

CRISPR/Cas 系统在人眼相关疾病中的应用

姜梦圆, 刘红玲

引用:姜梦圆,刘红玲. CRISPR/Cas 系统在人眼相关疾病中的应用.国际眼科杂志 2019;19(2):232-235

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81301325)

作者单位:(150001)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介:姜梦圆,在读硕士研究生,研究方向:玻璃体视网膜疾病及 PCO 的防治。

通讯作者:刘红玲,博士,主任医师,副主任,硕士研究生导师,研究方向:玻璃体视网膜疾病及 PCO 的防治.hydliuhl@163.com

收稿日期:2018-12-05 修回日期:2018-12-28

摘要

CRISPR/Cas 系统原是在细菌的免疫系统内发现的用来抵抗外源遗传物质(如噬菌体病毒)的一种防御系统。由于其精确的靶向功能,CRISPR/Cas 系统被开发成一种高效的基因编辑工具,被广泛地应用于生命科学研究的各个领域,并取得了革命性的进展。本文回顾性研究相关文献中关于 CRISPR/Cas 系统在人眼相关疾病中的应用,并进行总结。

关键词:CRISPR/Cas 系统;基因编辑技术;眼科学

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.2.10

Application of CRISPR/Cas system in human eye diseases

Meng-Yuan Jiang, Hong-Ling Liu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No.81301325)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Hong-Ling Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. hydliuhl@163.com

Received:2018-12-05 Accepted:2018-12-28

Abstract

• The CRISPR/Cas system was a defense system originally found in bacterial immune system against exogenous genetic material (such as phage virus). With the precision in its targeting function, CRISPR/Cas system has been developed into a highly efficient genome-editing tool that has been widely used in various fields of life science research and has achieved revolutionary progress. This paper reviews the relevant literature on the application of the CRISPR/Cas system in human eye diseases.

• KEYWORDS: CRISPR/Cas system; genome - editing technology; ophthalmology

Citation: Jiang MY, Liu HL. Application of CRISPR/Cas system in human eye diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019;19(2): 232-235

0 引言

目前的 DNA 编辑方法可以根据其靶向机制大致分为两组:蛋白质定向和核苷酸定向的编辑技术。锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFNs)和转录激活物样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)是研究最多的蛋白质定向 DNA 编辑技术,而 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated gene)技术是一种核苷酸定向的 DNA 编辑技术。CRISPR/Cas 技术在诱导遗传修饰方面显示了更高的效率,并且它不涉及靶特异性蛋白质,只需要调整单个 sgRNA 的短区域便可以实现靶向特异性,故较 ZFNs 和 TALENs 表现出明显的优势。此外,基于 CRISPR 的方法可以规避病毒载体能力的局限性,因此 CRISPR/Cas 系统可以广泛应用于研究及治疗各种疾病^[1-2]。研究报道 1/4~1/3 的人类疾病与遗传密切相关。现已发现的遗传性疾病约有 4000 种,其中遗传性眼病和有眼部表现的全身遗传性疾病约有 600 种^[3]。由于这些疾病的病因尚未完全阐明且无有效的治疗方法,因此严重影响患者的视力和生活质量。近几年随着 CRISPR/Cas 系统的研究和发展,遗传性眼病的致病机制在基因水平上得到进一步诠释,从而为今后应用 CRISPR/Cas 系统治疗此类疾病带来了新的希望。

1 CRISPR/Cas 系统概述

成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)是由一系列短的高度保守的正向重复序列(repeats)与长度相似的间隔序列(spacers)间隔排列组成。CRISPR 位点附近存在着一系列保守的 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated gene, Cas), Cas 基因编码的蛋白具有核酸相关的功能域。CRISPR 位点的第一个重复序列上游有 CRISPR 前导序列,即启动子,启动 CRISPR 序列的转录,转录产生的非编码 RNA 被命名为 CRISPR RNAs (crRNA)。这些 crRNA 和 Cas 蛋白共同参与 CRISPR 免疫防御过程^[4]。

