

CRISPR/CAS9

L'outil du XXI^e siècle au service de la génétique

Par CHRISTIAN SIATKA, École de l'ADN, université de Nîmes

La grande révolution du moment en termes de génétique s'appelle CRISPR/Cas9, une méthode mise au point dans les années 2000 qui permet de manipuler le génome de manière très performante, autorisant de nombreuses applications en oncologie, criblage ADN, traçage de nucléotides...

Nous vivons actuellement une révolution en matière de génétique et de modifications des génomes. Révolution analogue aux années 1950, où l'on découvrait la molécule d'ADN, et aux années 1970 où on identifiait, à partir de bactéries, les outils pour « bricoler » cette molécule d'ADN que sont des ciseaux moléculaires, « enzymes de restriction » dans notre jargon. Depuis la fin des années 1980, les recherches menées, toujours sur des bactéries, spécifiquement sur les mécanismes immunitaires, ont permis d'identifier et d'optimiser un système redoutablement révolutionnaire qui permet également de couper de l'ADN : CRISPR/Cas9.

Cet acronyme étrange (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr Associated 9*) représente un système simple en apparence et redoutablement efficace qui permet de modifier les gènes à façon, en générant des brèches très ciblées dans l'ADN. Sa simplicité d'utilisation sur le plan technique a fait « exploser » l'imagination en ingénierie des génomes, avec des possibilités inenvisageables auparavant et des idées parfois effrayantes. Cependant, si simple soit-elle, cette technologie nécessite une connaissance très approfondie des systèmes cellulaires utilisés, de même qu'une maîtrise parfaite de la génétique du modèle expérimental et de la réglementation

associée. Employer cet outil pour créer une modification ne suffit pas, il faut être accompagné par des structures et des plateformes technologiques complexes pour visualiser, identifier et sélectionner le travail de laboratoire obtenu par CRISPR/Cas 9. Au final il apparaît que cet outil de modification tant convoité n'est pas si simple à exploiter au quotidien dans tous les laboratoires. Si quelques limites réglementaires viennent encadrer son utilisation, cette technologie prometteuse dans tous les domaines de la génétique devrait encore réserver bien des surprises.

L'outil

L'histoire de CRISPR commence en 1987 au Japon, lorsque le groupe d'Ishino *et al.* [1] de l'université d'Osaka s'intéresse à d'étranges séquences répétées de 29 nucléotides, espacées de 32 nucléotides. Il faut tout de même une vingtaine d'années, 2002, pour identifier et baptiser ces séquences CRISPR [2], et cinq années supplémentaires pour les identifier comme faisant partie d'un système immunitaire adaptatif

permettant aux bactéries de se défendre contre les infections de phages [3].

Parmi les différents types de systèmes CRISPR, le système de nucléase CRISPR/Cas 9 de type II est le plus simple pour ce qui concerne la technologie d'édition du génome. Il utilise une protéine Cas9 et deux ARN: un ARN CRISPR (crARN) et un ARN transactivateur du crARN (le tracrARN) [4]. L'ensemble constitue une ribonucléoprotéide, système actif qui permet de réaliser une coupure ciblée sur l'ADN.

Dans le système natif, la nucléase Cas9 est guidée par un duplex formé par un crARN contenant un motif de 20 nucléotides qui cible une séquence CRISPR portée par le génome du bactériophage. La reconnaissance de la cible et le clivage de l'ADN nécessitent la présence d'un motif adjacent aux proto-espaces (PAM), une séquence consensus NGG ou NAG adjacente à l'ADN cible. En 2012, Jinek *et al.* [5] ont simplifié le duplex ARNc et tracrARN en conceptualisant un ARN monocanal chimérique programmé (sgARN), qui dirige spécifiquement la nucléase Cas9 pour créer →

CRISPR/CAS9

→ des coupures dans l'ADN sur des positions d'intérêt. Ce développement a facilité le ciblage de la coupure de l'ADN en concevant simplement un sgARN et en exprimant la protéine Cas9. Le protocole expérimental de conception et de construction de sgARN est à ce jour parfaitement documenté [6 ; 7].

