工具。它以成本低廉、操作简便、效率高及通用性广等优势, 成为新一代最具代表性的基因编辑技术。在应用中, CRISPR 系统可在特定靶点形成 DNA 双链断裂, 继而诱导同源重组 (HDR) 或非同源末端连接修复 (NHEJ), 为基因组定向改造与调控带来了革命性的突破。该文将对近年来生物科学领域中发展迅猛的研究工具 CRISPR/Cas 系统进行介绍, 包括其结构、作用原理、类型及应用等, 并重点阐述同源重组或非同源末端连接修复途径介导的基因定向编辑技术及应用。

关键词: CRISPR; 同源重组; 非同源末端连接; 基因编辑

中图分类号: Q78; R39.41 **文献标志码:** A

CRISPR-induced genomic editing via homology-dependent and independent repair pathways: recent insights, applications and perspectives

ZHU Ping-Hui^{1#}, LUO Qun^{1#}, WANG Yao-Feng^{1,2}, FENG Bo^{1,2*}

(1 South China Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Guangzhou Institute of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China;

2 School of Biomedical Sciences, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

收稿日期: 2018-06-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31771635); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2015CB96702)

#共同第一作者

*通信作者: E-mail: fengbo@cuhk.edu.hk

Abstract: CRISPR is a high effective and robust system to target a specific genomic region with high accuracy. It has become the most popular genomic editing tool in biomedical and clinical research nowadays. CRISPR complex can induce double-strand breaks at a specific genomic region. Mediated by homology-dependent or independent repair pathways, precious genomic editing can occur at the broken sites, using various donor designs. Here we review the composition, principle, as well as various types of CRISPR systems discovered and applied in current biomedical studies. In addition, a summary of knock-in strategies mediated by homology-dependent or independent repair pathways will be presented. Recent improvements and applications of these technologies will also be discussed. Furthermore, we highlight the current challenges in CRISPR-induced genomic editing in biomedical and clinical research.

Key words: CRISPR; homology-directed repair; non-homologous end joining; genomic editing

基因组定点编辑指对受体细胞基因组的特定位点进行精准地切割、插入或突变，从而实现对基因组的特异改造，该方法是深入了解疾病发病机制、探索基因功能乃至医学治疗的重要手段之一。

早期研究者主要利用基因同源重组的方法及体细胞核移植技术对基因进行改造^[1-2]，但由于在自然情况下，基因重组的过程非常罕见且效率非常低，而且细胞核移植技术耗时耗力，成本昂贵，严重制约了基础研究和临床应用^[3]。科学家们不断寻求更加精准、便捷的方法对特定的基因组位点进行高效敲入或者靶向修饰。人工核酸酶介导的基因组编辑技术是研究者开发出来的具有序列特异性的DNA核酸酶，能够对基因组进行高效定点编辑。其中主要有两种类型的酶，锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)^[4-5]和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[5-6]，由于改造难度和成本都降低，已在基础研究、基因治疗和遗传改良等方面展示出了巨大的潜能，并很快得到了广泛应用^[7-15]。然而，ZFN和TALEN技术对每一个基因位点的编辑都需要经过重新设计、合成并组装具有特异性DNA识别能力蛋白模块的繁琐步骤，载体构建复杂，周期长，难于用来开展大规模基因编辑的筛选，绝大多数实验室都难以自行完成完整的操作，对其推广造成了障碍，从而限制了其应用前景。

2012—2013年，科学家发现了基因编辑的另一个突破性技术CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated system)^[16-24]，使基因编辑技术进一步简化。该技术利用RNA介导的核酸酶与靶DNA序列结合，从而达到基因组定点编辑的目的。与以DNA结合蛋白为基础的基因编辑技术ZFNs和TALEN相比，以RNA介导的CRISPR/Cas技术具有良好的靶向性、

