

领域前沿 · 中国



常兴, 中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所研究员, 博士研究生导师, 中组部青年千人计划、上海市浦江人才计划获得者。2001年获北京大学理学学士, 2006年获美国俄亥俄州立大学博士学位, 2007年至2011年在耶鲁大学免疫学系从事博士后研究; 2011年至2012年在拉霍亚感染和免疫研究所任研究科学家。常兴课题组主要研究淋巴细胞发育和免疫耐受的分子机制。在国际学术杂志Nat Methods、Immunity、eLife、J Exp Med、Blood、J Immunol上发表学术论文20余篇, 多篇论文及学术成果被国际权威杂志重点报道。2014年起承担科技部973计划青年科学家专题一项, 担任首席科学家。近期, 在Nat Methods上发表的研究成果发现, 当把核酸酶缺陷的Cas9蛋白和诱导抗体高频突变的胞嘧啶脱氨酶AID融合后, 在sgRNA靶向的基因组DNA上, 胞嘧啶和鸟嘌呤可以随机的向其他三个碱基转变。这一新方法可以对细胞内的特定DNA序列进行多样化, 完成遗传筛选, 从而分析单核苷酸突变的功能, 或者直接在哺乳动物细胞内诱导蛋白进化。

AID介导的原位靶点突变——哺乳动物DNA 碱基编辑新技术

马云青 常兴*

(中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所, 上海 200031)

摘要 单核苷酸的多样性是遗传多样性的主要来源, 是人类个体差异的重要遗传学基础, 同时也是分子进化的动力和很多疾病的直接诱因。然而, 在哺乳动物中, 仍然缺乏有效诱导单核苷酸的突变的工具, 无法通过实验高效和高通量地研究单核苷酸突变的功能。现有的大部分实验技术只能扰乱基因的功能或者表达, 造成基因功能缺失, 对诱导新功能的获得无能为力。而利用靶向性胞嘧啶脱氨酶介导的碱基编辑(targeted AID-mediated mutagenesis, TAM)技术, 可以在sgRNA靶向的基因组DNA上, 将胞嘧啶和鸟嘌呤随机地向其他三个碱基转变, 因而产生海量的突变体, 结合遗传筛选, 从而分析单核苷酸突变的功能或诱导蛋白质的体内进化。同时, 在一种多肽抑制剂(uracil glycosylase inhibitor, UGI)的辅助下, TAM可以诱导特定的胞嘧啶向胸腺嘧啶转变, 实现单碱基的精确编辑, 为治疗单核苷酸突变诱导的遗传病提供方案。利用这项技术, 已经在慢性骨髓瘤细胞中, 成功筛选出已报道的以及新的Imatinib耐药性位点。因此, 作为高效的哺乳动物DNA碱基编辑新技术, TAM可以广泛应用于蛋白质工程、分子遗传学研究和基因治疗等领域。

关键词 单核苷酸突变; 基因编辑技术; 靶向性AID介导的核苷酸突变技术(TAM)

*通讯作者。Tel: 021-54923310, E-mail: changxing78@hotmail.com

*Corresponding author. Tel: +86-21-54923310, E-mail: changxing78@hotmail.com

网络出版时间: 2017-02-27 13:37:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170227.1337.004.html>

Targeted AID-Mediated Mutagenesis (TAM) — A New Technology for DNA Base Editing in Mammalian Cells

Ma Yunqing, Chang Xing*

(Institute of Health Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract A large number of genetic variants have been associated with human diseases. However, the lack of a genetic diversification approach has impeded our ability to interrogate functions of genetic variants in mammalian cells. Current screening methods can only be used to disrupt a gene or alter its expression. Here we report the fusion of activation-induced cytidine deaminase (AID) with nuclease-inactive clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated protein 9 (dCas9) for efficient genetic diversification, which enabled high-throughput screening of functional variants. Guided by single guide (sg)RNAs, dCas9-AID-P182X (AIDx) directly changed cytidines or guanines to the other three bases independent of AID hotspot motifs, generating a large repertoire of variants at desired loci. Coupled with a uracil-DNA glycosylase inhibitor, dCas9-AIDx converted targeted cytidines specifically to thymines, creating specific point mutations. By targeting BCR-ABL with dCas9-AIDx, we efficiently identified known and new mutations conferring imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. Thus, targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) provides a forward genetic tool to screen for gain-of-function variants at base resolution.