Outil de modification des gènes

De nombreuses études sur le fonctionnement du système CRISPR-Cas9 chez les bactéries ont permis de transposer la technologie sur des cellules de mammifères [8]. Des scientifiques ont tenté de l'appliquer à de multiples organismes allant du poisson-zèbre à la drosophile en passant par les moustiques, les rongeurs, jusqu'aux primates non humains [9].

Ces modifications se sont intéressées à tous les types de cellules, notamment des cellules-souches embryonnaires (ES). L'édition de gènes par CRISPR-Cas9 a considérablement augmenté l'efficacité de l'édition de génome, passant le délai pour obtenir des mutants de plusieurs années à quelques mois [10]. En plus de ne cibler qu'un seul gène, la technologie a été étendue pour muter ou altérer simultanément jusqu'à cinq gènes dans les ES de souris avec une grande efficacité et en une seule étape [11]. Initialement toutes ces modifications se faisaient par des vecteurs de type plasmide ou AAV. Une autre alternative a été d'utiliser la microinjection directe de la protéine Cas9 et du sgARN dans les cellules. Récemment des résultats de l'utilisation de l'électroporation chez des zygotes fertilisés ont montré l'efficacité de transfert de cet outil [11]. L'année dernière

Cockrell *et al.* [12] ont rapporté la génération d'un modèle de souris résistantes pour le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV). Cette découverte est très prometteuse dans le domaine du design thérapeutique et propose de nouvelles stratégies pour lutter contre les virus émergents dans un proche avenir.

Applications de l'outil

Les stratégies de l'utilisation de cet outil révolutionnaire en génie génétique sont multiples. En oncologie la technologie CRISPR/Cas9 devrait être révolutionnaire. Le *knock out* isogénique sur des cellules tumorales permettra l'identification rapide des rôles des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs. En plus des capacités de reprogrammation rapides et économiques de CRISPR/Cas9, ce sera aussi l'occasion d'identifier des mécanismes de résistance aux médicaments et aussi d'étudier des cibles thérapeutiques potentielles. En 2016, un groupe chinois [13] a été le premier à injecter des cellules T modifiées par CRISPR/Cas9 chez un patient atteint d'un cancer du poumon métastatique. Les chercheurs ont désactivé le gène codant pour la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1), ce gène empêchant les cellules T d'attaquer d'autres cellules. Sans PD-1, les cellules T modifiées vont attaquer les cellules tumorales et donc faire régresser le cancer. Cependant l'efficacité de l'attaque activée par CRISPR n'a pas été complètement déterminée avant six mois d'observation [14].

Une limitation majeure pour les lignées cellulaires éditées par CRISPR/Cas9 est observée pour les modifications adaptatives

provoquées par des mutations secondaires. Deux publications [14 ; 15] récentes ont rapporté des résultats inattendus : les chercheurs ont montré l'évolution du virus d'immunodéficience humaine (VIH) et l'échappement de l'attaque programmée par le gène CRISPR due aux mutations dérivées de Cas9/sgARN. D'autres analyses de séquençage à haut débit ont montré que de telles mutations sont générées par la mutagenèse cellulaire NHEJ au site de clivage. Ces INDEL entraînent une modification de la séquence d'ADN cible, empêchant ainsi la liaison de l'ARNg et conduisant finalement à une résistance à Cas9/sgARN. Ces résultats soulignent l'importance d'autres stratégies et solutions pour surmonter la résistance virale au système CRISPR-Cas9.