构建简单、可同时操作多个基因等优点，其原理也更加简单，只需要遵循RNA与DNA之间的碱基互补配对原则。该技术一经问世，迅速成为生物医学领域的前沿热点，并引发新一轮的基因治疗研究热潮。

本文将对近年来生物科学领域中发展迅猛的研究工具CRISPR系统进行介绍，包括其结构、作用原理、类型及应用等，并重点阐述同源重组(HDR)或非同源重组基因组(NHEJ)修复途径介导的基因定向编辑。

1 CRISPR系统的结构及作用机制

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一个具有成簇规律间隔的短回文DNA重复序列的家族，存在于约40%已测序细菌和90%已测序古生菌中^[25]。CRISPR序列中的重复序列高度保守^[26]，含有可以形成发夹结构的回文序列，而间隔区是被细菌俘获的外源DNA序列，可以对靶基因进行识别^[27-28]。在CRISPR序列上游有一个多态性的家族基因，被命名为CRISPR关联基因(CRISPR associated, Cas)。Cas基因编码一种双链DNA核酸酶，在guide RNA的引导下，该酶能够对靶基因位点进行切割^[29]。Cas基因与CRISPR序列在共同进化中，逐渐形成了在细菌中具有高度保守性的CRISPR/Cas系统。目前已相继发现多种类型的Cas基因，如Cas1~Cas10、Cas12a和Cas13a。

2 CRISPR系统在当前的生物医学研究中广泛应用

根据参与CRISPR/Cas系统的Cas蛋白不同，CRISPR系统可分为Class 1和Class 2两种类型^[30]。Class 1 CRISPR/Cas系统需要众多蛋白的参与，且

免疫机制相当复杂, 不适用于基因组工程; 而 Class 2 系统需要的核糖核蛋白复合物相对简单, 是目前研究最多、应用最广的 CRISPR/Cas 系统。

2.1 CRISPR/Cas9系统

CRISPR/Cas9 系统属于 Class 2 中的 Type II 类型, 包含一个单一的多功能 Cas9 和两个非编码 RNA, 即 crRNA 和反式激活 crRNA (tracrRNA)^[31]。人工合成的 sgRNA (short guide RNA) 具有 3 个结构域: 约 20 nt 与 DNA 特异性结合的互补区; 约 42 nt 模拟 crRNA-tracrRNA 复合物的发夹结构域, 能与 Cas9 结合; 约 40 nt 的转录终止子。将表达 Cas9 蛋白和 sgRNA 的质粒共同转入细胞后, Cas9 蛋白与 sgRNA 结合形成核糖核蛋白复合体, 识别靶序列并与其结合^[16,32], 进行切割形成 DNA 双链断裂^[33], 其中, sgRNA 与靶序列之间的特异性互补以及靶 DNA 3' 端 PAM 序列的存在是靶位点识别和 DNA 链断裂的前提条件。根据 Cas9 的来源不同, PAM 序列也有所不同, 例如化脓链球菌 PAM 序列为 5'-NGG-3', 嗜热链球菌 PAM 序列为 5'-NGGNG-3'^[34]。

此外, Cas9 不但可以应用于编辑基因, 还可以用于调控基因的表达。当 Cas9 的两个剪切活性结构域 HNH 和 RuvC 全部突变时, 将不具有核酸酶活性, 成为 dCas9 (dead Cas9)。dCas9 虽然没有剪切 DNA 的能力, 但仍然可以在 gRNA 的引导下与特定的 DNA 序列结合^[35]。Maeder 等^[36]研究发现, dCas9 与转录抑制因子 (KRAB, SID) 或转录激活因子 (VP64, p65) 融合后将会特异地抑制或促进靶基因的表达。这种方法与传统的 Cas9 系统相比具有巨大的优势, 该系统能在不改变基因组的条件下, 通过一些效应因子调控某些基因表达从而达到表观遗传学修饰的目的^[37]; 且其不受基因大小的限制, 可以同时上调多个基因的表达。CRISPR-dCas9 系统为后续的疾病研究工作提供了更加便捷的工具。