1987 年,CRISPR 序列在大肠杆菌的基因组中被首次发现,随后,在其他细菌和古菌中也发现了这一特殊序列。2005 年,发现这些 CRISPR 序列和噬菌体的基因序列匹配度很高,说明 CRISPR 可能参与了微生物的免疫防御。2011 年,CRISPR/Cas 系统的分子机制被揭示;当病毒首次入侵时,细菌会将外源基因的一段序列整合到自身的

CRISPR 的间隔区;病毒二次入侵时,CRISPR 转录生成前体 crRNA (pre-crRNA),pre-crRNA 经过加工形成含有与外源基因匹配序列的 crRNA,该 crRNA 与病毒基因组的同源序列识别后,介导 Cas 蛋白结合并切割,保护自身免受入侵。直到 2012 年,Jinek 等^[5]发现了链霉菌属中的 Type II 型 CRISPR-Cas 系统,至此实现了基因编辑的重大突破。在医学领域,CRISPR/Cas9 基因编辑技术也在构建疾病模型及修复疾病模型方面显现出独特的优势。

II 型 CRISPR-Cas9 系统由 Cas9 核酸酶和单一的向导 RNA (single guide RNA) 组成。在 sgRNA 的指引下,Cas9 核酸酶对靶标 DNA 的特异性剪切主要通过识别保守的原间隔序列邻近序列 (protospacer adjacent motif, PAM) 来进行^[6]。靶标 DNA 断裂后,可以通过两种机制进行修复。如果没有同源模板则直接修复,发生非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ)。如果存在同源模板,则发生同源定向修复 (homology directed repair, HDR)^[2]。

2 CRISPR/Cas 系统在眼科学中的应用

2.1 CRISPR/Cas 系统在遗传性视网膜疾病中的应用

视网膜退行性疾病进展不可逆转,且视网膜再生潜能小,如何治疗视网膜退行性疾病成为了研究者们面临的重要挑战。遗传性视网膜退行性疾病具有不同临床表现和不同的基因突变形式,晚期由于渐进性光感受器死亡而最终出现不可逆转的失明。目前患有遗传性视网膜疾病的患者约有 2000 万人,还没有接受可靠有效的治疗。随着基因编辑技术的发展,基因和细胞治疗有望为这类疾病提供新的治疗前景^[7]。迄今为止,已经发现有 250 个基因与视网膜退行性疾病的发展相关。利用 CRISPR/Cas 系统可以对这类疾病的相关基因进行前沿性研究^[5]。

2.1.1 CRISPR/Cas 系统在 Leber 先天性黑矇的应用

Leber 先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 是一种遗传性视网膜营养不良性疾病,于 150a 前被 Theodor Leber 首次报道。LCA 主要表现为在出生时或出生后不久即出现视力丧失,钟摆样的眼球震颤,瞳孔黑矇及色素性视网膜变性^[7],其患病率约为 1/3000,约占所有遗传性视网膜营养不良的 5%。

LCA 患者最常发生突变的基因是中心体蛋白 290 kDa (CEP290) 基因,这种突变基因引起的 LCA 被称为 LCA10^[8]。在 CEP290 突变中,最常见的是内含子 26 的突变 (也称为 IVS26 突变)。Ruan 等^[8]应用 CRISPR/Cas9 系统将 CEP290 剪接突变引入到 293FT 细胞,构建了模拟 LCA10 的细胞模型。并且通过特定的 sgRNAs 和 Cas9 的组合切除 CEP290 基因中的 IVS26 突变,发现可以有效地纠正 LCA 细胞模型中的 IVS26 突变。并通过构建动物模型,发现 sgRNA 和 SpCas9 的组合可以敲除小鼠中突变的 CEP290 基因。研究者还开发了限制 SpCas9 表达的自限性 CRISPR/Cas9 系统,发现该系统仍能诱导 CEP290 的靶向缺失,同时降低了脱靶效应并提高了系统的安全性。这些研究结果为今后应用 CRISPR/Cas9 系统治疗此类疾病带来了新的希望。

诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 具有替代自体细胞的潜能。但是,对于许多遗传性

疾病的治疗可能需要移植前的基因修饰。Burnight 等^[9]通过 CRISPR/Cas9 介导的非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 切除了 LCA10 患者 iPSCs 中致病基因的 IVS26 突变,完成了 iPSCs 中的转录物和蛋白质的校正。因此 Burnight 等认为 CRISPR/Cas9 系统可以用来纠正遗传性视网膜变性的多种遗传变异。