En raison de sa capacité à perturber complètement les gènes cibles et de la simplicité de conception de sgARN, le système CRISPR/Cas9 a été étendu aux criblages génomiques de perte de fonction à grande échelle dans des cellules humaines. Une étude pionnière [16] a établi une bibliothèque à base de lentivirus contenant 73 000 ARNsg, permettant de générer des collections de *knock out* pour le criblage du génome dans les cellules de leucémie myéloïde. Plus récemment une équipe de l'université de Stanford [17] a mis au point un système de double inactivation reposant sur CRISPR, qui peut désactiver deux gènes à la fois dans les cellules. Ce travail démontre l'aspect prometteur de l'outil de criblage CRISPR à haut débit pour déterminer les interactions génétiques fonctionnelles. Il convient de garder à l'esprit

qu'un stress génotoxique peut être induit par un grand nombre de coupures d'ADN. Deux expériences [18 ; 19] indépendantes ont montré que le ciblage du génome par le CRISPR/Cas9 dans les régions fortement amplifiées conduit à une augmentation des dommages de l'ADN et à une réponse antiproliférative profonde, révélant une augmentation imprévue des résultats faux positifs. Ces résultats sont alarmants pour le criblage fondé sur CRISPR dans les loci fortement amplifiés. À cet égard il apparaît fondamental de concevoir des sgARN appropriée et un contrôle rigoureux doit être effectué sur toutes les régions potentielles hors cible. Cela pour éviter les forts taux de létalité cellulaire à un stade précoce, causés majoritairement par la perte de gènes essentiels.

Les corrections de coupures

Notre ADN est soumis de façon constante à des coupures naturelles, et il est heureux que nous disposions de systèmes de réparation dans nos cellules. Comparée à la réparation génétique induite par association d'extrémité non homologues (*non homologous end joining*) NHEJ, la correction génique induite par recombinaison homologue (HDR) possède un spectre d'application plus large, bien que la voie HDR soit moins efficace dans les cellules de mammifères. Cette approche par recombinaison homologue permet de remplacer spécifiquement une mutation par une séquence normale. Des mutations causant des maladies peuvent être précisément ciblées et corrigées en utilisant CRISPR/Cas9. En 2013, un groupe [20] a réparé une mutation dans le locus du

récepteur du conducteur transmembranaire de la fibrose kystique. Ce gène CFTR est impliqué dans une maladie génétique rare, la mucoviscidose. La modification par CRISPR/Cas9 *via* HDR a été réalisée dans des cellules-souches intestinales primaires dérivées de patients atteints de fibrose kystique, présentant un défaut héréditaire monogénique.

Autre application, la correction génétique induite par HDR a été appliquée avec succès pour corriger efficacement les mutations et les phénotypes dans des modèles murins de tyrosinémie héréditaire [21], de perte auditive [22] ou de maladies oculaires [23]. Quoi qu'il en soit, la transposition de la correction de gènes reposant sur CRISPR/Cas9 a encore un long chemin à parcourir pour passer du banc d'essai de laboratoire à la clinique, pour les raisons suivantes :

1. le système immunitaire humain peut reconnaître les protéines corrigées comme étrangères et ainsi éliminer les protéines par les lymphocytes T cytotoxiques ;

2. le phénotype des cellules éditées peut ne pas refléter complètement la réponse réelle chez les humains, les altérations épigénétiques et de microenvironnement n'étant pas considérées par de simples expériences *ex vivo* ou *in vitro* ;

3. malgré une modélisation *in vivo* réussie, de nombreux problèmes d'innocuité incertains et l'efficacité de la livraison restent non résolus chez les humains, encore en début de cette année [24].

Modulation de l'expression des gènes

Pour élargir le potentiel du système CRISPR/Cas9, le groupe de Weissman [25] a introduit deux mutations aux sites RuvC et HNH

de l'endonucléase Cas9 et a créé une protéine Cas9 catalytiquement inactive (dCas9, « d » pour *dead*) qui ne présente pas d'activité endonucléase. Ce système inactivé permet de créer des interférences (CRISPRi) : ce système réprime efficacement l'expression des gènes ciblés en bloquant directement l'initiation ou l'élongation de la transcription sans aucun effet cible de coupure. Contrairement aux modifications génétiques permanentes induites par l'endonucléase Cas9, la répression des gènes induite par CRISPRi est inductible et réversible, offrant une plateforme ajustable pour la régulation de la transcription guidée par l'ARN [26].