Keywords single-nucleotide variants; genome editing technology; targeted AID-mediated mutagenesis (TAM)

1 单核苷酸基因编辑的现状

单核苷酸多样性是遗传多样性的主要来源,是分子进化的动力和很多疾病的直接诱因^[1]。例如,单核苷酸的多样性与肿瘤的发生息息相关,大量测序结果表明,原癌基因和抑癌基因上的单核苷酸突变是肿瘤发生的重要原因^[2]。除此之外,激酶结构域是肿瘤药物的治疗靶点,然而编码激酶结构域基因中的单核苷酸突变赋予肿瘤细胞耐药性,向肿瘤治疗提出了更高的挑战^[3]。另外,因为单核苷酸的改变大多不会破坏蛋白质的整体结构,同时改变蛋白的功能,因此是分子进化的重要机制之一。

尽管单核苷酸突变是很多疾病的直接诱因,但无法通过常规的基因敲除或过表达来研究单核苷酸突变与基因功能的关系。因此,急需一种筛选工具在基因组上靶向诱导单核苷酸突变,产生大量多样的功能突变体,以用于研究单核苷酸突变与基因功能的关系。

由于哺乳动物基因组的高度稳定性,在哺乳动物细胞内很难高效和高通量地诱导单核苷酸的突变^[4]。另外,实验室现有的体内单核苷酸突变方法有其局限性,如物理方法——紫外辐射,突变频率为 1×10^{-10} ;化学方法——烷化剂乙基亚硝基脲

(N-ethyl-N-nitrosourea, ENU),引起错配,单核苷酸突变或者缺失,突变频率为 $(1 \sim 1.5) \times 10^{-5}$ ^[5]。这些方法效率极低,且产生的突变方向随机,突变图谱不均一,限制了它们的应用,往往需要很大的工作量去确定突变的位点。

作为细菌中的适应性免疫机制,CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9[(CRISPR)-associated protein 9]是近年来发展的一种便捷的基因组编辑技术,可以使目标基因删除和插入,这些应用都是基于在sgRNA的介导下,Cas9蛋白在目的基因处切割,形成双链DNA断裂(double strand breaks, DSBs),从而对基因组进行编辑^[6-8]。除此之外,当RuvC结构域和HNH结构域同时处于失活状态时(D10A&H840A; RuvC⁻&HNH⁻),Cas9将不具有核酸酶活性,成为dCas9(dead Cas9)^[9],同样可以作为基因编辑工具。dCas9虽然没有剪切DNA的能力,但仍然可以在gRNA的引导下与特定的DNA序列结合。前期研究表明,通过将特定的转录激活因子和抑制因子与dCas9复合体融合,能够精确地激活或沉默基因表达。例如,dCas9与多个VP16结构域或KRAB(Kruppel-associated box domain)结合进行转录激活或抑制。同时与相应的功能域结合,

还能进行表观遗传修饰^[10-11]。

虽然CRISPR/Cas9方法可以精确地对DNA进行编辑,但受限于同源DNA修复的效率低的缺点,因此现在主要用于基因的敲除,无法高效产生单核苷酸突变^[6-8]。因此,如何高效地在细胞内引入单核苷酸突变被认为是基因编辑领域的重大挑战之一。

与大部分体细胞不同,适应性免疫系统在B淋巴细胞激活过程中可以对B细胞基因组的特定区域进行高效编辑,作为一种“突变自我”的机制,对抗原受体的可变区进行高频突变,近乎无限的抗原受体库,用以抵御可能的病原体入侵^[12-13]。生发中心B细胞特异性表达的激活诱导的胞嘧啶脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID)是体细胞高频突变的分子基础。AID将胞嘧啶脱氨基形成尿嘧啶,产生U-G碱基错配。U-G错配有两种修复路径。第一种是,如果错配不被及时修复,在DNA复制过程中,产生C-T和G-A的突变。第二种是,U-G错配被尿嘧啶DNA糖基化酶(uracil-N-glycosylase, UNG)切除,产生无嘧啶位点,通过碱基切除修复引入非模板依赖性的单核苷酸突变。前期研究表明,在非B细胞系中,外源表达的AID突变效率会大幅下降,且AID的作用位点缺少靶向性^[14]。为解决这两个问题,我们采用CRISPR/Cas9技术。