2.2 CRISPR/Cas12a系统和Cas13a系统

除 Cas9 系统外, CRISPR 家族中的两个成员 Cas12a 和 Cas13a 也迅速获得了业界的广泛关注。CRISPR/Cas12a 系统也称作 CRISPR/Cpf1 系统, 是一类新型的 CRISPR/Cas 系统^[38-39]。由于 Cpf1 蛋白切割而成的 DSB 缺口会形成约 8 nt 的长黏性末端, 因此, 它有效降低了 CRISPR/Cas9 系统经常会发生的脱靶效应问题, 进一步扩大了编辑靶序列的选择范围。同时, 黏性末端的产生也为下游的基因编辑工作带来了极大的灵活性。此外, 该系统更简化, 只需要 1 个 Cpf1 蛋白和 1 个 RNA, 而且 Cpf1 蛋白

相对分子质量小于 Cas9 蛋白, 其更容易进入细胞, 从而提高了编辑的成功率。

2016 年, Abudayyeh 等^[40]发现的 CRISPR/Cas13a 系统可以有效靶向 RNA 进行定点切割, 因此是一种高效的 RNA 编辑工具, 而且在 Cas13a 系统切割靶 RNA 之后仍能保持活性, 其可能还表现出没有区别的切割活性, 可以在一种被称作“附带切割 (collateral cleavage)”的过程当中继续切割其他的非靶 RNA。张锋团队基于 Cas13a 系统开发出的 SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter UnLOCKing) 系统, 可用于检测低浓度的寨卡病毒及病毒载量, 还可以对人类 DNA 进行基因分型, 并鉴定游离 DNA 中的肿瘤突变^[41]。未来, Cas13a 有望继续扩大 CRISPR 的应用范围, 为人类医学研究做出更大贡献。

3 CRISPR/Cas介导的基因定点敲入

在真核细胞中, 当基因组上出现双链断裂缺口 (DNA double strand breaks, DSBs) 时, 会启动常规的修复途径, 包括同源重组 (homology directed repair, HDR) 或非同源重组 (non-homologous end joining, NHEJ)^[42], 这是细胞的一种自身保护机制。HDR 仅发生在 DNA 经历或完成复制的 S 期和 G₂ 期, 而 NHEJ 可在整个细胞周期发生^[43-46]。CRISPR/Cas 系统是强有力的“DNA 剪刀”, 能高效地切割 DNA 链, DSBs 形成后, CRISPR/Cas 系统主要联合 HDR 或 NHEJ 两条修复途径来完成基因编辑。

CRISPR/Cas 系统可以实现由 HDR 介导的精确的基因点突变、外源基因敲入或者条件敲除等, 如通过与 sgRNA 和 Cas9 一起注射单链或双链的同源模板替换相应基因可以达到基因的定向修饰。另外, CRISPR/Cas 系统联合 HDR 或 NHEJ 途径已被广泛用于获得转基因动物、细胞系以及动物全基因组的基因敲除等。有研究发现, CRISPR/Cas 联合 NHEJ 介导的 DNA 随机整合频率比 CRISPR/Cas 联合 HDR 引起的 DNA 插入片段高出 1 000 倍以上^[47]。为了克服 HDR 低效的基因敲入策略, 近年来已经开发了一系列可编程的基于核酸酶的基因组编辑技术, 使得人们能够在各种真核生物, 特别是哺乳动物中进行有针对性的、高效的基因修饰。

3.1 HDR途径介导的基因敲入

HDR 具有高保真性, 一般不会引起突变, 在正常修复的过程中, 需要把未受损的姐妹染色单体的同源序列作为模板来实施修复, 从而也就限制了

其修复过程发生在细胞周期的 S 期和 G₂ 期。HDR 发生机制是两个同源 DNA 分子发生联会^[48]，引入断裂 DNA，然后在两条重组 DNA 之间形成碱基互补配对的片段起始区^[49]，链入侵后，两个 DNA 分子相互交叉的 DNA 链就联系在一起，形成 holliday junction 的交叉结构^[50]，最后剪切 holliday junction 连接体，完成 HDR 修复。

