

CRISPR/Cas9 技术在遗传性眼病基因治疗中的应用

吴世靖 综述 睢瑞芳 审校

100730 北京,中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院眼科

通信作者:睢瑞芳,Email:hfrsui@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.11.016

【摘要】 成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR 相关核酸酶(Cas)系统是一种存在于细菌和古菌内抵抗外源病毒和质粒侵袭的适应性免疫系统,自其发现的 30 余年来,研究者对其在生物体内免疫过程和利用其进行基因编辑的作用机制的认识不断深入。研究发现,由 II 型 CRISPR/Cas 改造而来的 CRISPR/Cas9 系统准确和有效地进行基因编辑。近年来,随着基因测序技术的进步和发展,多种眼科遗传病的致病基因诊断更加明确,同时随着在真核细胞里 Cas9 作用特异性的提高,基因编辑技术在遗传性眼病的诊疗方面正展现出巨大的潜力。目前,CRISPR/Cas9 基因编辑技术在眼科的应用已扩展到先天性白内障、先天性青光眼、视网膜色素变性(RP)、先天性角膜营养不良、Leber 先天性黑矇(LCA)和 Usher 综合征等遗传性眼病的基因治疗。此外,CRISPR/Cas9 基因编辑技术与腺相关病毒载体(AAV)和诱导性多能干细胞(iPSCs)研究的结合为遗传性疾病的治疗提供了更多的可能性和新的途径。本文就 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的机制以及该技术在眼遗传病基因治疗方面中的应用进行综述。

【关键词】 成簇规律间隔短回文重复序列; CRISPR-Cas 系统; 基因治疗; 眼遗传疾病

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目(2016-I2M-1-002)

Applications of CRISPR/Cas9 genome editing technology in gene therapy for hereditary eye diseases Wu Shijing, Sui Ruifang

Department of Ophthalmology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Sui Ruifang, Email: hfrsui@163.com

【Abstract】 Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated nuclease (Cas) system is an adaptive immune system that confers resistance to exogenous virus or plasmid in bacteria and archaea, over the 30 years since its discovery, researchers have a better understanding of its immune processes *in vivo* and the mechanisms of gene editing by using its function. Researches found that CRISPR/Cas9 system modified from type II CRISPR/Cas may edit genome accurately and effectively. In recent years, with the progress and development of gene sequencing technology, it is more explicit to make genetic diagnosis of a variety of hereditary eye diseases, and with the improvement of specificity for Cas9 in eukaryotic cells, gene editing is showing a great potential in the field of treating hereditary eye diseases. At present, the application of CRISPR/Cas9 gene editing technology has extended to the gene therapy of some hereditary eye diseases, such as congenital cataract, congenital glaucoma, retinitis pigmentosa (RP), congenital corneal dystrophy, Leber congenital amaurosis (LCA) and Usher syndrome. Besides, the combination of CRISPR/Cas9 gene editing technology with adeno-associated virus vectors (AAV) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) research offers more possibilities and new approaches for the treatment of hereditary diseases. This article reviewed the mechanism of CRISPR/Cas9 and its applications in gene therapy for hereditary eye diseases.

【Key words】 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats; CRISPR-Cas systems; Gene therapy; Hereditary eye diseases

Fund program: Medical and Health Science and Technology Innovation Funding Project of Chinese Academy (2016-I2M-1-002)

人类基因组约含有 25 000 个被注释的基因,目前发现有 6 000 余种疾病与基因突变有关,研究证明近 4 000 个基因的突变与疾病的发生和发展有关联(www.omim.org/statistics/geneMap),随着 DNA 测序技术的不断进展和对疾病认识水平

的不断提高,越来越多与疾病相关的基因变异被发现并受到关注。目前,由基因突变导致的遗传性疾病尚无有效的治疗方法,但近年临床试验发现基因替代治疗具有较好的疗效和安全性,提示基因治疗具有广阔的应用前景^[1-2]。近年来利用基因