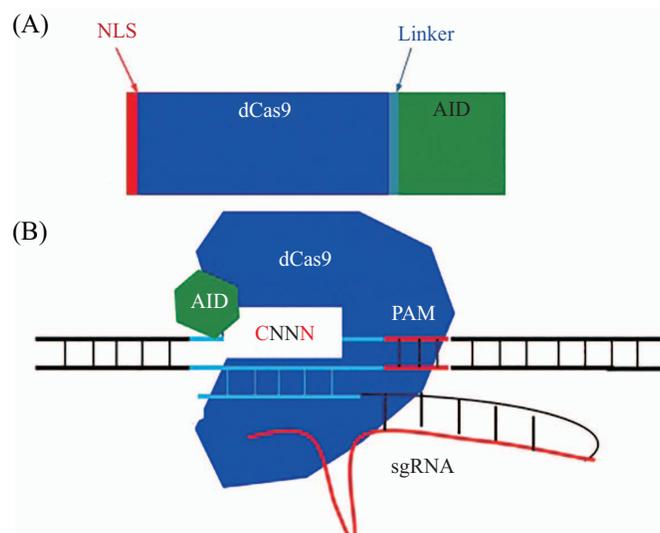
基于这些背景,我们猜想,通过dCas9蛋白与AID融合,将哺乳动物(体细胞高频突变)和古生菌的

适应性免疫系统(CRISPR)结合,dCas9可以在sgRNA的靶向作用下,将AID招募到靶向区域,并且可以提高AID的局部浓度,有效提高和扩展AID作用范围,在非B细胞中针对特定基因实现高频突变,产生遗传多样性(图1)。

2 靶向性胞嘧啶脱氨酶(targeted AID-mediated mutagenesis, TAM)的靶向性和高效性

为检测dCas9-AID融合蛋白的单核苷酸突变效率,我们首先在293T细胞中建立报告系统,将绿色荧光蛋白基因整合入293T基因组中。该绿色荧光蛋白基因中部插入终止密码子TAG,绿色荧光蛋白无法正常表达;只有当TAG突变向TAC/TAT时,绿色荧光蛋白才能正常表达。因此,通过流式检测EGFP阳性的细胞比例来指示单核苷酸突变效率。在报告细胞中共转表达sgRNA和dCas9-AID两种质粒,其中sgRNA是针对EGFP终止密码子TAG的上下游100 bp设计的4个sgRNA,同时设置对照组在报告细胞中单转AID。在转染后第7 d流式检测,AID组的EGFP⁺%约0.2%,而共转dCas9-AID和针对TAG终止密码子的sgRNA组的EGFP⁺%达到2%,EGFP⁺%得到10倍提高。实验结果证明,dCas9-AID融合蛋白能有效纠正GFP中的终止密码子(TAG)。

为了进一步优化dCas9-AID系统的效率,我



A: dCas9-AID融合蛋白示意图; B: 在sgRNA导向作用下, dCas9-AID被招募到靶点, 突变基因组上特定位点的胞嘧啶。

A: AID (activation induced deaminase) is fused to the carboxyl terminus of a catalytically inactive Cas9 protein (dCas9); B: when paired with single-guided RNAs (sgRNAs), the fusion protein can be recruited to targeted genomic regions to deaminate cytidines *in situ*.

图1 dCas9-AID设计原理图

Fig.1 A schematic of dCas9-AID design

们将dCas9与不同的AID突变体融合,其中,dCas9-P182X(C端核输出信号删除的AID突变体)效率最高,相对于dCas9-AID效率得到2倍提高。因此,我们使用dCas9-P182X(dCas9-AIDx)进行后续实验。为了证明确实是由AIDx与dCas9融合才赋予dCas9-AIDx融合蛋白单核苷酸突变功能,我们在报告子系统中分别共转Cas9、dCas9、dCas9-AIDx(E58Q)(AID脱氨酶失活突变体)、dCas9-AIDx和针对EGFP中终止密码子的4个sgRNA,只有dCas9-AIDx组EGFP⁺%为5.2%,而其他组均为0。这一实验结果表明,确实是AIDx与dCas9的融合才使整个系统具有单核苷酸突变功能。

通过流式在蛋白水平检测EGFP⁺%的水平来指示单核苷酸突变频率,这只是一比较便捷的评估方式,更直接、精确的方法是通过高通量测序来检测单核苷酸突变频率的高低。因此,我们抽提细胞基因组DNA,通过PCR将目的基因EGFP加上接头序列,通过illumina高通量测序来检测单核苷酸突变频率。

单独转染AIDx会在EGFP整个基因上均匀产生单核苷酸突变,并且突变频率只有1%~2%,与之前的报道吻合^[14]。然而,共转dCas9-AID和针对终止密码子的4个sgRNA的报告细胞,约20%的DNA分子含有至少1个突变碱基;并且这些突变主要集中在EGFP基因中TAG终止密码子上下游150 bp。与AID本身性质相似,胞嘧啶和鸟嘌呤是dCas9-AID组的主要突变碱基,占总突变碱基的80%以上。

