

СИСТЕМА CRISPR-CAS И ЕЁ ЗНАЧЕНИЕ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Черкасова Полина Сергеевна

студент, Оренбургский государственный медицинский университет, РФ, г. Оренбург

Немцева Наталия Вячеславовна

научный руководитель, доктор медицинских наук, профессор, Оренбургский государственный медицинский университет, РФ, г. Оренбург

CRISPR-Cas – адаптивная иммунная система микроорганизмов, использующая РНК-направленные нуклеазы для вырезания чужеродных генетических элементов. CRISPR-Cas метод – это метод молекулярно-генетических манипуляций, разработанный на основе прокариотической CRISPR-системы II типа, где используется одна направляющая РНК (single-guide RNA), направляющая и активирующая Cas9-нуклеазу, мишенью для которой является специфическая генетическая последовательность. Cas9 индуцирует двойные нитевые разрывы ДНК, которые восстанавливаются путем негомологичного сшивания концов (non-homologous end joining (NHEJ)) с образованием инсерций или делеций (indels), или, если восстановление обеспечено наличием гомологичной матрицы, то путем гомологично-направленного восстановления (homologydirected repair (HDR)). Технология может быть использована для исследования функций интересующих генов или коррекции генетических мутаций в живых клетках путем редактирования генома, что формирует подходы к генной терапии будущего. В настоящее время для широкого терапевтического применения технология CRISPR- Cas нуждается в оптимизации, которая может включать частичное увеличение скорости коррекции генов, снижение нежелательных эффектов «вне-мишени» (off-target), а также разработка эффективных способов доставки CRISPR-системы.

1. Актуальность

Конструирование генома – открытое поле для исследований, которые могут быть посвящены разработке методов специфической мишень-направленной модификации генов. Эти подходы революционны с точки зрения исследования механизмов заболеваний и определяют прогресс персонализированной терапии генетических нарушений. В последнее десятилетие конструирование генома получило название «редактирование генома» (genome editing). Одним из новых направлений явилось использование двухкомпонентных РНК-направляемых эндонуклеаз, таких как CRISPR ассоциированные протеины - Cas (CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Zhang et al. 2014) . Эти нуклеазы формируют двунитевые разрывы ДНК, которые затем восстанавливаются путем использования эндогенных клеточных механизмов: негомологичного сшивания концов (НГСК) или гомологично-направленного восстановления (ГНВ). Оба механизма могут быть использованы для редактирования генома. НГСК включает прямое связывание разрезанных концов ДНК с образованием инсерций или делеций в месте разреза ДНК. ГНВ использует гомологичные ДНК-последовательности как матрицу для восстановления ДНК. Этот путь может быть использован для высокоточного редактирования нуклеотидных последовательностей или включения гомологичной экзогенной ДНК. CRISPR- Cas технология подняла генное редактирование от частных технических разработок на уровень практического применения благодаря простоте метода. В CRISPR- Cas системе используется одна направляющая РНК (sgRNA), которая распознает геномные мишени путем простого связывания комплементарных нуклеотидов в соответствии с классической моделью Уотсона-Крика и действует как скаффолд

для связывания эндонуклеазы Cas9. Адаптивность, простота сборки, специфичность и высокая эффективность дают значительные преимущества технологии CRISPR- Cas по сравнению с другими подходами к редактированию генома. Ученые теперь получили возможность конструировать любую часть генома человека с экстремально высокой точностью. Это явилось основой для развития медицинской науки в части исследований и разработки терапии широкого ряда заболеваний, включая, фиброз мочевого пузыря, вирусные инфекции, например, ВИЧ и онкологические заболевания (Zhang et al. 2014; Wu et al. 2013; Doudna and Charpentier 2014).

Учитывая вышеизложенное, актуальность темы определяется именно перспективами, которые могут быть реализованы благодаря исследованиям в области применения CRISPR-Cas-системы, а именно выяснение функции генов и редактирование генома живых организмов, что представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

Поэтому, **целью** настоящего реферативного исследования явилась оценка уровня разработанности системы CRISPR-Cas и возможности её использования в биологии и медицине.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Дать функциональную характеристику системы CRISPR-Cas;
2. Описать способы доставки компонентов системы в клетки и организмы;
3. Оценить возможность использования CRISPR- Cas9 для исследования функции генов;
4. Оценить возможность использования CRISPR- Cas9 для коррекции генома.