2.1.2 CRISPR/Cas 系统在视网膜色素变性中的应用

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一种视网膜退化性疾病,常伴有夜盲症、管状视力、致盲等表现,具有高遗传性和异质性,发病率约 1/4000,并且正在成为世界范围内不可逆失明的重要原因。目前已明确 70 余种基因与这种具有不同表型的视网膜退化性疾病相关^[7,10]。

前体信使 RNA (pre-mRNA) 剪接是真核细胞中必不可少的生物学过程。许多剪接体基因中的遗传突变引起人眼相关疾病。Pre-mRNA 剪接因子——RP9 的突变易导致常染色体显性遗传性视网膜色素变性 (autosomal dominant retinitis pigmentosa, adRP)。Lv 等^[10]利用 CRISPR/Cas9 系统在体外进行 Rp9 基因敲除 (KO) 和点突变敲入 (KI),通过 MTT 方法,发现 Rp9-KI 和 Rp9-KO 细胞生长速率降低。通过 western blot 法发现 Rp9-KI 和 Rp9-KO 细胞增殖被抑制。通过体外划痕实验发现 Rp9-KI 和 Rp9-KO 细胞迁移减少。通过 RNA-Seq 的基因表达谱分析证明 RP 相关基因 Bbs2 和 Fscn2 在 Rp9-KI 和 Rp9-KO 细胞中显著下调。并通过 RT-PCR 方法发现,Rp9-KI 和 Rp9-KO 不影响 Bbs2 剪接,但 Fscn2 基因的 Pre-mRNA 剪接明显受到影响。这表明并非所有的剪接都对 Rp9 突变同样敏感。这些研究结果揭示了 RP9 表达和疾病特异性基因之间的功能关系,并提供了 RP9 相关性 RP 疾病机制的新见解。

大多数 adRP 患者具有视紫红质 RhoS334 基因突变^[11]。Bakondi 等^[12]在携带 RhoS334ter 突变的 adRP 大鼠模型中,通过电转染在视网膜下注射 gRNA/Cas9 质粒,进而选择性地删除携带 RhoS334ter 突变的视紫红质基因。免疫组化显示表型改变是显而易见的,表现为感光突触和视网膜突触的保存。这表明这一策略可阻止视网膜退化,改善视觉功能。

2.2 CRISPR/Cas 系统在新生血管性疾病中的应用

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管生成中起着关键作用,与多种人类疾病相关,如增殖性糖尿病视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR) 和年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 等。PVR 是目前工作年龄人群中获得性失明发生率最高的疾病,而 ARMD 是 65 岁以上人群失明的主要原因^[13]。尽管抗 VEGF 药物可以减少新生血管的生长并减少血管渗漏,但是由于 VEGF 会持续从病变的视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 分泌,这些抗 VEGF 药物必须多次注射^[14]。而基因治疗因其长效表达会减少或消除对患者重复注射抗-VEGF 抑制剂的需要而具有优势^[15]。

2.2.1 CRISPR/Cas 系统在 ARMD 中的应用 ARMD 的发病机制可能与 RPE 和 Bruch 膜之间形成的基底膜沉积有关,且涉及补体系统的激活。ARMD 与 EFEMP1 相关性黄斑变性具有相似的临床特征,如基底膜沉积物和玻璃膜

疣,EFEMP1相关性黄斑变性是由人包含 EGF 腓骨蛋白样胞外基质蛋白 1(EFEMP1)中的显性 p. R345W 突变引起的。为了研究在 ARMD 中 Bruch 膜,RPE 和补体之间的关系,Fernandez-Godino 等^[16]应用 CRISPR/Cas9 系统设计了含有 p. R345W 突变的 ARPE-19 细胞,通过免疫染色及 transwells 方法,发现由 p. R345W 突变引起的细胞外基质(ECM)结构及组成的变化会导致 RPE 细胞产生补体激活和形成基底沉积。值得注意的是,当人胎儿 RPE 细胞在 ARMD 患者的 Bruch 膜上培养时,也观察到类似的反应,这表明通过异常 ECM 刺激补体激活是遗传性和年龄相关性黄斑变性的早期发病机制中的共同因素。这些研究使我们部分了解了黄斑变性的早期发病机制。

