

【述评】

CRISPR/Cas9 系统在视网膜发育与遗传性视网膜疾病研究中的应用[△]

Application of CRISPR/Cas 9 system for the research of retinal development and inherited retinal diseases

[Key words] CRISPR/Cas9, gene editing, genetic retinal disease, development, gene therapy

[Abstract] The system of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated nuclease (Cas) 9 is an effective tool for revising the genome with great accuracy, and boost the advances in life science. By employing this system, we discover the regulation role of key gene during retina development and correct the abnormal mutation of these genes. In this paper, we summarize CRISPR-based technologies that enable mammalian genome editing and their various applications. And CRISPR/Cas9 may be a promising tool to disclosure the mechanism of retinal diseases so as to develop novel treatment for patients with retinitis pigmentosa.

【中图分类号】 R774

【关键词】 CRISPR/Cas9 技术;基因编辑;遗传性视网膜疾病;发育;基因治疗

【摘要】 CRISPR/Cas9 系统作为第三代基因编辑工具的代表,操作简便、效率高、成本低,应用前景极其广阔。该系统能够对基因组中特定的核苷酸序列切割,尤其可用于纠正机体的异常基因突变。利用该系统不仅可阐述视网膜发育过程关键基因的调控功能,以及视网膜变性过程中相关信号通路改变的分子机制,更为重要的是运用该系统可修复异常的基因突变。本文主要论述 CRISPR/Cas9 系统在人类视网膜发育及遗传性视网膜变性疾病发病机制研究中的应用,以及在视网膜变性疾病患者个体化基因治疗方面的应用前景。

遗传性视网膜疾病主要包括视网膜色素变性、脉络膜视网膜变性、Leber 先天性黑矇等。已确定 200 多种导致视网膜感光细胞发育异常以及变性的基因异常突变,视网膜感光细胞的缺失或功能异常是视网膜变性疾病患者视力

1 CRISPR/Cas9 系统的特点

早期,基因编辑技术是利用同源重组的基因打靶技术,其效率低下。作为第一代人工核酸内切酶锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease,ZFN)的出现改变了局面。随着特异性更强的第二代人工核酸酶类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease,TALEN)的出现,其迅速替代了第一代 ZFN。2013 年,一种从细菌获得性免疫系统改造而成的成簇规律间隔短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)/以及 CRISPR 相关蛋白 9(CRISPR-associated protein 9,Cas9)成为第三代人工核酸酶的代表,可在真核细胞中实现高度灵活且特异的基因组编辑^[4]。其特点是:(1)质粒构建简单,实验周期短,制作成本低。CRISPR/Cas9 系统是一个由核酸

From the Department of Ophthalmology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

损失的主要因素^[1]。目前常用的神经保护等措施在一定程度上可延缓视网膜感光细胞变性的速度,却无法完全阻止变性的进展^[2]。研究者致力于开发出特异的修复视网膜细胞异常突变基因的方法,恢复基因的正常功能,从而治愈该类疾病。具有构成简单、作用效率高的第三代基因编辑技术——被称为“魔剪”的 CRISPR/Cas9 系统的出现,为该类疾病发病机制的研究及治疗提供了可能。CRISPR/Cas9 系统能够对基因组中特定的核苷酸序列进行切割,使突变的基因失活或者纠正突变基因,开启了基因组定点编辑的新时代^[3]。利用该系统可有效解析视网膜发育过程中关键基因的调控功能,以及视网膜变性过程中相关信号通路改变的分子机制;并且运用该系统可修复异常的基因突变,为治疗遗传性视网膜变性疾病提供了有力手段。

和蛋白质组成的核糖核蛋白复合物,它对靶点的识别依赖于核酸对核酸的识别,打靶一个基因位点只需在原有载体的基础上替换 20~30 bp 的核苷酸,一步简单的分子克隆实验就可完成,构建过程相对于 ZFN 和 TALEN 更加简单、快捷,适合规模化、高通量的组装^[3,5]; (2) 作用效率高: CRISPR/Cas9 系统切割 DNA 的效率要高于 TALEN,可对基因组的多个基因位点进行切割,一次性敲除多个基因^[3,5-6]; ZNF 和 TALEN 要实现一次多个位点的切割必须同时制备多对 ZFN 和 TALEN,而且目前体外合成的单链 DNA 长度有限,很难在一个模板中同时包含多个突变位点^[7-9]; (3) 不受表观遗传限制: CRISPR/Cas9 系统介导的 DNA 切割功能不受 DNA 甲基化的影响,而 DNA 甲基化限制了 ZFN 和 TALEN 的应用^[10]; (4) CRISPR/Cas9 系统的靶点在基因组中拥有非常高的分布频率,在基因组中几乎每 8 bp 就有一个靶点。