基因工程中，通过人工合成同源单链 DNA 或双链 DNA 模板就可以在真核生物和细胞系中实现基因定向编辑，如基因的定向敲除、构建不同的表型、敲入外源基因或报告基因，甚至还可以部分删除或倒位染色体等。把表达 sgRNA、Cas9 蛋白的质粒以及人工合成的同源模板即 DNA “修复模板”序列一同转入研究者感兴趣的细胞中就可以实现 CRISPR/Cas 联合 HDR 介导的精确的基因定向编辑^[51]。然而，HDR 介导基因敲入的效率往往很低，所以，如何进一步提高 HDR 的效率成了近期 CRISPR 技术的研究热点之一。Maruyama 等^[52]发现，在 NHEJ 缺陷的细胞株中 HDR 的效率会升高。在 NHEJ 过程中，DNA 连接酶 IV(DNA ligase IV) 参与 DNA 修复，他们通过使用这种酶的小分子抑制剂 Scr7 来抑制 NHEJ 途径，从而提高 HDR 效率。向 CRISPR 系统中添加 Scr7，细胞中 HDR 的效率可提高 19 倍，而在小鼠模型中 HDR 的效率也提高了两倍以上(从 28.6% 到 58.3%)^[52]。Chu 等^[53]也发现，在引入 CRISPR 系统时注射短发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA)、小分子抑制剂 Scr7 或者 4 型腺病毒的 E1B55K 和 E4orf6 蛋白，通过抑制参与 NHEJ 过程的 KU70、KU80 和 DNA 连接酶 IV，能够将细胞系中的 HDR 效率提高 8 倍。可是，在一些人细胞中，尤其是在人胚胎干细胞 (hESCs) 及诱导干细胞 (iPSCs) 中，HDR 的效率依然很低，即使使用 CRISPR/Cas 系统，HDR 效率也没有得到提高。有研究显示 CRISPR/Cas 系统联合 HDR 介导的基因敲入效率仅有 10⁻⁵^[54]，但是，CRISPR/Cas 系统联合 NHEJ 却能弥补这一缺憾。

3.2 NHEJ途径介导的基因敲入

NHEJ 在不依赖 DNA 同源性的情况下将两个 DNA 的断裂端彼此连接在一起，从而快速地修复 DSB，是最活跃的修复机制，而且效率高。NHEJ 修复途径主要是当发生 DSBs 时，异二聚体 Ku70/Ku80 分别结合到两个断裂的 DNA 末端，在断裂处形成一个“桥”状的 Ku 环结构^[55-56]，然后招募 DNA-PKcs 分子与 DNA 结合，使复合体重塑，对