对sgRNA靶向区域进行具体分析,无论是外源性基因EGFP还是内源性基因AAVSI,dCas9-AIDx都能使靶向区域超过50%的胞嘧啶和鸟嘌呤产生突变,而AIDx只能使低于20%的碱基突变。更重要的是,与AIDx对比,dCas9-AIDx使碱基突变频率得到10倍提高,靶点区域碱基突变频率提高到 4×10^{-4} (次/碱基/细胞周期),这种效率相当于B细胞生发中心反应过程中,体细胞高频突变水平。由此可见,外源表达的dCas9-AIDx对胞嘧啶和鸟嘌呤具有高效编辑作用。

3 TAM引入多样化突变并且摆脱对AID对一级序列的依赖性

根据AID的生化性质,AID将胞嘧啶(C)脱碱基产生尿嘧啶(U)。因此,如果在非B细胞内过表达AID,会产生C向T和G向A的碱基突变类型^[10]。令我们感到惊喜的是,dCas9与AIDx融合之后,碱基突变方向更加多样化。dCas9-AIDx产生的单核苷酸突变

方向更加均一化,打破了原来的单一化格局,更有利于产生多样均一的突变类型。

由这种现象对dCas9-AIDx的突变修饰路径提出一种假设。AID作用于单链DNA的胞嘧啶(C)上,使胞嘧啶脱氨基变成尿嘧啶(U)。随后U-G错配有两种命运。第一种命运,这种错配方式未被及时修复,在DNA复制中被保留,形成C-T和G-A的单核苷酸突变。第二种命运,错配碱基U被UNG切除,形成无嘧啶位点,随后在无嘧啶位点处随机掺入A、T、C、G等4种碱基。而dCas9-AIDx融合蛋白抑制第一条路径,从而使碱基突变方向更加多元化。碱基突变方向的多样化,更有利于产生不同的蛋白突变体,用于功能筛选。

除了能够使碱基突变方向多样化之外,dCas9-AIDx给我们的另外一个惊喜是,dCas9-AIDx使AIDx摆脱对特定DNA一级序列的依赖性。AID发挥胞嘧啶脱氨酶活性,强烈依赖于特定的DNA一级序列,具有活跃作用序列(A/T)GCN(N指任意碱基)^[11]。分别统计AIDx和dCas9-AIDx诱导的突变碱基上下游碱基组成,令突变碱基C为第0位。AIDx具有活跃作用序列(A/T)GCN(N指任意碱基),而对于dCas9-AIDx组,在突变碱基上游-1、-2位,下游+1位,4种碱基均匀分布。因此,dCas9-AIDx除了具有高效的单核苷酸突变能力和多样化的单核苷酸突变方向外,还摆脱了对DNA一级序列的要求。

4 UGI提高TAM效率,固定其突变类型,并揭示其在DNA上的作用轨迹

UGI(uracil glycosylase inhibitor)作为一种噬菌体蛋白,当噬菌体入侵大肠杆菌时,可以保护自身的基因组免受宿主UNG(uracil N-glycosylase)的修复,因此,UGI是UNG的抑制剂,使UNG无法将AID产生的U切除,无法完成下游修复^[15]。共转dCas9-AIDx、UGI和单个sgRNA使单核苷酸突变效率得到10倍提高。除此之外,加入UGI后,突变方向更加单一,只保留C-T和G-A突变。

UGI的使用更有利于我们揭示dCas9-AIDx的作用轨迹。以PAM(proto spacer adjacent motif)序列中NGG中的N为0位。其上游为负(-),下游为正(+),dCas9-AIDx主要在间隔序列区域造成突变,而且突变最高点是在PAM序列+12和+16位。因此利用TAM的这一特点,我们可以在DNA上产生特异的点

突变。

5 碱基编辑新技术的应用

靶向性抗肿瘤药物, 直接特异性的抑制促癌基因的活性, 是近几十年来肿瘤治疗的突破性进展, 但随后的临床实践发现, 很多肿瘤都对靶向性药物产生了耐药。其中, 编码靶点蛋白的DNA中产生单核苷酸突变, 是肿瘤细胞对肿瘤药物产生耐受性的重要原因^[3]。在慢性粒细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的治疗中, 针对原癌基因BCR-ABL位点的伊马替尼(Imatinib)药物, 是第一个开发成功的靶向性药物。Imatinib可以和ATP竞争, 与ABL(abelson murine leukemia viral oncogene homolog)激酶结合, 从而使ABL激酶处于低活性, 抑制肿瘤的生长^[16-17]。但在病人样本中发现, 在ABL基因的酪氨酸激酶活性结构域发生单核苷酸突变, 失去结合Imatinib的能力, 产生耐药性。针对这些突变, 制药公司开发或正在开发新一代的抑制剂, 以挽救病人的生命。因此, 我们认为, 如果可以预测出Imatinib的耐药性突变, 可以加快新药开发的速度, 造福更多的病人。