Pour obtenir une meilleure régulation de la transcription, les chercheurs ont fusionné la dCas9 avec des domaines répresseurs tels que KRAB (boîte associée à Krüppel) ou des domaines activateurs tels que

VP64 (quatre copies du VP16) et p65 (p65AD), aboutissant à un système capable de réprimer (CRISPRi) ou d'activer (CRISPRa) la transcription des gènes cibles. Cette approche CRISPRi/a a encore été optimisée pour contrôler les niveaux de transcription des gènes endogènes, y compris les transcrits non codants. Plus important encore, CRISPRi/a peut être utilisé pour dépister rapidement les phénotypes gain et perte de fonction, fournissant ainsi des informations complémentaires pour cartographier les voies complexes qui n'ont pas encore été étudiées [27]. Ces avancées facilitent le contrôle du transcriptome entier dans le génome humain et aident à la découverte des cibles thérapeutiques grâce à un screening CRISPRi/a à l'échelle du génome. Cette étude a été réalisée en 2015 [28]. Étonnamment, la répression et l'activation des ➔

CRISPR/CAS9

→ gènes peuvent être obtenues simultanément à l'aide d'ARN programmés (scARN) qui codent à la fois pour l'ADN cible et les effecteurs régulateurs. Cette stratégie permet le contrôle simultané de plusieurs gènes dans la même cellule en activant un ensemble de gènes tout en désactivant un autre, offrant ainsi un large éventail d'utilisations biomédicales et biotechnologiques [29].

Compte tenu de sa conception simple et de ses caractéristiques polyvalentes, la méthode CRISPRi/a a été appliquée à plusieurs organismes. Par exemple, CRISPRi a été largement utilisée pour réprimer plusieurs gènes chez *Mycobacterium*, *Corynebacterium glutamicum* et *Escherichia coli*, et est donc capable de réguler les molécules d'intérêt dans des bactéries. Plusieurs modèles animaux, tels que les vers et le poisson-zèbre, ont été générés avec succès en utilisant CRISPRi. Peu après ces études sur des organismes simples, l'approche a été exploitée pour moduler précisément l'expression des gènes endogènes dans les cellules cancéreuses mammaires humaines et dans les neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (HPSC).

La méthode CRISPRa a été utilisée pour créer des modèles *in vivo* chez la drosophile, les vers et le poisson-zèbre. En plus de l'activateur dCas9-VP64 typique, d'autres activateurs de « deuxième génération » ont été testés sur plusieurs types cellulaires et espèces. En particulier, trois activateurs, SunTag [30], VPR (VP64-p65-Rta) [31] et SAM [32], semblent être les plus puissants systèmes comparés à dCas9-VP64. Cette étude fournit un vaste ensemble de systèmes

pour générer des outils plus fiables pour une activation améliorée, en particulier pour les gènes hautement réprimés, ce bien que la plupart des utilisations de la méthode CRISPRa se soient limitées aux études de fonction préliminaires.

Modifications épigénétiques

En sus de son utilisation dans la modulation transcriptionnelle, CRISPR-dCas9 est utilisé pour modifier les variantes épigénétiques afin de remodeler le paysage épigénétique aberrant. En 2015 [33], une dCas9 a été fusionnée avec l'histone-déméthylase ou l'acétyltransférase pour cibler des activateurs ou promoteurs, conduisant ainsi à des changements majeurs dans l'expression génique. Un autre groupe [34] ciblait dCas9-KRAB sur l'amplificateur distal des sites hypersensibles à la DNase I (DHS), entraînant une méthylation hautement spécifique des histones au niveau des régions d'amplification et une diminution de l'accessibilité de la chromatine aux promoteurs associés. En 2016 [35], une équipe a développé un outil fondé sur CRISPR pour augmenter spécifiquement la méthylation de CpG en fusionnant la dCas9 avec le domaine catalytique de l'ADN-méthyltransférase DNMT3A, permettant ainsi la méthylation d'une plus grande partie des promoteurs dans les génomes de cellules de mammifères.