2. Редактирование генома с использованием CRISPR- Cas9

2.1. Происхождение CRISPR-Cas системы

CRISPR и Cas гены имеются у прокариотов и архей и обеспечивает адаптивный иммунитет против бактериофагов, а точнее против внедрения их генетического материала. CRISPR повторы были впервые обнаружены в геноме *Escherichia coli*, как необычные повторяющиеся локусы (Ishino et al. 1987). Значение этих структур было установлено, когда ученые выяснили, что фаговые последовательности представляют собой простые спейсеры в CRISPR локусах (Bolotin et al. 2005). Так, бактерии приобретают устойчивость к фагам, встраивая фаговые последовательности в CRISPR локусы (Barrangou et al. 2007).

Адаптивный иммунитет бактерий включает три фазы: 1)фаза адаптации – включение фагового или плазмидного фрагмента в CRISPR локусы в качестве спейсера; 2) фаза экспрессии – транскрипция прекурсора crRNA, содержащей последовательности CRISPR повторов и последовательности вирусного или плазмидного спейсера, затем происходит процессинг в зрелую crRNA путем вырезания CRISPR последовательностей; 3) фаза интерференции – происходит специфически направленное вырезание чужеродной вирусной или плазмидной ДНК из генома клетки хозяина с участием crRNA и Cas9 (Doudna and Charpentier 2014) .

2.2. Использование CRISPR- Cas9 для редактирования генома

Двойная tracrRNA:crRNA сконструирована как sgRNA, обладающая двумя важнейшими характеристиками: имеет комплементарную ДНК направляющую последовательность (обычно 20 нуклеотидов) и двухнитевую структуру с последовательностью со стороны 3'-конца, связывающейся с Cas9 (Sternberg et al. 2014; Jinek et al. 2012; Gasiunas et al. 2012; Doudna and

Charpentier 2014) (Рис.1). В технологии CRISPR- Cas используется Cas9 протеин для проведения сайт-специфического двунитевого разрыва в определенных заданных последовательностях ДНК. Для реализации нуклеазной активности Cas9 CRISPR-Cas9-системе необходимо наличие в ДНК протоспейсер примыкающей смысловой последовательности (protospacer-adjacent motif - PAM), являющейся смежной со стороны 3'-конца с последовательностью-мишенью ДНК, что облегчает распознавание мишени. Распознавание PAM является критическим для запуска перемещения Cas9 относительно мишени и реализации нуклеазной активности (Sternberg et al. 2014). PAM также важен в системе контроля распознавания в защите sgRNA от собственного распознавания как мишени для нуклеаз. Так, нуклеазная активность Cas9 может быть направлена по отношению к любому участку ДНК, прилегающему к 5'-концу PAM, путем обычного синтеза направляющей последовательности sgRNA, комплементарной к необходимой целевой последовательности ДНК (Sander and Joung 2014).

Cas9-индуцированные двунитевые разрывы ДНК могут быть восстановлены эндогенными системами репарации ДНК, представленными во всех типах клеток и организмов: НГСК и ГНВ (Davis and Maizels 2014). ГНВ реализуется обычно в S и G2 фазах клеточного цикла. НГСК восстанавливает ДНК с образованием инсерций или делеций, что в итоге приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному срабатыванию стоп-кодона с прерыванием нормального трансляционного считывания рамки и прекращения синтеза соответствующего белка. Это преобладающий путь восстановления ДНК у млекопитающих и он не зависит от фазы клеточного цикла (Mladenov and Iliakis 2011).

2.3. Протоспейсер-примыкающая смысловая последовательность (protospacer-adjacent motif - PAM)

PAM представляет собой три нуклеотидных основания прилегающих к 3'-концу ДНК сайта-мишени и является локусом для связывания Cas9 (Hsu et al. 2013). Cas9 *Streptococcus pyogenes*, являющийся универсальным инструментом, используемым в редактировании генома, распознает 5'-NGG и 5'-NAG последовательности PAM (Jiang et al. 2013; Cong et al. 2013). Распознавание, которое характеризуется образованием гетеродуплекса РНК-ДНК, инициируется PAM в результате связывания с PAM и соответствующей мишенью ДНК, приводит к реализации нуклеазной активности Cas9 (Nishimasu et al. 2014). Комплекс Cas9-гетеродуплекс РНК-ДНК приводит к разделению нитей ДНК (Sternberg et al. 2014) и в последующем к образованию двунитевых разрывов.