2 CRISPR/Cas9 系统在视网膜神经细胞发育机制中的应用

在视网膜发育过程中, Otx2、Crx、Nrl、Nr2e3、Ror β 、Sp4、Gnat1 和 Tr β 2 等转录调控因子对于视网膜祖细胞的形成及细胞分化命运决定中发挥关键的调控作用^[11-12]。先前的研究利用 RNAi 技术及基因敲除技术干预相关基因功能,越来越多的研究提示,这些基因间形成复杂的调控网络,需要高效地同时干预很多基因的功能,而上述技术尚不能达到如此高效的研究目的。值得欣慰的是, CRISPR/Cas9 系统能一次干预多个基因的功能,为研究视网膜发育的基因调控网络提供了强大的工具^[13]。通过改进 CRISPR/Cas9 系统,将无核酸酶活性的 Cas9 (dCas9) 蛋白与转录效应蛋白结合,在活细胞中同时有效激活 (CRISPR-ON 激活系统^[14]) 或抑制 (CRISPRi 抑制系统^[15]) 任一或者多个基因的功能^[16],促进了人类对整个基因组的功能筛选以及特定疾病的基因鉴定^[17-18]。

CRISPRi 抑制系统可通过对位点的识别在转录水平抑制基因的表达,能够同时有效干扰多个基因表达。dCas9 蛋白与表观修饰酶融合后,还可以调控组蛋白的甲基化、去甲基化、乙酰化及去乙酰化,从而发挥表观调控的作用^[19-20]。也可以利用来源不同的 Cas9 与多个 gRNA 同时对多个不同基因组位点进行不同颜色的标记,以揭示复杂染色体的结构与组装^[21]。目前已有学者通过运用改造的 CRISPR/Cas9 系统解析视网膜发育调控的内在机制。以往的研究发现, Ascl1a 基因在视网膜 Müller 胶质细胞的分化及调控该细胞参与视网膜再生过程中发挥调控作用,然而以往的技术尚不能根据视网膜发育的不同阶段干扰该基因的功能,也不能在空间及时间上精确解析该基因的功能^[22]。YIN 等^[23]利用 CRISPR/Cas9 系统在斑马鱼眼中实现了 Ascl1a 基因的条件

性敲除,发现干扰该基因后,视网膜损伤后的感光细胞再生受到抑制,其对斑马鱼视网膜光感受器的再生机制研究提供了新的启示。Ascl1a 基因的功能在成年小鼠及人类视网膜中呈关闭状态,可能是导致哺乳类视网膜感光细胞不能再生的原因。TOM REH 研究小组通过基因操作诱导激活小鼠视网膜 Müller 细胞该基因的功能,联合应用组蛋白的去乙酰化酶抑制剂,发现视网膜感光细胞受损后可由 Müller 细胞再生^[24]。未来运用 CRISPR-ON 激活系统激活视网膜变性患者 Müller 细胞的 Ascl1a 基因,同时通过 dCas9 蛋白进行组蛋白的乙酰化修饰,可能有效再生感光细胞,这为已经有感光细胞损失的患者带来了治愈的可能。KATO 等^[25]在 2010 年发现作为 Otx2 下游的转录调控因子 Blimp1,在视网膜祖细胞向感光细胞终末分化的调控过程中发挥关键作用。WANG 等^[26]通过 CRISPR/Cas9 系统删除了基因组中的 DNA 片段,鉴定了神经系统中 Blimp1 增强子的存在,阐述了增强子在 Blimp1 基因中的重要作用,并进一步阐明了 Blimp1 转录因子在视网膜感光细胞及双极细胞命运决定中的关键作用。应用 CRISPR/Cas9 技术与显微注射技术敲除眼畸形相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, Mitf) 的基因,获得 Mitf 双等位基因缺失的广西巴马小型猪,可用于研究遗传性视网膜病变的机制及治疗方案^[27-28]。