Autres applications

Au-delà de l'édition et de la régulation des gènes, un autre défi spécifique au domaine de la biologie cellulaire est de marquer et de tracer efficacement des séquences d'ADN spécifiques dans les cellules vivantes. Bien que l'hybridation

in situ par fluorescence (FISH) conventionnelle ait été développée ces dernières décennies. Pour surmonter certains obstacles, les scientifiques ont réorienté le système CRISPR/Cas9 en outil d'imagerie du génome de cellules humaines vivantes [36]. Ce système d'imagerie CRISPR, constitué d'une protéine dCas9 marquée par une protéine fluorescente verte (GFP) et d'un sgRNA optimisé, a permis l'imagerie robuste d'éléments répétitifs (tant dans les télomères que dans des régions non traduites) et la visualisation de séquences génomiques arbitraires non répétitives.

Cette nouvelle technologie d'imagerie reposant sur la CRISPR servira sans doute d'approche complémentaire au FISH, permettant un suivi plus simple et plus direct de la dynamique des télomères, de la localisation subnucléaire et de l'organisation de la chromatine tout au long du cycle cellulaire. En plus de cibler l'ADN double brin (ADNdb), le système CRISPR/Cas9 a été développé pour cliver l'ARN monocaténaire (ARNsb) sur des sites cibles spécifiques en fournissant la partie PAM d'un oligonucleotide (PAMmer) qui s'hybride à l'ARN cible. Ce système permet à la Cas9 de reconnaître et de cliver les cibles ARN de manière programmable et facilite la détection directe des transcrits [37].

En plus du système CRISPR/Cas9 de type II, Makarova *et al.* [38] ont découvert les caractéristiques des systèmes CRISPR/Cas de type I, qui représentent environ 90 % de tous les loci CRISPR/Cas identifiés dans les bactéries et les archées, et peut cibler à la fois l'ADN et l'ARN. Au-delà du suivi de l'ARN dans les cellules vivantes, les développements

futurs du système RCas9 (modulation de plusieurs étapes de traitement de l'ARN, génération de modèles de maladies, promotion de la traduction clinique...) méritent tous d'être explorés.

Conclusion

L'outil CRISPR/Cas9 est utilisé dans de nombreux domaines, et son utilisation soulève des préoccupations éthiques et des applications cliniques de CRISPR/Cas9 ont été soulignées. Son utilisation repose sur des systèmes de délivrance efficaces et des procédures strictes pour cibler les maladies humaines avec une grande spécificité. À cet égard, l'utilisation de l'outil CRISPR/Cas9 aux grandes espèces animales, telles que les chiens, les porcs ou les primates non humains, aidera à mieux comprendre les maladies humaines et permettra de contribuer à des stratégies thérapeutiques plus complètes. Il faut aussi noter que tous les changements adaptatifs évolutifs liés à nos gènes issus des agents pathogènes, tels que les virus, peuvent développer des stratégies anti-CRISPR pour échapper à une attaque, entraînant un échec du traitement.

Ce sont tous ces éléments qui permettent de contribuer aux potentiels du développement de nouvelle stratégie en génétique pour lutter contre des maladies humaines. L'avenir de telles technologies est difficilement prévisible : les récentes recherches ont permis d'identifier de nouvelles Cas [39] ou des nucléases Cpf1 [40] qui ont démontré les possibilités illimitées de la technologie CRISPR pour l'édition du génome. Tous ces nouveaux outils nous placent à l'aube d'une prochaine génération de stratégie en thérapie génique qui s'annonce très prometteuse. ■