末端进行加工并填补缺口，最后 DNA 连接酶 IV/XRcc4 进行连接，完成 NHEJ 修复。

CRISPR/Cas 系统联合 NHEJ 具有很高的效率，在多种类型的人细胞，包括人胚胎干细胞中，使用 CRISPR/Cas9 系统联合 NHEJ 介导的基因敲入效率明显高于联合 HDR^[57]。进一步研究发现，由 CRISPR/Cas9 介导的 DSB 有另外两种可能的修复机制，c-NHEJ (canonical non-homologous end joining) 途径^[57]和 a-NHEJ (alternative non-homologous end joining) 途径^[58]。其中，c-NHEJ 途径在细胞中发生的频率更高，因此，使用 c-NHEJ 途径有利于实现高效的基因敲入。Auer 等^[59]发现，利用 NHEJ 能够高效地将大于 5.7 kb 的片段插入到斑马鱼基因组中。该方法极大地扩展了斑马鱼的基因组编辑库，并且还可以用于其他物种的基因编辑。在研究中引入外源 DNA 序列来标记内源基因具有一定的挑战，Lackner 等^[60]同样利用 NHEJ 途径，在将质粒元件整合进目标基因组的条件下，在 N 或 C 末端高效地标记了内源基因。2016 年，本课题组首次在人类细胞中利用 NHEJ 策略建立了长基因片段的高效敲入筛选平台^[57]，并利用此平台成功在人类胚胎干细胞中将长基因片段的非药物处理方法的敲入效率提升到 1% 以上。2017 年，Belmota 课题组在体内水平利用 AAV 病毒建立了非同源重组原理基因敲入方法 (homology-independent targeted integration, HITI)^[61]。Belmota 和同事利用此方法在大鼠体内对视网膜退化的致病基因进行了高效的基因矫正治疗。这些成功的案例都揭示了非同源重组途径在生物医学领域的应用前景。

由于 HDR 效率远低于 NHEJ，使用 HDR 抑制剂来增强 NHEJ 的效率似乎不可取。此外，NHEJ 介导的 DSBs 修复易于发生插入或缺失后的移码错误^[62]，导致基因的 ORF 阅读框中断，提前终止。这些特性使得目前利用 NHEJ 途径进行基因编辑的临床研究依然面临技术挑战。

4 HDR和NHEJ修复途径介导的基因编辑方法在生物医学研究中的应用

基因工程涉及对基因组的靶向修饰，这种高效便捷的修饰对于基础科学、生物技术及医学的变革有着巨大的可能。CRISPR/Cas 系统联合 HDR 或 NHEJ 介导的基因编辑已被广泛应用于基因工程中，如控制转录、改变表观基因组、全基因组筛选、染色体成像、缓解动物的遗传疾病及癌症的治疗等。

CRISPR/Cas 基因编辑已被证明可用于几乎所有类型的哺乳动物细胞, 包括诱导多能干细胞和癌症特异性免疫细胞, 如 CRISPR/Cas9 联合 NHEJ 能够有效地对人类胚胎干细胞以及体细胞进行基因编辑^[57]。Song 等^[63]报道了通过 CRISPR-Cas9 技术治疗 β -地中海贫血 (β -thalassemia, β -Thal), 首先将患者来源的皮肤细胞诱导分化为诱导性多功能干细胞 (β -Thal-iPSCs), 再用 CRISPR-Cas9 技术修复血红蛋白 β -球蛋白 (hemoglobin β , HBB) 基因。结果显示, 基因修正后的细胞核型正常, 在向造血细胞分化的过程中, 可以高比例地生成各类造血祖细胞, 并表达正常的 β -球蛋白。而在另一项研究中, Huang 等^[64]用 CRISPR-Cas9 系统对镰状细胞性贫血 (sickle-cell anemia) 患者的 iPSCs 细胞进行基因编辑, 基因修正后的 iPSCs 可以成功地分化至网织红细胞阶段, 并表达正常的 β -球蛋白。Ousterout 研究团队通过 CRISPR-Cas9 技术成功地纠正了 DMD 患者成肌细胞 (myoblast) 中的 DMD 基因突变, 基因编辑后的成肌细胞可以在体外及体内条件下表达正常的抗肌萎缩蛋白^[65-66]。Feng 等^[67]利用 CRISPR-Cas9 系统对骨肉瘤细胞系 KHOS 和 U-2OS 中的 CDK11 基因进行了有效地沉默, 结果发现, CDK11 基因沉默的骨肉瘤细胞生存和增殖能力都显著减弱, 迁移性和侵袭性也显著降低。类似地, Kawamura 等^[68]通过 CRISPR-Cas9 技术突变了前列腺癌细胞系 DU145 中的 NANOG 和 NANOG8 基因, 结果发现, 突变后的细胞系成瘤性大大降低, 表明 NANOG/NANOG8 基因在前列腺癌发生中具有重要作用。上述两项研究也为骨肉瘤及前列腺癌治疗提供了新的分子靶标。在癌症免疫治疗领域, 研究人员通过利用 CRISPR/Cas9 系统定向插入 CAR 基因并递送到特异性位置的编辑技术构建了更有效的 CAR-T 细胞, 而且增强了小鼠的肿瘤抑制作用^[69], 这是一种更强有力的免疫疗法, 有助于未来癌症免疫疗法的发展。