编辑技术直接修复错误基因的治疗技术取得了长足的进步,尤其是在成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关核酸酶 (CRISPR associated nuclease, Cas) 9 系统的发现使得基因编辑技术真正得到普及。CRISPR/Cas9 通过特异性的向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 与 DNA 结合,引导 Cas9 与靶序列进行结合并进行切割,形成 DNA 双链断裂 (double-strand breaks, DSBs),然后利用细胞的非同源性末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源介导修复 (homology directed repair, HDR) 对断裂的 DNA 进行插入/缺失、修复或替换^[3-4],目前已成为基因编辑技术的常用手段。眼部组织存在血-眼屏障和免疫赦免^[5],且眼球容量小,故所需的载体量也少,另外对侧非治疗眼可以作为对照,为遗传眼病,尤其是遗传性视网膜变性的基因治疗提供了非常好的条件。就 CRISPR/Cas9 基因编辑技术及该技术在眼遗传病基因治疗方面的应用研究进展进行综述。

1 CRISPR/Cas9 系统的研究背景

CRISPR 序列的研究最早可追溯到 1987 年, Ishino 等^[6]在研究大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶 (isozymes of alkaline phosphatase, IAP) 基因时,意外地在 IAP 基因的下游发现了一组 29 个核苷酸 (nucleotide, nt) 的重复序列,与大多数的重复序列不同,这 29 nt 重复序列中间隔着 5 个 32 nt 的非重复序列,但当时这一现象并未引起研究者的关注。在接下来的十几年时间里,随着越来越多的微生物基因组测序的完成,发现在不同的细菌和古菌的基因组中也有重复序列。2000 年, Mojica 等^[7]发现这一特殊的重复序列在 40% 以上的被测细菌和 90% 的古菌中均存在,这些早期的发现激起了大家对这些微生物中重复序列的研究兴趣。2002 年, Jansen 等^[8]重新将这一重复序列命名为成簇规律性间隔短回文重复,简称为 CRISPR,并发现在这一重复序列周边存在多种有意义的编码序列,命名为 CRISPR 相关核酸酶,即 Cas。这也成为最终 CRISPR 系统分类的基础 (I ~ III 型)^[9-10]。在 2005 年出现了一个重大的转折点,3 个研究团队先后报道了一个重大发现,CRISPR 的间隔 DNA 序列并非来自原核生物本身,而是来自外源入侵细菌的噬菌体^[11-13],随后提出了多种假说。直到 2007 年, Barrangou 等^[14]通过实验研究首次证明了 CRISPR/Cas 是一种细菌获得性免疫系统,此后开展了一系列关于 CRISPR 防御机制的研究^[15-16]。2010 年,CRISPR 的基本功能和机制得到阐明,然而其应用范围却非常有限,基因编辑的应用技术仍未开发,因为研究的 I 型和 III 型系统均过于复杂。2 项研究揭示了 II 型 CRISPR 系统的功能和作用机制,首先是 Moineau 等^[17]通过对嗜热链球菌的研究揭示了 Cas9 是 Cas 基因簇中唯一介导靶向 DNA 切割的酶; Charpentier 等^[18]发现了一种非编码的反式激活 CRISPR RNA (transactivating CRISPR RNA, tracrRNA),可与 crRNA (CRISPR RNA) 结合,并与 Cas9 和 RNA 酶 III 一起促进 crRNA 的加工和成熟。2012 年, Jinek 等^[19]发现可以将 tracrRNA 与 crRNA 连接成一种 RNA,称为 sgRNA,并成功地在体外指导 Cas9 进行 DNA

切割,这是一个突破性的研究进展。2013 年,多个团队同时成功地在哺乳动物细胞内实施了基因编辑^[20-21]。此后这项 RNA 介导的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在世界范围内的实验室得到广泛应用。