2.4. Функция протеина Cas9

Семейство протеинов Cas9 включает в себя ДНК связанные нуклеазы различной длины от 900 до 1600 аминокислот (Makarova et al. 2002, 2011a), исключительно связанные со II типом CRISPR-Cas9-системы (Hsu et al. 2013). Cas нуклеаза CRISPR-Cas9-системы имеет РНК связывающий домен, α -спираль распознающую долю (REC), нуклеазную долю, которая включает RuvC и HNH нуклеазные домены для разрезания ДНК, а также имеется PAM-взаимодействующий сайт (van der Oost et al. 2014; Hsu et al. 2013; Hsu Patrick et al. 2014). HNH-домен используется Cas9 для разрезания комплементарной crRNA нити ДНК, а RuvC-домен используется для разрезания оппозитной нити ДНК (Gasiunas et al. 2012).

2.5. Методы доставки компонентов CRISPR-Cas9-системы

Компоненты и генетические детерминанты CRISPR-Cas9-системы могут быть доставлены в широкий ряд клеток и организмов с использованием различных методических подходов. Гены нуклеаз могут быть доставлены через мембрану клеток физическими методами, что имеет ряд преимуществ: простота в исполнении, высокая воспроизводимость и усиление экспрессии генов (Ain et al. 2014). Для переноса в культивируемые клетки млекопитающих может быть использована элек тропорация (Ding et al. 2013), нуклеофекция (Mali et al. 2013c; Fu et al. 2013) и липофектаид-опосредованная трансфекция (Mali et al. 2013c; Fu et al. 2013;

Cong et al. 2013) нереплицирующейся плазмидной ДНК для экспресс переноса Cas9-sgRNA комплекса (Sander and Joung 2014). Экспериментальные данные позволяют заключить, что Cas9-sgRNA комплекс может быть интродуцирован прямо внутрь клетки с использованием нуклеофекции или пептидов, пенетрирующих клетки, позволяющих проведение быстрого и своевременного редактирования (Ramakrishna et al. 2014; Kim et al. 2014). Также были исследованы трансгенные организмы, экспрессирующие Cas9 (Doudna and Charpentier 2014).

Неинтегрированные вирусные векторы, включая аденовирусный, аденоассоциированный вирусный и лентивирусный векторы имеют преимущества в связи с тем, что не являются причиной инсерционного мутагенеза (Ain et al. 2014). Успешно продемонстрированы различные уровни применимости данных векторов доставки и в последнее время перенос комплекса Cas9-sgRNA осуществляется именно этими методами (Maggio et al. 2014).

Кратковременной экспрессии обычно достаточно для возможного эффективного редактирования генома. Однако, интегрированный лентивирусный вектор может быть использован для конститутивной согласованной экспрессии Cas9 и sgRNA в культивируемых клетках человека (Wang et al. 2014; Shalem et al. 2014) и мышей (Koike-Yusa et al. 2014).

CRISPR-связанная РНК и/или плазмидная ДНК с использованием микроинъекции были перенесены в эмбрионы рыбки данио рерио (Hwang et al. 2013), дрозофилы (Yu et al. 2013; Gratz et al. 2013), мыши (Zhou et al. 2014a; Li et al. 2013a) и крысы (Li et al. 2013a). Плазмидная ДНК и РНК могут быть также инъецированы в гонады взрослых круглых червей (Waijers et al. 2013; Katic and Großhans 2013; Friedland et al. 2013).