ARMD 与 VEGF 基因的过度表达有关。其中 VEGFA 是血管生成中的重要因素,因此它是治疗 ARMD 的主要靶点。Kim 等^[14]通过激光诱导产生含有脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)的 ARMD 小鼠模型,并将预先组装的 VEGFA 基因特异性 Cas9 核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)注射到小鼠视网膜下来研究 Cas9 RNP 是否可用于在 ARMD 小鼠模型中治疗 CNV。他们发现在小鼠模型中,Cas9 RNP 可以有效地减少 CNV 的面积,且通过 Digenome-seq 进行全基因组分析表明,在基因组中很少诱导脱靶突变。这些研究结果表明,可使用 Cas9 RNPs 靶向灭活视网膜中的 VEGFA,用于 ARMD 的局部治疗。并且他们认为,基因治疗不仅是一个设想,在不久的将来医生可以运用基因治疗来治疗疾病。

2.2.2 CRISPR/Cas 系统在 PVR 中的应用 小鼠双微体 2(MDM2)是一种 E3 泛素蛋白连接酶,研究表明 MDM2 SNP309G 与 PVR 相关^[17],但 MDM2 SNP309G 是否参与 PVR 的发展尚不清楚。Zhou 等^[18]应用 CRISPR/Cas9 系统及含有 MDM2 G309 的 DNA 模板构建表达 MDM2T309G 或 T309T 的 hRPE 细胞模型,并向兔眼玻璃体腔内注射表达 MDM2 T309G 或 T309T 的 hRPE 细胞。Western 印迹分析表明表达 MDM2T309G 的细胞中 p53 含量较表达 MDM2T309T 的细胞明显降低。此外,与兔眼玻璃体腔内表达 MDM2T309T 的 hRPE 细胞相比,表达 MDM2T309G 的 hRPE 细胞收缩显著增强,并且 hRPE 细胞中的 MDM2T309G 增强了兔模型中 PVR 的发展。实验结果表明 RPE 细胞中的 MDM2 SNP309 可能增强 PVR 发病几率。

2.3 CRISPR/Cas 系统在眼科其他人眼相关疾病中的应用

2.3.1 CRISPR/Cas 系统在眼部发育中的应用 Pax6 是一种含同源结构域的转录因子,对于大多数动物(包括果蝇、小鼠和人供体类)以及胰腺内分泌细胞的神经发育,以及分化中的眼睛及鼻腔发育至关重要。已有研究表明,Pax6 突变的影响取决于突变的程度和基因剂量。为了证明不同剂量的 Pax6 基因对眼睛的影响,Yasue 等^[19]应用 CRISPR/Cas9 系统建立了 Pax6 基因缺陷的小鼠模型。形态学和基因组分析表明,经 Pax6-CRISPR 编辑的具有不同的 Pax6 突变剂量的胚胎具有不同的眼睛表型。实验结果表明 Pax6 的中度表达可能导致视网膜过度增殖,且来自表面外胚层的晶状体发育比来自视泡囊的视网膜发育需要更高的 Pax6 基因剂量。这提示 CRISPR/

Cas9 系统可控制小鼠模型中的基因剂量,为眼睛发育相关研究提供了方向。

2.3.2 CRISPR/Cas 系统在原发性开角型青光眼中的应用 原发性开角型青光眼(primary open-angle glaucoma, POAG)是全球不可逆转的视力丧失的首要原因,Myocilin(MYOC)突变可见于 4% 的 POAG 患者。研究表明 MYOC 突变导致蛋白质错误折叠,使小梁中的内质网应激,从而导致眼压升高,引起 POAG。Jain 等^[20]应用 CRISPR/Cas9 系统编辑小鼠小梁网细胞并构建了小鼠 MYOC 突变株,进而选择性地删除 MYOC 突变。实验结果证明通过这项基因编辑技术可以降低眼压,证明了这项基因编辑技术在眼科这项重要疾病中的可行性。