另一方面, 基因编辑在建立新疾病动物模型方面展示出了很大的潜能。不需要使用传统的胚胎干细胞操作的方式, 在受精卵中进行显微注射或简单电穿孔可以有效实现 CRISPR/Cas 介导的基因编辑 (包括 NHEJ 和 HDR 介导的各种技术), 这种在受精卵中进行基因编辑的方式省去了分离、培养和编辑胚胎干细胞的步骤, 节省了时间, 且加速了在现有动物模型中产生额外突变的进程。如 Platt 等^[70]采用 CRISPR/Cas9 系统分别构建了 Kras、p53、Lkb1

基因突变的小鼠模型, 模型鼠发展出了肉眼可见的肺腺癌病理表征; Suzuki 等^[61]通过在体内进行 CRISPR/Cas9 系统介导的非同源靶向整合大片段基因的方法建立了色素性视网膜炎的动物鼠模型, 为基础研究和靶向治疗提供了新的途径。

5 结语和展望

CRISPR/Cas 汇集了简便、高效、经济和定位精确等多重优点, 引领了基因编辑技术的重大革新, 在生物医学领域得到了广泛的应用。它不再受模式生物的限制, 可以对更加多的物种进行高效的遗传操作, 而且已经建立的 gRNA 文库可以对基因组实行高通量的功能性筛选。

CRISPR/Cas9 系统主要联合 HDR 介导基因的编辑, 但 HDR 的效率比 NHEJ 要低很多, 因此, 在很大程度上影响了 CRISPR/Cas9 系统的编辑效果, 对其广泛应用造成了阻碍。虽然 CRISPR/Cas9 系统联合 NHEJ 在体内或体外介导基因敲入的效率高于 HDR, 但是, NHEJ 的错配率太高。David Liu 的研究团队开发出了一种单碱基的基因编辑技术, 通过再次将 Cas9 基因改造成 ecTadA-dCas9, 在不切割 DNA 的情况下, 能够把 A-T 碱基对转换为 G-C 碱基对^[71]。该技术的效率比其他基因组编辑技术要高, 而且不会产生副作用, 如随机插入和删除等。

在未来的发展中, 需要进一步提高同源重组修复的几率或者开发不依赖 DNA 断裂就可以实现高效的定向基因修饰, 进而推广 CRISPR/Cas 系统在生物医学等领域的应用, 发挥其在遗传疾病治疗、疾病相关基因的筛查与检测等方面的巨大潜能。

[参 考 文 献]

- [1] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244: 1288-92
- [2] Gurdon J, Murdoch A. Nuclear transfer and iPS may work best together. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 135-8
- [3] Mohr SE, Perrimon N. RNAi screening: new approaches, understandings, and organisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012, 3: 145-58
- [4] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31: 294-301
- [5] Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, et al. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair: Amst*, 2008, 7: 1765-71
- [6] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 731-4