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, *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, 1987.
- 2 F. J. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements.* J. Mol. Evol. 2005 Feb;60(2):174-82
- 3 R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath, *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.* Science 315:1709-1712, 2007.
- 4 S. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, J. Van der Oost, *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes.* Science 321:960-964, 2008.
- 5 M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.* Science 337:816-821, 2012.
- 6 N. E. Sanjana, O. Shalem, F. Zhang, *Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening.* Nat Methods 11:783-784, 2014.
- 7 O. Shalem, N. E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D. A. Scott, T. S. Mikkelsen, D. Heckl, B. L. Ebert, D. E. Root, J. G. Doench, F. Zhang, *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells.* Science 343:84-87, 2014.
- 8 L. Cong, R. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang, *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.* Science 339:819-823, 2013.
- 9 Y. Chen, Y. Zheng, Y. Kang, W. Yang, Y. Niu, X. Guo, Z. Tu, C. Si, H. Wang, R. Xing, X. Pu, S. H. Yang, S. Li, W. Ji, X. J. Li, *Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9.* Hum Mol Genet 24:3764-3774, 2015.
- 10 C. Fellmann, B. G. Gowen, P. C. Lin, J. A. Doudna, J. E. Corn, *Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy.* Nat Rev Drug Discov 16:89-100, 2017.
- 11 H. Wang, H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch, *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering.* Cell 153:910-918, 2013.
- 12 A. S. Cockrell, B. L. Yount, T. Scobey, K. Jensen, M. Douglas, A. Beall, X. C. Tang, W. A. Marasco, M. T. Heise, R. S. Baric, *A mouse model for MERS coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome.* Nat Microbiol 2:16226, 2016.
- 13 Q. Zou, X. Wang, Y. Liu, Z. Ouyang, H. Long, S. Wei, J. Xin, B. Zhao, S. Lai, J. Shen, Q. Ni, H. Yang, H. Zhong, L. Li, M. Hu, Q. Zhang, Z. Zhou, J. He, Q. Yan, N. Fan, Y. Zhao, Z. Liu, L. Guo, J. Huang, G. Zhang, J. Ying, L. Lai, X. Gao, *Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system.* J Mol Cell Biol 7:580-583, 2015.
- 14 D. Cyranoski, *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time.* Nature 539:479, 2016.
- 15 Z. Wang, Q. Pan, P. Gendron, W. Zhu, F. Guo, S. Cen, M. A. Wainberg, C. Liang, *CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape.* Cell Rep 15:481-489, 2016.
- 16 C. Liang, M. A. Wainberg, A. T. Das, B. Berkhout, *CRISPR/Cas9: A double-edged sword when used to combat HIV infection.* Retrovirology 13:37, 2016.
- 17 T. Wang, J. J. Wei, D. M. Sabatini, E. S. Lander, *Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system.* Science 343:80-84, 2014.
- 18 D. Heckl, E. Charpentier, *Toward whole-transcriptome editing with CRISPR-Cas9.* Mol Cell 58:560-562, 2015.
- 19 A. J. Aguirre, R. M. Meyers, B. A. Weir, F. Vazquez, C. Z. Zhang, U. Ben-David, A. Cook, G. Ha, W. F. Harrington, M. B. Doshi, M. Kost-Alimova, S. Gilli, H. Xu, L. D. Ali, G. Jiang, S. Pantel, Y. Lee, A. Goodale, A. D. Cherniack, C. Oh, G. Kryukov, G. S. Cowley, L. A. Garraway, K. Stegmaier, C. W. Roberts, T. R. Golub, M. Meyerson, D. E. Root, A. Tsherniak, W. C. Hahn, *Genomic copy number dictates a gene-independent cell response to CRISPR/Cas9 targeting.* Cancer Discov 6:914-929, 2016.
- 20 D. M. Munoz, P. J. Cassiani, L. Li, E. Billy, J. M. Korn, M. D. Jones, J. Golji, D. A. Ruddy, K. Yu, G. McAllister, A. DeWeck, D. Abramowski, J. Wan, M. D. Shirley, S. Y. Neshat, D. Rakiec, R. de Beaumont, O. Weber, A. Kauffmann, E. R. McDonald III, N. Keen, F. Hofmann, W. R. Sellers, T. Schmelzle, F. Stegmeier, M. R. Schlabach, *CRISPR screens provide a comprehensive assessment of cancer vulnerabilities but generate false-positive hits for highly amplified genomic regions.* Cancer Discov 6:900-913, 2016.