随着研究的深入,发现多种基因形成的调控网络负责调控视网膜感光细胞发育与正常功能维持^[29]。CRISPR/Cas9 技术在规模化研究基因功能等方面正发挥着重要作用^[30]。目前,多个实验室构建出可以涵盖人类基因组所有基因的 sgRNA 文库,并且建立了功能基因筛选平台以及通过高通量测序技术分析数据的一整套技术路线^[31-33]。如果将编码这些 sgRNA 的基因和编码 Cas9 蛋白的基因一起转运到人胚胎干细胞中,利用体外三维培养定向分化为视杯的方案,结合高通量单细胞测序技术,可精准、高效筛选出维持人类视网膜感光细胞发育及正常功能相关的基因,并可鉴定出感光细胞变性相关疾病的异常基因^[34-35]。

3 CRISPR/Cas9 系统在干细胞定向分化为视网膜感光细胞基因调控机制中的应用

视网膜各类细胞在发育过程中的系谱来源、特征以及体外控制多能干细胞定向诱导分化为感光细胞是该领域的一个研究热点^[36]。运用新发展出的一种称为基因组编辑用于谱系追踪 (genome editing of synthetic target arrays for lineage tracing, GESTALT) 的方法, CRISPR/Cas9 技术也可用于细胞分化过程中谱系示踪。该方法在一系列 DNA 条码内通过 CRISPR/Cas9 基因编辑产生组合多样性的突变,这些突变会在细胞分裂过程中积累,结合单细胞深度

测序技术,即可根据编辑后的条码模式推测出细胞之间的谱系关系^[37]。FRIEDA等^[38]将单细胞成像与CRISPR技术结合,开发出一种称为MEMOIR(memory by engineered mutagenesis with optical in situ readout)的技术,用于谱系示踪,实现原位读出信息。上述两种技术有助于理解视网膜组织发育过程每种细胞的具体来源及系谱特征,深度解析视网膜发育过程的具体细胞路径,为体外控制多能干细胞向视网膜感光细胞等细胞特异性分化提供理论依据。Sloan-Kettering研究所人员初步尝试在人类多能干细胞中通过定点插入Dox诱导型的Cas9,使CRISPR/Cas9介导的基因组编辑在时间上变得可控,甚至可以在干细胞分化的不同阶段诱导特定基因表达,这对于指导人干细胞体外定向诱导分化为视网膜视锥细胞或者视杆细胞提供了新的思路^[39]。

4 CRISPR/Cas9系统在修复眼部异常基因突变中的研究进展

CRISPR/Cas9系统的一大优势就是可直接修复患病个体的异常基因突变,因此在人类遗传病的基因治疗方面逐渐展现出广阔的应用前景^[40-41]。CRISPR/Cas9系统与人多能干细胞尤其是iPS的结合必将快速推动疾病模型、临床研究的研究,必然会对人类遗传性疾病的治疗产生巨大的影响^[6]。中科院上海生化与细胞所的研究人员首次利用CRISPR-Cas9系统治疗小鼠先天性白内障,对Crygc基因显性突变的小鼠进行基因治疗,使其能够生育并且能将修正后的Crygc基因传给下一代的健康小鼠,此项成果为CRISPR/Cas9系统用于遗传性视网膜疾病的基因治疗提供了新思路与依据^[42]。PAQUET等^[43]开发出基因组无痕编辑技术,可以精确高效地选择性引入单/双等位基因序列改变,实现对基因的精确无痕编辑。在器官移植领域,利用CRISPR-Cas9技术已成功去除多种猪器官中的猪内源性反转录病毒^[44],减少了移植后排斥,使异种器官移植成为可能。干细胞移植后排斥是影响细胞存活的重要因素,研究显示即使自体iPS移植后也存在免疫排斥的问题。应用CRISPR/Cas9系统改造成体组织干细胞或者具有增殖活性的细胞,从而精确无痕纠正异常基因突变,移植入视网膜后替代功能异常的细胞。