3. Использование CRISPR- Cas9 для исследования функции генов

CRISPR- Cas9-система предоставляет возможности для разработки высоко эффективных и универсальных подходов осуществления нокаута генов с целью исследования функциональной геномики клеток, обеспечивая новым инструментарием анализа функции генов в биологических процессах и заболеваниях (Zhang et al. 2014; Wu et al. 2013; Doudna and Charpentier 2014). Особенностью техники редактирования генома является специфичность мишени CRISPR- Cas9, связанная с комплементарностью ДНК и sgRNA, дающая большую возможность конструирования реагентов для нокаута генов. Система используется для создания нокаута генов *CCR5* и *C4BPB* в клетках K562 миелоидной лейкемии человека (Cho et al. 2013). Молекулярный ландшафт рака человека значительно был прояснен в последнее десятилетие. Однако, не вполне понятными остаются мутации, этиологически связанные с инициацией и прогрессированием опухоли. Было продемонстрировано, что система может быть использована на модели комплексных генетических заболеваний, таких как рак, для выявления множественных мутаций. Cas9 позволяет выявлять одновременно множество генных локусов путем одновременной доставки комбинации sgRNA в интересующие клетки (Zhou et al. 2014a; Wang et al. 2013; Li et al. 2013b).

Sanchez-Rivera et al. (2014) разработали новый подход для быстрого исследования функций генов-кандидатов на мышинной модели рака. Была дана функциональная характеристика генов супрессоров опухоли, включая Pten и Arc (с установленной функцией подавления рака языка человека), что продемонстрировано на мышинной модели рака языка ассоциированной с онкогенами Kras(G12D). Cre-зависимая соматическая активация Kras(G12D) в комбинации с CRISPR- Cas9 опосредованным редактированием генов супрессоров опухоли в результате привела к развитию аденокарциномы языка с явными гистопатологическими и молекулярными признаками.

Heckl et al. (2014) создали модель острой миелоидной лейкемии с взаимодополняющими мутациями в генах кодирующих эпигенетические модификаторы, факторы транскрипции и медиаторы цитокинового сигналинга (включая Tet2, Runx1, Ezh2 и др.). Данные комбинации мутаций повторяемо выявлялись у пациентов. Доставка CRISPR- Cas9 системы с помощью лентивирусного вектора, приводила к мутациям с выключением указанных генов, обладающих функцией подавления опухоли, в результате включались пять генов в простых гемопоэтических клетках мышей, что приводило к миелоидной малигнизации и разрастанию.

Итак, CRISPR- Cas9 позволяет в один шаг генерировать мутации в нескольких генах, делает возможной реализацию подходов к изучению *in vivo* взаимодействия генов и позволяет конструировать широкий ряд моделей рака *in vivo*.

4. Использование CRISPR-Cas9 для коррекции генома

Концептуально, большинство подходов, направленных на лечение генетических заболеваний человека, заключаются в коррекции мутаций, вызывающих заболевания, путем генной терапии. CRISPR- Cas9 геномное редактирование было успешно применено для коррекции CFTR-локуса путем гомологичной рекомбинации в культивируемых интестинальных стволовых клетках пациентов с фиброзом мочевого пузыря (Schwank et al. 2013). В результате наблюдалось ослабление проявлений наследственного заболевания, в первую очередь влияющее на дыхательную и пищеварительную системы. Скорректированный ген экспрессировался и был полностью функционально активен. Это исследование показывает выполнимость коррекции генов в первичных стволовых клетках, полученных от пациентов с моногенным наследственным дефектом, и предопределяет потенциальную стратегию будущей генной терапии пациентов с фиброзом мочевого пузыря (Schwank et al. 2013).

Yin et al. (2014) достигли CRISPR- Cas9 опосредованной коррекции *Fah* мутации в гепатоцитах на мышинной модели наследственного заболевания людей тирозинемии, редкого состояния, возникающего в результате отсутствия фермента (FAH), необходимого для метаболизма тирозина. Доставка компонентов была осуществлена путем введения в вену, что привело к запуску экспрессии протеина *Fah* в клетках печени в небольшой пропорции (1:250). Индуцированное лекарственными препаратами увеличение количества *Fah*-позитивных гепатоцитов восстановило функцию печени. Это, в первую очередь, показывает, что редактирование генома с CRISPR- Cas9 системой дает возможность корректировать мутации и фенотип у взрослых мышей (Yin et al. 2014). Несмотря на определенные успехи, частота коррекции остается значительно низкой, составляя около 0,4% из всех клеток печени мыши. При этом возрастание откорректированных клеток происходит на 33%. При большинстве заболеваний не наблюдается селекции восстановленных клеток, поэтому необходимо повышение эффективности использования системы CRISPR- Cas9. Кроме того метод доставки CRISPR- Cas9 системы заключается в гидродинамической инъекции большого объема, что требует модификации при использовании у человека.