- 21 G. Schwank, B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, N. Sasaki, S. Boymans, E. Cuppen, C. K. Van der Ent, E. E. Nieuwenhuis, J. M. Beekman, H. Clevers, *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients.* Cell Stem Cell 13:653-658, 2013.
- 22 H. Yin, W. Xue, S. Chen, R. L. Bogorad, E. Benedetti, M. Grompe, V. Kotliansky, P. A. Sharp, T. Jacks, D. G. Anderson, *Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype.* Nat Biotechnol 32:551-553, 2014.
- 23 J. Mianne, L. Chessum, S. Kumar, C. Aguilar, G. Codner, M. Hutchison, A. Parker, A. M. Mallon, S. Wells, M. M. Simon, L. Teboul, S. D. Brown, M. R. Bowl, *Correction of the auditory phenotype in C57BL/6N mice via CRISPR/Cas9-mediated homology directed repair.* Genome Med 8:16, 2016.
- 24 K. Kim, S. W. Park, J. H. Kim, S. H. Lee, D. Kim, T. Koo, K. E. Kim, J. H. Kim, J. S. Kim, *Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age-related macular degeneration.* Genome Res 27(3):419-426, 2017.
- 25 C. Fellmann, B. G. Gowen, P. C. Lin, J. A. Doudna, J. E. Corn, *Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy.* Nat Rev Drug Discov 16:89-100, 2017.
- 26 J. S. Weissman, *Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation.* Cell 159:647-661, 2014.
- 27 L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, W. A. Lim, *Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression.* Cell 152:1173-1183, 2013.
- 28 L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, L. S. Qi, *CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes.* Cell 154:442-451, 2013.
- 29 D. Heckl, E. Charpentier, *Toward whole-transcriptome editing with CRISPR-Cas9.* Mol Cell 58:560-562, 2015.
- 30 J. G. Zalatan, M. E. Lee, R. Almeida, L. A. Gilbert, E. H. Whitehead, M. La Russa, J. C. Tsai, J. S. Weissman, J. E. Dueber, L. S. Qi, W. A. Lim, *Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds.* Cell 160:339-350, 2015.
- 31 M. E. Tanenbaum, L. A. Gilbert, L. S. Qi, J. S. Weissman, R. D. Vale, A. proteintagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell 159:635-646, 2014.
- 32 A. Chavez, M. Tuttle, B. W. Pruitt, B. Ewen-Campen, R. Chari, D. Ter-Ovanesyan, S. J. Haque, R. J. Cecchi, E. J. Kowal, J. Buchthal, B. E. Housden, N. Perrimon, J. J. Collins, G. Church, *Comparison of Cas9 activators in multiple species.* Nat Methods 13:563-567, 2016.
- 33 S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki, F. Zhang, *Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex.* Nature 517:583-588, 2015.
- 34 N. A. Kearns, H. Pham, B. Tabak, R. M. Genga, N. J. Silverstein, M. Garber, R. Maehr, *Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion.* Nat Methods 12:401-403, 2015.
- 35 P. I. Thakore, A. M. D'Ippolito, L. Song, A. Safi, N. K. Shivakumar, A. M. Kabadi, T. E. Reddy, G. E. Crawford, C. A. Gersbach, *Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements.* Nat Methods 12:1143-1149, 2015.
- 36 A. Vojta, P. Dobrinic, V. Tadic, L. Bockor, P. Korac, B. Julg, M. Klasic, V. Zoldos, *Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation.* Nucleic Acids Res 44:5615-5628, 2016.
- 37 Y. Chen, Y. Zheng, Y. Kang, W. Yang, Y. Niu, X. Guo, Z. Tu, C. Si, H. Wang, R. Xing, X. Pu, S. H. Yang, S. Li, W. Ji, X. J. Li, *Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9.* Hum Mol Genet 24:3764-3774, 2015.
- 38 M. R. O'Connell, B. L. Oakes, S. H. Sternberg, A. East-Seletsky, M. Kaplan, J. A. Doudna, *Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9.* Nature 516:263-266, 2014.
- 39 K. S. Makarova, F. Zhang, E. V. Koonin, *SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas systems.* Cell 168:946-946.e1, 2017.
- 40 A. Cebrian-Serrano, B. Davies, *CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools.* Mamm Genome, 28:247-261, 2017
- 41 B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. Van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, F. Zhang, *Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system.* Cell 163:759-771, 2015.