如果侧重于功能重建而非基因纠正,CRISPR/Cas9系统同样适用于特定的分化终末的体细胞,拓展了该系统的临床应用前景,尤其是神经系统的疾病治疗^[45]。以往的技术不能有效插入DNA序列进入终末分化细胞。SUZUKI等^[46]利用CRISPR/Cas9系统,采用同源非依赖性靶向整合技术,可使DNA插入分裂及不分裂的细胞中,并且在视网膜色素变性大鼠模型中进行了证实,可纠正视网膜细胞基因的异常突变,显著提升视网膜色素变性大鼠的视功能。YU等^[47]应用CRISPR/Cas9系统阻止了小鼠视

网膜变性的进展。利用AAV携带CRISPR/Cas9修复基因突变的视杆细胞,使其功能恢复正常,这一技术成功地使两种不同类型的患有视网膜退行性疾病小鼠的视力恢复正常^[48]。还有研究报道运用该系统修复视蛋白基因S334ter突变后可阻止视网膜变性进程,保存视功能^[49]。数位CRISPR/Cas9研究领域的专家创办了一家名为Editas Medicine的公司,旨在研究直接修改与疾病有关的基因来治疗疾病的方法,展示了利用该系统编辑非人灵长类动物视网膜中的CEP290基因(Leber先天性黑矇10型,LCA-10)^[50],可能替代传统药物。上述实验为遗传性视网膜变性患者的早期治疗提供了可能,通过干预后可有效保存患者的视功能。

运用CRISPR/Cas9系统可抑制视网膜VEGF-A表达分泌,抑制新生血管生成^[51-52]。有学者使用AAV感染方法治疗小鼠视网膜变性,显著减少了脉络膜新生血管面积^[53]。上述研究提示,CRISPR/Cas9系统可能被用于体内抑制异常基因突变导致新生血管生成相关的眼底疾病。

5 CRISPR/Cas9系统应用于临床遗传性视网膜疾病基因治疗前需解决的关键问题

虽然CRISPR/Cas9技术在基因编辑方面有巨大潜力,但同时也应注意运用其进行基因组编辑可能带来的问题。在CRISPR/Cas9技术应用于临床患者基因治疗前有些关键问题尚需解决。

(1)如何有效地将Cas9基因组编辑质粒准确地靶向运输到眼部特定的细胞和组织中,实现精确导向的基因治疗。慢性病毒载体介导的组成型表达可能提高基因编辑效率,但是脱靶效应会升高,还可能激活原癌基因,不适合于基因治疗^[10,54]。AAV载体、纳米颗粒和脂质体介导的瞬时表达足以介导有效的基因组编辑,尤其是纳米颗粒或脂质体可以包裹按一定比例配制的表达Cas9的mRNA和sgRNA,作为药物被摄入体内,可有效控制剂量,并且降低机体对外来刺激的免疫反应,非常有望作为载体运用于人体^[55-56]。需要指出的是,眼睛作为一个相对封闭的免疫赦免器官,药物注射后可以在一定时间内维持有效的浓度,尤其是视网膜疾病特别适合该类基因治疗方法的应用。

(2)脱靶效应是所有基因组定点编辑技术不可避免的问题,sgRNA与非靶点DNA序列错配,引入非预期的基因突变,严重制约了CRISPR/Cas9基因编辑技术的应用^[57]。染色体免疫共沉淀和高通量测序相结合(ChIP-seq),可以对CRISPR/Cas9系统的可能脱靶位点进行分析,预测脱靶位点。研究者致力于改进CRISPR/Cas9系统来降低脱靶效应的发生:①提高sgRNA序列设计的特异性^[3];②改造Cas9蛋白:改造编码Cas9蛋白的基因,调控其对PAM序列的识别,增强不同细胞的适用性,降低脱靶

效应^[58]；通过将 Cas9 蛋白的核酸酶结构域突变，对靶向 DNA 的单链进行切割，通过设计两条不同识别序列的 sgRNA 完成 DNA 双链切割，显著降低脱靶效应^[10,59-60]；融合蛋白 dCas9-Fok I 也可有效降低脱靶效应^[61]；③开发Ⅲ型 CRISPR/Cas 系统，其切割 DNA 双链不受 PAM 限制，靶位点选择时更准确。