2 CRISPR/Cas9 系统的作用机制

细菌的 CRISPR 系统发挥作用需经历 3 个阶段:(1) 细菌被噬菌体感染后,CRISPR 系统会识别噬菌体基因中的原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motifs, PAM) 序列,即位于原间隔序列的两端的保守序列,一般形式为 NGG (N 为任意碱基, G 为鸟嘌呤),随后 Cas 酶会切割原间隔序列,并整合到 CRISPR 基因座中;(2) 同种噬菌体再次感染细菌时会诱导 CRISPR 基因座的表达,经转录和转录后加工产生 crRNA;(3) crRNA 与 tracrRNA 结合,并与 Cas 蛋白形成复合体介导切割,从而抵抗噬菌体的侵入^[19,22]。通过人工构建 II 型 CRISPR/Cas9 系统,可直接将 crRNA 与 tracrRNA 嵌合形成 sgRNA,在 sgRNA 的介导下,Cas9 蛋白在目的基因序列特定位点进行切割,产生 DSBs,从而引发细胞内启动 NHEJ 或 HDR 修复机制^[20-21]。若细胞内缺乏 DNA 修复模板,DSBs 处会通过 NHEJ 造成多种突变,包括替换、缺失或者插入,可用于基因的敲除。当细胞内有外源 DNA 作为模板时,可以通过 HDR 途径精确实现碱基的替换或插入,可用于基因的插入^[23]。NHEJ 的机制简单且不依靠模板,因而 NHEJ 的活性比 HDR 要高很多,但 NHEJ 出错概率较高,容易造成移码突变,而基因编辑技术正是利用了这一特点。

3 CRISPR/Cas9 系统在眼遗传病治疗中的应用

遗传病是指由遗传物质发生改变而引起的疾病,或者是由致病基因所控制的疾病。对眼遗传病进行基因治疗是目前世界上的研究热点,目前已开展了基因替代疗法治疗多种眼遗传性疾病的临床试验^[2,24-27],最早的临床试验是由视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 65 突变导致的 Leber 先天性黑矇 (Leber congenital amaurosis, LCA) 的基因替代治疗,取得了较好的结果。相对于外源导入基因,利用基因编辑技术直接修复突变的基因无疑是更安全的,CRISPR/Cas9 作为一种高效的基因编辑技术,显示了其能同时对多个基因进行特异的和有效的编辑能力,为遗传性眼病的治疗带来了希望,此外 CRISPR/Cas9 技术与其他方法的结合为相关眼病的治疗提供了新的途径,如腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 和诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 方法等。目前 CRISPR 技术的治疗策略主要包括利用 NHEJ 来沉默致病基因、删除插入的致病基因、利用 HDR 修正突变的致病基因或引入正确基因以替换致病基因^[28]。

3.1 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗先天性白内障

先天性白内障是一种严重影响婴幼儿视力及视觉发育的眼病,常表现为白瞳征,除此之外,严重的先天性白内障患者视力低下或双眼视力不平衡,因此会并发眼球震颤、眼位偏斜、不能注视等。先天性白内障常见的遗传方式为常染色体显性遗

传,而常染色体隐性遗传和 X 性连锁隐性遗传也有报道^[29]。目前已有 40 余个基因被证实与遗传性白内障的发生有关^[30]。*CRYGC* 基因可以导致常染色体显性遗传的先天性白内障,Wu 等^[31]最先在相应的先天性白内障小鼠模型中进行研究,这些模型小鼠携带有 *CRYGC* 基因 3 号外显子上 1 bp 的缺失突变,导致了第 76 个氨基酸的翻译终止。研究者将携带 Cas9/sgRNA 的 mRNA 一起注射到含有该突变的小鼠受精卵,靶向作用于突变的等位基因,最后存活下来的 78 只小鼠中有 24 只突变位点被修正,与野生型小鼠的基因型一致且未发生白内障,晶状体的组织学表现与正常对照也是一致的。研究结果显示,CRISPR/Cas9 系统可通过 NHEJ 或者 HDR 矫正遗传缺陷来治愈遗传性疾病。