2.3.3 CRISPR/Cas 系统在先天性白内障中的应用 先天性白内障会导致新生儿双眼盲,之前研究表明有近 1/3 的先天性白内障与晶体基因突变相关,如 aA-晶体蛋白基因(CRYAA)。Yuan 等^[21]通过向兔受精卵的细胞质中注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA,人工构建 CRYAA 突变的兔模型,表现为先天性白内障、小眼球与早期晶状体萎缩以及晶状体纤维分化失败。因此,利用 CRISPR/Cas 构建的兔模型为进一步阐明 CRYAA 基因的致病机制提供了良好工具。

3 展望

CRISPR/Cas9 系统作为一种快速发展的革命性技术,在基因编辑方面展现出巨大的潜力,已有大量报道表示 CRISPR/Cas9 系统可以精确敲除、插入或替换细胞水平的目标基因,甚至可以用来构建动物模型。与其他基因组位点编辑技术相比,CRISPR/Cas9 系统具有更高效的基因编辑效率,操作更方便,同时安全性高,毒性小,脱靶效应相对较低。

虽然 CRISPR/Cas 系统具有良好的前景,但如何将该系统的各个组分直接高效地运输到细胞中仍是一个不小的挑战。目前,Rubul 等^[22]通过将金纳米颗粒与 Cas9 蛋白及 sgRNA 组成复合体,成功实现了 CRISPR/Cas 系统向细胞质及细胞核的转运,在细胞中实现了高达 90% 的运输效率。

此外,CRISPR 的最新研究进展是寻求一种手段来导致单核苷酸的改变^[23-24]。这一改变通过将去活化的 Cas 核酸酶(dead Cas, dCas)与啮齿动物胞嘧啶脱氨酶融合来实现。dCas/脱氨酶融合蛋白转染的细胞经历单个胞嘧啶至尿嘧啶的转化,随后通过 DNA 校正机制或在复制过程中将其修复为胸腺嘧啶。该系统整体效率的提高及插入错误的减少代表了 CRISPR 技术的巨大进步和发展^[15]。

CRISPR/Cas9 系统目前已被应用于动物遗传性疾病的治疗,同时也正在推进用于临床上治疗人类疾病。尽管与传统基因编辑技术相比具有明显优势,但围绕 CRISPR/Cas 系统的技术问题和伦理问题阻碍了其临床使用^[25]。

第一个存在的问题是脱靶效应。与小鼠及斑马鱼相比,人类细胞中脱靶突变存在更常见^[25-26]。最近,开发了一种可逆的基于 CRISPR 的基因编辑策略,称为 CRISPR 干扰(CRISPRi)。该技术对 sgRNA 与靶序列之间的错配高度敏感,因此与常规使用的 RNAi 相比减少了靶向脱靶效应^[15]。此外,目前也采用了诸如 sgRNA 设计的优化,成对的 nCas9 的使用,配对的 dCas9-FokI 核酸酶和增强的

Sp-Cas9 的方法来解决脱靶问题^[27-28]。然而,仍然存在一个问题,脱靶效应是否能够针对数十亿个 DNA 序列中涉及大量细胞的单一位点进行治疗,并且是针对个体患者进行特异性和不同设计的治疗^[25]。

此外,使用 CRISPR 来编辑人类种系已引起科学界的伦理争论。例如,应用 CRISPR 技术可使运动表现或智力能力提高,如果只有特定的个人能够获得这种提高,就会造成社会问题^[21]。

由于许多人眼相关疾病的病因尚未完全阐明且无有效的治疗方法,因而严重影响患者的生活质量。虽然目前围绕 CRISPR/Cas 系统仍存在很多问题,但随着技术的进一步完善,针对伦理问题等相关政策的进一步建立,CRISPR/Cas 系统在眼眼相关疾病中的前景十分可期。