(3)研究者期望借助基因编辑来修复胚胎中的突变基因，以避免疾病发生，但该方式获得的突变体多存在马赛克现象^[62]。CRISPR/Cas9 系统对受精卵进行基因编辑时，对不同卵裂球的编辑能力不同，从而出现带有不同编辑类型的细胞的嵌合个体。为避免镶嵌现象出现，必须使 Cas9 蛋白在细胞基因组第 1 次复制前发挥作用，且之后不再发挥作用^[63]。

(4)除了免疫能力外，CRISPR 还可能更多其他的功能，如增强细菌毒力等功能尚未完全阐明^[64]。CRISPR 既然具有如此重要的功能，为何大部分细菌都丢失了 CRISPR 系统？应用这个系统是否会带来严重的细胞毒性、干扰中枢神经系统及其他不良反应，这些问题在将其应用于临床之前需要解决。

6 结语

虽然目前 CRISPR/Cas9 系统在脱靶率及安全性等方面仍存在一些问题，但随着研究的逐步深入，这些问题如果得到合理解决，在精准医疗方面必将扮演更加重要的角色。国内华西医院已开启全球首个 CRISPR/Cas9 技术的人体试验^[65]。该试验针对非小细胞肺癌，计划从患者体内分离出 T 细胞后，应用 CRISPR/Cas9 技术将抑制免疫功能的 PD-1 基因在体外进行敲除，之后扩增并回输患者体内进行抗肿瘤治疗。除此之外，国内外多家实验室也竞相计划开展临床试验。相信随着 CRISPR/Cas 9 系统结构与功能研究的进一步完善，或许在不久的将来，将其用于人视网膜遗传疾病的治疗，对于改善遗传性视网膜变性患者视功能将是一个非常重要的治疗措施。

参考文献

- [1] VELERI S, LAZAR CH, CHANG B, SIEVING PA, BANIN E, SWAROOP A. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(2): 109-129.
- [2] RATNAPRIYA R, SWAROOP A. Genetic architecture of retinal and macular degenerative diseases: the promise and challenges of next-generation sequencing [J]. *Genome Med*, 2013, 5(10): 84.
- [3] CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [4] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(696): 816-821.
- [5] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, AACH JA, DICARLO JE, NORVILLE JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [6] DING QR, REGAN SN, XIA YL, OOSTROM LA, COWAN CA, MUSUNURU K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with

- CRISPRs [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 393-394.
- [7] LI W, TENG F, LI T, ZHOU Q. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 684-686.
- [8] WANG HY, YANG H, SHIVALILA CS, DAWLATY MM, CHENG AW, ZHANG F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [9] YANG H, WANG HY, SHIVALILA CS, CHENG AW, SHI LY, JAENISCH R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-1379.
- [10] HSU PD, SCOTT DA, WEINSTEIN JA, RAN FA, KONERMANN S, AGARWALA V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 827-832.
- [11] HOLT R, BROWN L, BROADGATE S, BUTLER R, JAGANNATH A, DOWNES S, et al. Identification of rod- and cone-specific expression signatures to identify candidate genes for retinal disease [J]. *Exp Eye Res*, 2015, 132: 161-173.
- [12] ZAGOZEWSKI JL, ZHANG Q, PINTO VI, WIGLE JT, EISENSTAT DD. The role of homeobox genes in retinal development and disease [J]. *Dev Biol*, 2014, 393(2): 195-208.
- [13] KARUNAKARAN DK, AL SEESI S, BANDAY AR, BAUMGARTNER M, OLTROF A, LEMOINE C, et al. Network-based bioinformatics analysis of spatio-temporal RNA-Seq data reveals transcriptional programs underpinning normal and aberrant retinal development [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(5): 2016-2822.
- [14] CHENG AW, WANG HY, YANG H, SHI LY, KATZ Y, THEUNISSEN TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system [J]. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1163-1171.
- [15] ZALATAN JG, LEE ME, ALMEIDA R, GILBERT LA, WHITEHEAD EH, LA RUSSA M, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds [J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 339-350.
- [16] PETERS JM, COLAVIN A, SHI H, CZARNY TL, LARSON MH, WONG S, et al. A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1493-1506.
- [17] KONERMANN S, BRIGHAM MD, TREVINO AE, JOUNG J, ABUDAYYEH OO, BARCENA C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517(7536): 583-588.
- [18] FULCO CP, MUNSCHAUER M, ANYOHA RA, GROSSMAN SR, PEREZ EM, KANE M, et al. Systematic mapping of functional enhancer-promoter connections with CRISPR interference [J]. *Science*, 2016, 354(6313): 769-773.
- [19] HILTON IB, D'IPPOLITO AM, VOCKLEY CM, THAKORE PI, CRAWFORD GE, REDDY TE, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 510-517.
- [20] KEARNS NA, PHAM H, TABAK B, GENG RM, SILVERSTEIN NJ, GARBER M, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(5): 401-403.
- [21] CHEN BH, GILBERT LA, CIMINI BA, SCHNITZBAUER J, ZHANG W, LI GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491.
- [22] RAMACHANDRAN R, FAUSETT BV, GOLDMAN D. Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(11): 1101-1107.
- [23] YIN LL, MADDISON LA, LI MY, KARA NA, VARSHNEY GK, BURGESS SM, et al. Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs [J]. *Genetics*, 2015, 200(2): 431-441.
- [24] JORSTAD NL, WILKEN MS, RIMES WN, VANDENBOSCH LS, YOSHIMATSU TA, RIEKE F, et al. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 548(7665): 103-107.
- [25] KATO H, OMORI Y, ONISHI A, SATO S, KONDO M, FURUKAWA T. Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper

- photoreceptor development [J]. *J. Neurosci.*, 2010, 30 (19): 6515-6526.
- [26] WANG S, SENDEL C, EMERSON MM, CEPKO CL. A gene regulatory network controls the binary fate decision of rod and bipolar cells in the vertebrate retina [J]. *Dev Cell*, 2014, 30 (5): 513-527.
- [27] ZHOU XQ, XIN JG, FAN NA, ZOU QJ, HUANG J, OUYANG Z, et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72 (6): 1175-1184.
- [28] WANG XL, ZHOU JW, CAO CW, HUANG JA, WANG YF, ZHENG QT, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13348.
- [29] KAEWKHAW R, KAYA KD, BROOKS M, HOMMA K, ZOU JZ, CHAITANKAR V, et al. Transcriptome dynamics of developing photoreceptors in Three-Dimensional retina cultures recapitulates temporal sequence of human cone and rod differentiation revealing cell surface markers and gene networks [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (12): 3504-3518.
- [30] FINDLAY GM, BOYLE EA, HAUSE RJ, KLEIN JC, SHENDURE J. Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair [J]. *Nature*, 2014, 513 (7516): 120-123.
- [31] SHALEM O, SANJANA NE, HARTENIAN E, SHI X, SCOTT DA, MIKKELSEN TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 84-87.
- [32] WANG T, WEI JJ, SABATINI DM, LANDER ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 80-84.
- [33] ZHOU YE, ZHU SY, CAI CZ, YUAN PF, LI CM, HUANG YY, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells [J]. *Nature*, 2014, 509 (751): 487-491.
- [34] GILBERT LA, HORLBECK MA, ADAMSON B, VILLALTA JE, CHEN YW, WHITEHEAD EH, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation [J]. *Cell*, 2014, 159 (3): 647-661.
- [35] WANG T, BIRSOY K, HUGHES NW, KRUPCZAK KM, POST Y, WEI JJ, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome [J]. *Science*, 2015, 350 (6264): 1096-1101.
- [36] DUONG TT, VASIREDDY V, MILLS JA. Retinas in a dish peek into inherited retinal degeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18 (6): 688-689.
- [37] MCKENNA A, FINDLAY GM, GAGNON JA, HORWITZ MS, SCHIER AF, SHENDURE J. Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing [J]. *Science*, 2016, 353 (6298): aaf7909.
- [38] FRIEDA KL, LINTON JM, HORMOZ S, CHOI J, CHOW K, SINGER ZS, et al. Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells [J]. *Nature*, 2017, 541 (7635): 107-111.
- [39] GONZALEZ F, ZHU Z, SHI ZD, LELLI K, VERMA N, LI QV, et al. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15 (2): 215-226.
- [40] YIN H, XUE W, CHEN SD, BOGORAD RL, GROMPE M, KOTELIANSKY V, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (6): 551-553.
- [41] KOMOR AC, KIM YB, PACKER MS, ZURIS JA, LIU DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533 (763): 420-424.
- [42] WU YX, LIANG D, WANG YH, BAI MZ, TANG W, BAO SM, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13 (6): 659-662.
- [43] PAQUET D, KWART D, CHEN A, SPROUL A, JACOB S, TEO S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9 [J]. *Nature*, 2016, 533 (761): 125-129.
- [44] YANG LH, GUELL M, NIU D, GEORGE H, LESHA E, GRISHIN D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs) [J]. *Science*, 2015, 350 (6264): 1101-1104.
- [45] LONG C, AMOASII L, MIREAULT AA, MCANALLY JR, LI H, SANCHEZ-ORTIZ E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy [J]. *Science*, 2016, 351 (6271): 400-403.