3.2 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗角膜营养不良

Meesmann 角膜上皮营养不良 (Meesmann's epithelial corneal dystrophy, MECD) 是一种常染色体显性遗传性角膜疾病^[32],*KRT12* 为 MECD 的致病基因^[33]。Courtney 等^[34]发现 *KRT12* 基因 c.395T>C (p. Leu132Pro) 突变导致一种新的原间隔序列邻近基序 (protospacer adjacent motifs, PAM) 出现,进而设计了靶向与该核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 来源的 PAM 结合的 sgRNA,研究者通过 NHEJ 使这个突变失活或者进行矫正,在体外细胞实验中验证 sgRNA 的作用后,又向携带人类 *MECD* 基因突变小鼠的角膜基质内注射 sgRNA 和 Cas9 表达质粒,然后从这些小鼠角膜中扩增 *KRT12* 基因并测序,发现约 40% 的细胞中可观察到 NHEJ 的修复作用。颗粒状角膜营养不良 (granular corneal dystrophy, GCD) 是一种常染色体显性遗传病,它是由 *TGFBI* 基因上的位点突变所致,Taketani 等^[35]利用 CRISPR/Cas9 设计了靶向作用于 *TGFBI* 基因上 c.370G>A (p. Arg124His) 突变的 gRNA,并在体外向该突变 GCD 患者来源的角膜基质细胞里导入含有 Cas9 和 gRNA 的质粒以及作为修复模板的单链寡核苷酸 (single-stranded oligonucleotide, ssODN) 成功地进行了基因修正,该方法表现出了高度的特异性,未出现脱靶现象。

3.3 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗青光眼

原发性开角型青光眼 (primary open angle glaucoma, POAG) 是世界范围内不可逆盲的主要原因,典型表现为视盘的凹陷性萎缩和视野的特征性缺损。*MYOC* 是首个发现的与罹患青光眼有关的致病基因^[36],其突变导致相关蛋白错误折叠并积聚在小梁网细胞内,引起小梁网组织压力升高,使房水流出减少,眼压升高,占 POAG 患者人数的 4%。Jain 等^[37]使用 CRISPR/Cas9 分别在人小梁网细胞和 Tg-*MYOC*^{Y437H} 小鼠模型上敲低发生突变的 *MYOC* 基因的表达,可阻止 *MYOC* 基因突变所致的肌纤维蛋白的不良作用,减少错误折叠的蛋白在小梁网细胞中的积聚,降低细胞中内质网的压力,进而预防年幼的 Tg-*MYOC*^{Y437H} 小鼠眼压升高,也可以降低小鼠升高的眼压,说明小梁网细胞可以在一段时间内耐受内质网压力的升高,这些结果在供体眼球的研究中也得到了证明。

3.4 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗视网膜色素变性

视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 是一组以进行性

视网膜光感受器细胞及 RPE 功能丧失为主要特征的遗传性视网膜退行性病变,典型症状包括夜盲、进行性视野缺损、眼底骨细胞样色素沉着、视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 异常或者无波形。RP 具有明显的遗传异质性,遗传方式可为常染色体显性遗传 (30% ~ 40%)、常染色体隐性遗传 (50% ~ 60%) 和 X 性连锁隐性遗传 (5% ~ 15%)^[38],目前尚无有效治疗方法。基因治疗以及基因编辑技术的出现使 RP 的治疗取得了一定进展。*RHO* 基因是常染色体显性遗传 RP 中常见的一个致病基因,西方人群中 25% 常染色体显性遗传的 RP 为该基因突变导致的^[38],Bakondi 等^[39]利用携带 *RhoS334* 点突变的常染色体显性遗传性 RP 大鼠模型进行研究,该突变导致 Rho 蛋白功能缺失并使感受器细胞凋亡,在大鼠模型视网膜下注射 sgRNA/Cas9 质粒,利用电穿孔刺激光感受器吸收质粒,进而选择性地删除携带有突变的等位基因,注射后大鼠的视功能改善。Latella 等^[40]对携带 Pro23His (P23H) 突变大鼠模型进行基因编辑治疗,将 2 个 sgRNA 编码在一个质粒上,并与化脓性链球菌属 Cas9 (streptococcus pyogenes Cas9, SpCas9) 共同注射至视网膜下,使 Rho 蛋白表达下降。这 2 个团队的研究结果都证明了 CRISPR/Cas9 技术治疗显性遗传性视网膜病变的可能性。