Niu et al. (2014) продемонстрировали, что точное ген направленное использование системы CRISPR- Cas9 у *Cynomolgus monkeys* может быть достигнуто одновременным введением Cas9 mRNA и sgRNAs в эмбрион в стадии одной клетки. Авторы отметили отсутствие эффекта «выключенной» мишени. Это достижение имеет немалое значение, поскольку обезьяны являются модельным видом для изучения болезней человека и разработки терапевтических подходов.

5. Заключение. Разработка технологий будущего

Система CRISPR-Cas9 позволяет сравнительно легко осуществлять быстрое редактирование генома у разных видов с очень высокой эффективностью и специфичностью (Sander and Joung 2014; Gupta and Musunuru 2014; Doudna and Charpentier 2014). Потенциал этого метода редактирования генома заключается в выяснении функции генов в биологических процессах и патологических состояниях, а также для коррекции генных дефектов. Действительно, успешная коррекция с помощью CRISPR-Cas9 системы генных мутаций в мышинных моделях наследственных заболеваний человека и в первичных взрослых стволовых клетках, полученных от пациентов с моногенными наследственными дефектами, также может лежать в основе генных подходов терапии будущего. Однако, необходимо улучшение эффективности CRISPR-редактирования и методов доставки для широкого терапевтического применения, в частности, для увеличения скорости коррекции генов и уменьшения последствий эффекта вне цели (off-target) (Zhang et al. 2014; Wu et al. 2013; Doudna and Charpentier 2014).

Пожалуй, наибольшее препятствие для потенциального использования технологии CRISPR-Cas9 в терапии является тот факт, что Cas9 может сделать вырезки сайтов вне цели в геноме, и как результат потенциально может привести к появлению вредных мутаций (Sander and Joung 2014; Doudna and Charpentier 2014). Несколько групп работают над повышением специфичности фермента Cas9 для устранения этого эффекта (Gupta and Musunuru 2014; Choet al. 2014).

Для доставки CRISPR-Cas9 используются техники основе на инъекций ДНК и РНК, такие как инъекции плазмид, экспрессирующих Cas9 и sgRNA и инъекция CRISPR-компонентов, таких как РНК. Развитие или улучшение альтернативных способов доставки системы CRISPR-Cas9 в клетки в культуре и в организм, имеет важное значение для использования в терапевтических целях. Они могут включать в себя наночастицы, разработанные для доставки нуклеиновой кислоты или вирусных векторов, ранее успешно используемые с другими системами редактирования генома для лечения генетических заболеваний печени (Gaj et al. 2013).

Были разработаны библиотеки CRISPR-Cas9 нокаута предоставляющие возможность нокаутировать каждый ген в геноме, что позволяет для более глубокого понимания роли, которую играет интересующий гена в норме и при патологических процессах. Библиотеки CRISPR-Cas9 нокаута также потенциально могут быть использованы для определения интересующих регионов в некодирующем геноме, такие как промоторы. Кроме того, использование CRISPR-Cas9 для исследований (Wang и др. 2014) позволит провести крупномасштабный скрининг мишеней для лекарственных препаратов.

Было высказано предположение, что CRISPR-Cas9 редактирование генома может быть использовано в будущем для исправления наследственных семейных мутаций в эмбрионах, путем изменения ДНК эмбриона перед имплантацией. С применением системы CRISPR-Cas9 были созданы генетически модифицированные обезьяны (Niu et al. 2014), что предполагает отсутствие технических барьеров к использованию инструментов редактирования генома, чтобы изменить эмбрионы человека. Тем не менее, существуют глубокие этические вопросы, касающиеся любых генетических манипуляций с эмбрионами человека и проблем безопасности, связанных с CRISPR-Cas9, где важнейшим является эффект «вне цели», которые должны быть полностью решены. Несмотря на трудности, огромные достижения в области генной терапии и редактирования генома, достигнутые за последние несколько лет, продолжают путь развития инновационных методов лечения наследственных заболеваний человека, возвращая надежду пациентам.