- [46] SUZUKI K, TSUNEKAWA Y, HERNANDEZ-BENITEZ R, WU J, ZHU J, KIM EJ, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, 540 (7631): 144-149.
- [47] YU W, MOOKHERJEE S, CHAITANKAR V, HIRIYANNA S, KIM JW, BROOKS M, et al. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14716.
- [48] ZHU J, MING C, FU X, DUAN Y, HOANG DA, RUTGARD J, et al. Gene and mutation independent therapy via CRISPR-Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors [J]. *Cell Res*, 2017, 27 (6): 830-833.
- [49] BAKONDI B, LV W, LU B, JONES MK, TSAI Y, KIM KJ, et al. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa [J]. *Mol Ther*, 2016, 24 (3): 556-563.
- [50] RUAN GX, BARRY E, YU D, LUKASON M, CHENG SH, SCARIA A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for leber congenital amaurosis 10 [J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (2): 331-341.
- [51] YIU G, TIEU E, NGUYEN AT, WONG BA. Genomic disruption of VEGF-A expression in human retinal pigment epithelial cells using CRISPR-Cas9 endonuclease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57 (13): 5490-5497.
- [52] HUANG XG, ZHOU GH, WU WY, MA GA, MUKAI S, LEI HT. Editing VEGFR2 blocks VEGF-induced activation of Akt and tube formation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58 (2): 1228-1236.
- [53] KIM E, KOO T, PARK SW, KIM DA, CHO HY, SONG DW, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14500.
- [54] NISHIMASU H, RAN FA, HSU PD, KONERMANN S, SHEHATA SI, DOHMAE N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, 156 (5): 935-949.
- [55] ZURIS JA, THOMPSON DB, SHU Y, GUILINGER JP, BESSER JL, HU JH, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33 (1): 73-80.
- [56] KORMANN MS, HASENPUSCH G, ANEJA MK, FLEMMER AW, HERBER-JONAT SA, MAYS LE, et al. Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mRNA in mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (2): 154-157.
- [57] RAMALINGAM S, ANNALURU N, CHANDRASEGARAN S. A CRISPR way to engineer the human genome [J]. *Genome Biol*, 2013, 14 (2): 107.
- [58] KLEINSTIVER BP, PREW MS, TSAI SQ, NGUYEN NT, ZHENG ZL, GONZALES AP, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities [J]. *Nature*, 2015, 523 (7561): 481-485.
- [59] RAN FA, HSU PD, LIN CY, GOOTENBERG JS, KONERMANN S, TREVINO AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. *Cell*, 2013, 154 (6): 1380-1389.
- [60] FU YF, SANDER JD, REYON D, CASCIO VM, JOUNG JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (3): 279-284.
- [61] TSAI SQ, WYVEKENS N, KHAYTER C, FODEN JA, THAPAR V, REYON D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (6): 569-576.
- [62] KALEBIC N, TAVERNA E, TAVANO S, WONG FK, SUCHOLD D, WINKLER S, et al. CRISPR/Cas9-induced disruption of gene expression in mouse embryonic brain and single neural stem cells *in vivo* [J]. *EMBO Rep*, 2016, 17 (3): 338-348.
- [63] HASHIMOTO M, YAMASHITA Y, TAKEMOTO T. Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse [J]. *Dev Biol*, 2016, 418 (1): 1-9.
- [64] SAMPSON TR, SAROJ SD, LLEWELLYN AC, TZENG YL, WEISS DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence [J]. *Nature*, 2013, 497 (7448): 254-257.
- [65] CYRANOSKI D. CRISPR gene-editing tested in a person for the first time [J]. *Nature*, 2016, 539 (7630): 479.