还有些研究者的思路与众不同,Yu 等^[41]认为,RP 患者视功能丧失是由于视锥细胞丢失,而视锥细胞的丢失是视杆细胞退化的继发改变,*Nrl* 是一个在视杆细胞发育过程中起重要作用的基因,研究者通过 CRISPR/Cas9 靶向破坏 *Nrl* 基因来影响视杆细胞的发育分化,使其获得部分视锥细胞的功能特征,提高视杆细胞的存活能力,并阻止视锥细胞的继发性退化,研究者在 3 种不同突变的 RP 的小鼠模型都发现基因编辑后视杆细胞存活时间延长,残存视锥细胞功能得以保留。这项研究开创性地设想了一个全新的治疗策略,即不管是何种遗传方式的 RP 都可以通过破坏 *Nrl* 基因来延迟视杆细胞和视锥细胞功能的退化。

rd1 小鼠为一种在 *Ped6b* 基因上含有 2 个纯和突变的模型,分别是 Y347X 和 1 号内含子白血病毒病的 (*Xmv-28*) 插入突变,但一直以来都未确定哪个纯和突变才是真正的致病突变。Wu 等^[42]通过 CRISPR/Cas9 修复了 *rd1* 小鼠在 *Ped6b* 基因上的无义突变 (Y347X) 后小鼠表型出现改善,其后代未发生同样病变,证明了 Y347X 是致病突变。另外,由于 HDR 和 NHEJ 作用的效率及局限性,Suzuki 等^[43]通过 CRISPR/Cas9 技术设计了一种同源独立的靶向整合 (homology-independent targeted integration, HITI) 方法,可将 DNA 敲入分裂和不分裂的细胞,更将携带 *Mertk2* 号外显子拷贝的载体插入到 *Mertk* 基因 1 号内含子至 2 号外显子 1.9 kb 缺失突变的大鼠模型中,大鼠视功能得到提高,表明了这种技术在基因治疗方面的潜能。

3.5 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗 LCA

LCA 是一种严重的致盲遗传性视网膜疾病,患者出生时或出生不久即出现视力丧失,可伴有眼球震颤、黑矇瞳孔、畏光等,ERG 记录不到或波幅严重降低,多数患者呈常染色体隐性遗传。目前共确定了 18 个致病基因与该病有关^[44]。LCA 是首个基因治疗的眼病,目前对 RPE 特异性 65 000 蛋白 (retinal

pigment epithelial cells 65 kDa protein, RPE65) 相关 LCA 的基因替代治疗疗效良好。由 *CEP290* 基因突变导致的 LCA10 是西方人群常见的 LCA 亚型^[45], 其中常见突变是深部内含子区的剪切突变。Ruan 等^[46]将该剪切突变导入 HEK293FT 细胞中, 构建出 LCA10 相应的细胞模型, 运用 gRNA/SpCas9 能够高效地敲除该突变并恢复细胞中野生型 *CEP290* 基因的表达, 虽然缺乏相应的动物模型, 但研究者在野生型小鼠中进行有效性检测时发现, sgRNAs 和 SpCas9 能够靶向性敲除小鼠 *CEP290* 内含子上的基因片段。这些结果证实运用以 CRISPR/Cas9 为基础的基因治疗策略能治疗 LCA10。