- [7] Pan Y, Xiao L, Li AS, et al. Biological and biomedical applications of engineered nucleases. *Mol Biotechnol*, 2013, 55: 54-62
- [8] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636-46
- [9] Ochiai H, Fujita K, Suzuki K, et al. Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases. *Genes Cells*, 2010, 15: 875-85
- [10] Lei Y, Guo X, Liu Y, et al. Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 17484-9
- [11] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic Zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 697-8
- [12] Liu J, Li C, Yu Z, et al. Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics*, 2012, 39: 209-15
- [13] Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 2011, 333: 307
- [14] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 143-8
- [15] Christian M, Cermak T, Doyle EL, et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186: 757-61
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [17] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 9275-82
- [18] Magadán AH, Dupuis MÈ, Villion M, et al. Cleavage of phage DNA by the *Streptococcus thermophilus* CRISPR3-Cas system. *PLoS One*, 2012, 7: e40913
- [19] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [20] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [21] Jinek M, East A, Cheng A, et al. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471
- [22] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230-2
- [23] Hwang WY, Fu Y, Reyon D, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 227-9
- [24] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173-83
- [25] Lillestøl RK, Redder P, Garrett RA, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, 2: 59-72
- [26] Bland C, Ramsey TL, Sabree F, et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 209-16
- [27] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats-(CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151: 2551-61
- [28] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [29] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482: 331-8
- [30] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168: 328-328e1
- [31] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2579-86
- [32] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471: 602-7
- [33] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1262-7
- [34] Palermo G, Ricci CG, Fernando A, et al. Protospacer adjacent motif-induced allostery activates CRISPR-Cas9. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 16028-31
- [35] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [36] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10: 977-9
- [37] Xu X, Tao Y, Gao X, et al. A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov*, 2016, 2: 16009
- [38] Fonfara I, Richter H, Bratovič M, et al. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature*, 2016, 532: 517-21
- [39] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163: 759-71
- [40] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353: aaf5573
- [41] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356: 438-42
- [42] Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 335-46
- [43] Branzei D, Foiani M. Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 208-19
- [44] Daigaku Y, Davies AA, Ulrich HD. Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature*, 2010, 465: 951-5

- [45] David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 2007, 447: 941-50
- [46] Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*, 2009, 10: 756-68
- [47] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 347-55
- [48] Sartori AA, Lukas C, Coates J, et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 2007, 450: 509-14
- [49] Deans AJ, West SC. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 467-80
- [50] Lieber MR. NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 393-5
- [51] Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27: 801-14
- [52] Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538-42
- [53] Chu VT, Weber T, Wefers B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 543-8
- [54] Merkle FT, Neuhausser WM, Santos D, et al. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. *Cell Rep*, 2015, 11: 875-83
- [55] Shao Z, Davis AJ, Fattah KR, et al. Persistently bound Ku at DNA ends attenuates DNA end resection and homologous recombination. *DNA Repair: Amst*, 2012, 11: 310-6
- [56] Britton S, Coates J, Jackson SP. A new method for high-resolution imaging of Ku foci to decipher mechanisms of DNA double-strand break repair. *J Cell Biol*, 2013, 202: 579-95
- [57] He X, Tan C, Wang F, et al. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: e85
- [58] Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems. *Nat Protoc*, 2016, 11: 118-33
- [59] Auer TO, Del Bene F. Homology-independent integration of plasmid DNA into the zebrafish genome. *Methods Mol Biol*, 2016, 1451: 31-51
- [60] Lackner DH, Carré A, Guzzardo PM, et al. A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging. *Nat Commun*, 2015, 6: 10237
- [61] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144-9
- [62] Iliakis G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol*, 2009, 92: 310-5
- [63] Song B, Fan Y, He W, et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev*, 2015, 24: 1053-65
- [64] Huang X, Wang Y, Yan W, et al. Production of gene-corrected adult β globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. *Stem Cells*, 2015, 33: 1470-9
- [65] Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, et al. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 2015, 6: 6244
- [66] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 403-7
- [67] Feng Y, Sassi S, Shen JK, et al. Targeting Cdk11 in osteosarcoma cells using the CRISPR-cas9 system. *J Orthop Res*, 2015, 33: 199-207
- [68] Kawamura N, Nimura K, Nagano H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. *Oncotarget*, 2015, 6: 22361-74
- [69] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543: 113-7
- [70] Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159: 440-55
- [71] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464-71