参考文献

- 1 Hung SSC, McCaughey T, Swann O, *et al.* Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. *Prog Retin Eye Res* 2016;53: 1-20
- 2 Doetschman T, Georgieva T. Gene Editing With CRISPR/Cas9 RNA-Directed Nuclease. *Circ Res* 2017;120(5): 876-894
- 3 吴继红. 眼遗传病的分子诊断. *中国眼耳鼻喉科杂志* 2013;13(6): 343-347
- 4 李君,张毅,陈坤玲,等. CRISPR/Cas 系统:RNA 靶向的基因组定向编辑新技术. *遗传* 2013;35(11): 1265-1273
- 5 Jinek DE, Sengillo JD, Justus S, *et al.* CRISPR-Cas Genome Surgery in Ophthalmology. *Transl Vis Sci Technol* 2017;6(3): 13
- 6 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 (39): E2579-2586
- 7 Sengillo JD, Justus S, Tsai YT, *et al.* Gene and Cell-Based Therapies for Inherited Retinal Disorders: An Update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2016;172(4):349-366
- 8 Ruan GX, Barry E, Yu D, *et al.* Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Mol Ther* 2017;25(2): 331-341
- 9 Burnight ER, Gupta M, Wiley LA, *et al.* Using CRISPR - Cas9 to Generate Gene Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Mol Ther* 2017;25(9):1999-2013
- 10 Lv JN, Zhou GH, Chen X, *et al.* Targeted RP9 ablation and mutagenesis in mouse photoreceptor cells by CRISPR - Cas9. *Sci Rep* 2017;7:43062
- 11 Rossmiller B, Mao H, Lewin AS. Gene therapy in animal models of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis* 2012,18:2479-2496
- 12 Bakondi B, Lv W, Lu BIn, *et al.* *In vivo* CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther* 2016;4(3):556-563

- 13 Huang X, Zhou G, Wu W, *et al.* Genome editing abrogates angiogenesis *in vivo*. *Nat Commun* 2017;8(1):112
- 14 Kim K, Park SW, Kim JH, *et al.* Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration. *Genome Res* 2017;27(3):419-426
- 15 Sengillo JD, Justus S, Cabral T, *et al.* Correction of Monogenic and Common Retinal Disorders with Gene Therapy. *Genes (Basel)* 2017;8(2):pii: E53
- 16 Fernandez - Godino R, Bujakowska KM, Pierce EA. Changes in extracellular matrix cause RPE cells to make basal deposits and activate the alternative complement pathway. *Hum Mol Genet* 2018; 27 (1): 147-159
- 17 Pastor-Idoate S, Rodriguez-Hernandez I, Rojas J, *et al.* Genetics on PVRSG: the T309G MDM2 gene polymorphism is a novel risk factor for proliferative vitreoretinopathy. *PLoS One* 2013;8(12):e82283
- 18 Zhou G, Duan Y, Ma G, *et al.* Introduction of the MDM2 T309G Mutation in Primary Human Retinal Epithelial Cells Enhances Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(12):5361-5367
- 19 Yasue A, Kono H, Habuta M, *et al.* Relationship between somatic mosaicism of Pax6 mutation and variable developmental eye abnormalities-an analysis of CRISPR genome-edited mouse embryos. *Sci Rep* 2017;7(1):53
- 20 Jain A, Zode G, Kasetti RB, *et al.* CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(42): 11199-11204
- 21 Yuan L, Yao H, Xu Y, *et al.* CRISPR/Cas9-Mediated Mutation of α A-Crystallin Gene Induces Congenital Cataracts in Rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(6):BIO34 -BIO41
- 22 Rubul M, Moumita R, Gulen YT, *et al.* Efficient Gene Editing through Direct Cytosolic Delivery of CRISPR/Cas9-Ribonucleoprotein. *ACS Nano* 2017;11(3): 2452-2458
- 23 Komor AC, Kim YB, Packer MS, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016;533(7603): 420-424
- 24 Hess GT, Frésard L, Han K, *et al.* Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells. *Nat Methods* 2016;13(12): 1036-1042
- 25 Kang XJ, Caparas CIN, Soh BS, *et al.* Addressing challenges in the clinical applications associated with CRISPR/Cas9 technology and ethical questions to prevent its misuse. *Protein Cell* 2017;8(11):791-795
- 26 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013;31(3): 227-229
- 27 Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol* 2016;34(9):933-941
- 28 Hsu PD, Lander ES, Zhang FD, *et al.* Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157(6):1262-1278