3.6 利用 CRISPR/Cas9 技术治疗 Usher 综合征

Usher 综合征是常见的伴有感音神经性耳聋和 RP 的遗传性疾病, 目前发现有 13 个基因与该病有关^[47], *USH2A* 基因突变是其主要原因之一, 但该基因长达 15 kb, 在以往的基因替代治疗方法中, 由于 AAV 本身的结构特点, 重组载体携带目的基因的大小有限, 最多可携带的基因片段为 5.1 ~ 5.3 kb^[48-49], 但是通过 CRISPR/Cas9 技术的基因编辑技术却能克服这些问题, 显示出了巨大的优势。Fuster-García 等^[50]利用 CRISPR/Cas9 的 HDR 修复方式成功地在 HEK293 细胞中导入 *USH2A* 基因中常见的 c. 2299delG 和 c. 2276G>T 突变, 并进一步在 c. 2299delG 纯和突变患者身上分离的皮肤成纤维细胞中导入 sgRNA 和 Cas9, 并对突变进行修正, 尽管在皮肤成纤维细胞中的基因编辑效率不如 HEK293 细胞中那么高, 但其结果说明了 CRISPR/Cas9 在片段较大基因中应用的可能性^[50], 也为该相关疾病的基因治疗带来了希望。

3.7 CRISPR/Cas9 与 AAV

作为小型非致病性病毒, AAV 是一种遗传性视网膜变性基因治疗过程中安全且长期有效的基因载体^[51], 而且不同亚型的 AAV 可作用于视网膜的不同细胞^[52]。既往的基因替代治疗是将外源基因通过 AAV 递送到视网膜, 随着 CRISPR/Cas9 技术的发展, AAV 与 CRISPR 结合成为新的研究方向。Hung 等^[53]利用 AAV2 载体分别递送 Cas9 和 sgRNA 到视网膜上, 靶向作用于 Thy1-YFP 转基因小鼠模型上表达的 YFP, 发现其在不影响视网膜功能的情况下有效地减少了视网膜 YFP 阳性细胞, 表明将 AAV 和 CRISPR/Cas9 结合应用是可行的。

3.8 CRISPR/Cas9 与 iPSCs

CRISPR/Cas9 作为一种工具, CRISPR/Cas9 可与 iPSCs 相结合, 在体外先矫正基因的突变, 然后移植到病变的视网膜上^[54]。Bassuk 等^[55]将 X 连锁遗传性 RP 患者的皮肤成纤维细胞诱导成 iPSCs, 由于 iPSCs 上也具有患者的突变基因, 因此利用 CRISPR/Cas9 可将这些分化的离体细胞进行修复, 细胞测序发现, 13% 的细胞突变得得到矫正或修复, 理论上这些修复过的 iPSCs 可作为自体移植细胞, 有效地避免异体移植免疫排斥现象。Burnight 等^[56]进一步对包括 *MAK*、*CEP290* 和 *RHO* 等多个基因进行实验, 发现无论突变位点位于外显子区还是深部内含子区, 或是显性的突变, 均可成功地对患者来源的 iPSCs 进行基因修正, 证明利用 CRISPR/Cas9 技术对患者的 iPSCs 进行矫正或修饰是可行的, 也为利用 iPSCs 进行自体移植提供了可能性^[56]。

4 小结

本文总结了近年来利用 CRISPR/Cas9 治疗遗传性眼病的研究结果, 虽然该技术仍处于研究及临床应用的早期阶段, 面临的挑战仍然很多, 主要是需减少脱靶现象, 但这项全新的、具有革命性的基因编辑技术为眼科遗传性疾病的治疗提供更多的可能, 当然相关研究须详细规划和严格监管, 并须根据其有效性、安全性和特异性进行优化, 以便更好地开展相关的应用基础研究及临床转化, 但该技术的不断进步无疑是值得期待的。