Таким образом, исследования CRISPR-Cas9-системы позволили разработать современную, высокоточную, сравнительно простую в исполнении и воспроизводимую молекулярно-генетическую технологию редактирования генома живых клеток и организмов. Использование этой системы открывает перспективы установления функциональной роли различных генов и разработки подходов к лечению ряда генетических, вирусных и онкологических заболеваний.

Список литературы:

1. Ain QU, Chung JY, Kim Y-H (2014) Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. J Control Release. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.036
2. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315:1709-1712
3. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology 151:2551-2561
4. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339:819-823

5. Davis L, Maizels N (2014) Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from canonical double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci* 111:E924-E932
6. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K (2013) Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell* 12:393-394
7. Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. doi:10.1126/science.1258096
8. Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiacovo MP, Church GM, Calarco JA (2013) Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10:741-743
9. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31:822-826
10. Gaj T, Guo J, Kato Y, Sirk SJ, Barbas CF (2012) Targeted gene knock-out by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat Methods* 9:805-807
11. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012) Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E2579-E2586
12. Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM (2013) Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics* 194:1029-1035
13. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, Belizaire R, Puram RV, McConkey ME, Thielke A, Aster JC, Regev A, Ebert BL (2014) Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol* 32:941-946
14. Hsu Patrick D, Lander Eric S, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157:1262-1278
15. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31:827-832
16. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31:227-229
17. 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. *J Bacteriol* 169:5429-5433
18. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31:233-239
19. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821
20. Katic I, Großhans H (2013) Targeted heritable mutation and gene conversion by Cas9-CRISPR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 195:1173-1176
21. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 24:1012-1019
22. Li D, Qiu Z, Shao Y, Chen Y, Guan Y, Liu M, Li Y, Gao N, Wang L, Lu X, Zhao Y, Liu M (2013a) Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*

23. Li W, Teng F, Li T, Zhou Q (2013b) Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol* 31:684–686
24. Maggio I, Holkers M, Liu J, Janssen JM, Chen X, Goncalves MAFV (2014) Adenoviral vector delivery of RNA-guided CRISPR/Cas9 nuclease complexes induces targeted mutagenesis in a diverse array of human cells. *Sci Rep*. doi:10.1038/srep05105
25. Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV (2002) A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res* 30:482–496
26. Makarova KS, Aravind L, Wolf Y, Koonin E (2011a) Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol Direct* 6:38
27. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013c) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823–826
28. Mladenov E, Iliakis G (2011) Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res* 711:61–72
29. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156:935–949
30. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, Kang Y, Zhao X, Si W, Li W, Xiang AP, 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* 156:836–843
31. 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 Res* 24:1020–1027
32. Sanchez-Rivera FJ, Papagiannakopoulos T, Romero R, Tammela T, Bauer R, Bhutkar A, Joshi NS, Subbaraj L, Bronson RT, Xue W, Jacks T (2014) Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature* 516:428–431
33. Sander JD, Joung JK (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* 32:347–355
34. Schwank G, Koo B-K, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, Sasaki N, Boymans S, Cuppen E, van der Ent CK, Nieuwenhuis EE, Beekman JM, Clevers H (2013) Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13:653–658
35. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343:84–87
36. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507:62–67
37. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B (2014) Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 12:479–492
38. Waaijers S, Portegijs V, Kerver J, Lemmens BBLG, Tijsterman M, van den Heuvel S, Boxem M (2013) CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 195:1187–1191
39. Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R (2013) One-step

generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153:910–918

40. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343:80–84

41. 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* 13:659–662

42. Yin H, Xue W, Chen S, Bogorad RL, Benedetti E, Grompe M, Koteli-ansky V, Sharp PA, Jacks T, Anderson DG (2014) Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol* 32:551–553

43. Yu Z, Ren M, Wang Z, Zhang B, Rong YS, Jiao R, Gao G (2013) Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/ Cas9 in drosophila. *Genetics* 195:289–291

44. Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 23:R40–R46

45. Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, Zhang N, Zhu K, Xu J, Hu B, Leng Q, Huang X (2014a) One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 46:49–55