参考文献

- [1] Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358 (21) : 2231-2239. DOI: 10.1056/NEJMoa0802268.
- [2] Bainbridge JW, Mehat MS, Sundaram V, et al. Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372 (20) : 1887-1897. DOI: 10.1056/NEJMoa1414221.
- [3] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (4) : 347-355. DOI: 10.1038/nbt.2842.
- [4] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157 (6) : 1262-1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [5] Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege [J]. *F1000 Biol Rep*, 2010, 2 (1) : 1885-1889. DOI: 10.3410/B2-3.
- [6] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169 (12) : 5429-5433.
- [7] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 36 (1) : 244-246.
- [8] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43 (6) : 1565-1575.
- [9] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes [J/OL]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1 (6) : e60 [2018-03-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1282333/>. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0010060.
- [10] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9 (6) : 467-477. DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- [11] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60 (2) : 174-182. DOI: 10.1007/s00239-004-0046-3.
- [12] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology*, 2005, 151 (Pt 3) : 653-663. DOI: 10.1099/mic.0.27437-0.
- [13] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin [J]. *Microbiology*, 2005, 151 (Pt 8) : 2551-2561. DOI: 10.1099/mic.0.28048-0.
- [14] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315 (5819) : 1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- [15] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321 (5891) : 960-964. DOI: 10.1126/science.1159689.
- [16] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008,

- 322(5909) : 1843–1845. DOI:10.1126/science.1165771.
- [17] Gameau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. *Nature*, 2010, 468(7320) : 67–71. DOI:10.1038/nature09523.
- [18] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471(7340) : 602–607. DOI:10.1038/nature09886.
- [19] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096) : 816–821. DOI:10.1126/science.1225829.
- [20] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121) : 819–823. DOI:10.1126/science.1231143.
- [21] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339(6121) : 823–826. DOI:10.1126/science.1232033.
- [22] Chylinski K, Le RA, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(5) : 726–737. DOI:10.4161/rna.24321.
- [23] Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system [J]. *Cell Rep*, 2013, 4(1) : 220–228. DOI:10.1016/j.celrep.2013.06.020.
- [24] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(21) : 2240–2248. DOI:10.1056/NEJMoa0802315.
- [25] MacLaren RE, Groppa M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia; initial findings from a phase 1/2 clinical trial [J]. *Lancet*, 2014, 383(9923) : 1129–1137. DOI:10.1016/S0140-6736(13)62117-0.
- [26] Kong J, Kim SR, Binley K, et al. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(19) : 1311–1320. DOI:10.1038/gt.2008.78.
- [27] Komáromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, et al. Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(13) : 2581–2593.
- [28] Zhang F. CRISPR-Cas9: Prospects and challenges [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, 26(7) : 409–410. DOI:10.1089/hum.2015.29002.fzh.
- [29] Pichi F, Lembo A, Serafino M, et al. Genetics of congenital cataract [J]. *Dev Ophthalmol*, 2016, 57 : 1–14. DOI:10.1159/000442495.
- [30] Shiels A, Hejtmancik JF. Genetics of human cataract [J]. *Clin Genet*, 2013, 84(2) : 120–127. DOI:10.1111/cge.12182.
- [31] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6) : 659–662. DOI:10.1016/j.stem.2013.10.016.
- [32] Corden LD, Swensson O, Swensson B, et al. Molecular genetics of Meesmann's corneal dystrophy: ancestral and novel mutations in keratin 12 (K12) and complete sequence of the human KRT12 gene [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(1) : 41–49. DOI:10.1006/exer.1999.0769.
- [33] Irvine AD, Corden LD, Swensson O, et al. Mutations in cornea-specific keratin K3 or K12 genes cause Meesmann's corneal dystrophy [J]. *Nat Genet*, 1997, 16(2) : 184–187. DOI:10.1038/ng0697-184.
- [34] Courtney DG, Moore JE, Atkinson SD, et al. CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both *in vitro* and *in vivo* KRT12 mutation-specific targeting [J]. *Gene Ther*, 2016, 23(1) : 108–112. DOI:10.1038/gt.2015.82.
- [35] Taketani Y, Kitamoto K, Sakisaka T, et al. Repair of the *TGFBI* gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 16713 [2018-03-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5711889/>. DOI: 10.1038/s41598-017-16308-2.
- [36] Stone EM, Fingert JH, Alward WL, et al. Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma [J]. *Science*, 1997, 275(5300) : 668–670.
- [37] Jain A, Zode G, Kasetti RB, et al. CRISPR-Cas9-based treatment of myocilin-associated glaucoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(42) : 11199–11204. DOI:10.1073/pnas.1706193114.
- [38] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa [J]. *Lancet*, 2006, 368(9549) : 1795–1809. DOI:10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- [39] Bakondi B, Lv W, Lu B, 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. DOI:10.1038/mt.2015.220.
- [40] Latella MC, Di SMT, Cocchiarella F, et al. *In vivo* editing of the human mutant rhodopsin gene by electroporation of plasmid-based CRISPR/Cas9 in the mouse retina [J/OL]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(11) : e389 [2018-03-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5155324/>. DOI:10.1038/mtna.2016.92.
- [41] Yu W, Mookherjee S, Chaitankar V, et al. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8 : 14716 [2018-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355895/>. DOI: 10.1038/ncomms14716.
- [42] Wu WH, Tsai YT, Justus S, et al. CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(8) : 1388–1394. DOI:10.1038/mt.2016.107.
- [43] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, 540(7631) : 144–149. DOI:10.1038/nature20565.
- [44] Yzer S, Hollander AI, Lopez I, et al. Ocular and extra-ocular features of patients with Leber congenital amaurosis and mutations in CEP290 [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 412–425.
- [45] den Hollander AI, Koeneke RK, Yzer S, et al. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis [J]. *Am J Hum Genet*, 2006, 79(3) : 556–561. DOI:10.1086/507318.
- [46] Ruan GX, Barry E, Yu D, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for leber congenital amaurosis 10 [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2) : 331–341. DOI:10.1016/j.ymthe.2016.12.006.
- [47] Mathur P, Yang J. Usher syndrome: hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(3) : 406–420. DOI:10.1016/j.bbdis.2014.11.020.
- [48] Kügler S, Lingor P, Schöll U, et al. Differential transgene expression in brain cells *in vivo* and *in vitro* from AAV-2 vectors with small transcriptional control units [J]. *Virology*, 2003, 311(1) : 89–95.
- [49] Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(17) : 2101–2112. DOI:10.1089/hum.1996.7.17-2101.
- [50] Fuster-García C, García-García G, González-Romero E, et al. *USH2A* gene editing using the CRISPR system [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017, 8 : 529–541. DOI:10.1016/j.omtn.2017.08.003.
- [51] Day TP, Byrne LC, Schaffer DV, et al. Advances in AAV vector development for gene therapy in the retina [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 801 : 687–693. DOI:10.1007/978-1-4614-3209-8_86.
- [52] Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, et al. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(12) : 2096–2102. DOI:10.1038/mt.2009.181.
- [53] Hung SS, Chrysostomou V, Li F, et al. AAV-mediated CRISPR/Cas gene editing of retinal cells *in vivo* [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7) : 3470–3476. DOI:10.1167/iovs.16-19316.
- [54] Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 44 : 15–35. DOI:10.1016/j.preteyeres.2014.10.002.
- [55] Bassuk AG, Zheng A, Li Y, et al. Precision medicine: genetic repair of retinitis pigmentosa in patient-derived stem cells [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 19969 [2018-02-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728485/>. DOI:10.1038/srep19969.
- [56] Burnight ER, Gupta M, Wiley LA, et al. Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration [J]. *Mol Ther*, 2017, 25(9) : 1999–2013. DOI:10.1016/j.ymthe.2017.05.015.

(收稿日期:2018-05-07 修回日期:2018-09-27)

(本文编辑:尹卫靖 刘艳)