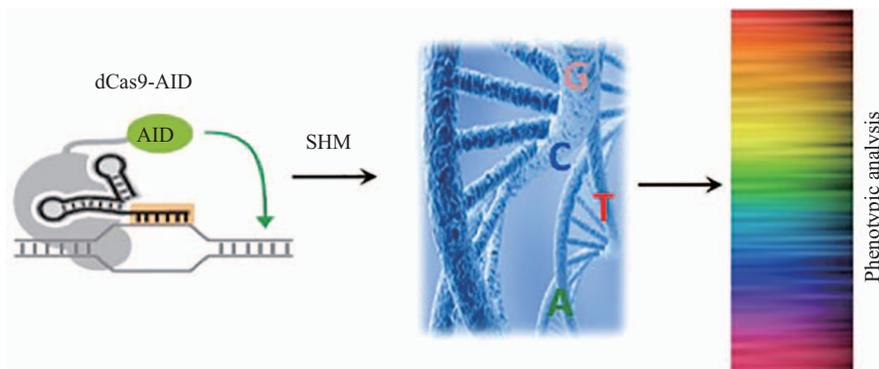
为筛选Imatinib耐药性位点, 针对ABL基因的酪氨酸激酶活性结构域中编码ATP结合位点序列设计sgRNA。在慢性髓样白血病细胞系K562(含BCR-ABL融合基因)中建立稳定表达dCas9-AIDx融合蛋白的细胞系, 随后转染针对AAVSI或ABL激酶结构域的sgRNA库。连续进行Imatinib药物处理2~3周后, 阴性对照组(转染AAVSI sgRNA或未感染任何

sgRNA)细胞全部死亡, 而实验组细胞数目开始增长, 提示有一些细胞获得了耐药性。

收集获得耐药性细胞的RNA和基因组DNA后, 对ABL基因第6个外显子进行高通量测序。数据分析表明, 约30%的DNA分子发生C944T, 即氨基酸发生T315I突变。T315I是在CML病人中发现的第一个耐药性位点。除此之外, 我们还发现6个新的有义突变。在后续实验中, 我们进一步证明这些新突变位点可以赋予K562耐药性, 并且细胞耐药性的强度跟筛选过程中对应的单核苷酸突变频率成正比。以此为例, 我们的结果表明, 利用TAM技术可以有效地预测和筛选对抑制剂耐受的点突变, 为研究大分子-小分子的相互作用和新的药物设计提供新的思路。

6 总结

与其他基因编辑方向相比, 靶向性激活诱导的胞嘧啶脱氨酶(AID)介导的核苷酸突变(targeted AID-mediated mutagenesis, TAM)新技术具有独特的功能: (1)在不存在UGI的情况下, 胞嘧啶可以随机的向其他三个碱基转变; (2)dCas9-AID融合蛋白的活性只依赖于sgRNA, 与AID的识别的一级序列无关; (3)dCas9-AID可以同时诱导多个胞嘧啶的突变, 同时这一方法不依赖于DNA切割和修复, 可以大幅提高单碱基精确编辑的效率, 避免了DNA的双链断裂。因此作为遗传操作的新技术, TAM可以诱导功能获得型的突变, 有着广泛的应用前景, 为分子进化、基因治疗和单碱基水平上分析基因调控元件等领域提供新的方法(图2)。



dCas9-AID融合蛋白, 被sgRNA招募到相应的基因组DNA上, 随机诱导胞嘧啶和鸟嘌呤的点突变, 从而实现体内特定DNA序列的多样化, 通过遗传筛选, 高通量分析单核苷酸突变的功能。

Guided by sgRNAs, dCas9-AID fusion protein is recruited to endogenous genomic loci to induce somatic hypermutation in designated DNA sequence. Subsequently through genetic screening are biological functions of SNVs characterized.

图2 利用dCas9-AID融合蛋白诱导基因组原位点突变的示意图

Fig.2 A cartoon showing to use dCas9-AID fusion protein to induce somatic hypermutation in mammalian cells

除了我们的研究外,另一研究发现, dCas9-AID融合蛋白结合MS2-MCP(MS2 coat protein)系统可以有效编辑胞嘧啶,产生多样化的突变类型,并且编辑窗口更加大,在PAM上下游各50 bp^[18]。和我们的发现类似,另两项研究也先后发现,在UGI存在的情况下, nCas9(Cas9 D10A突变体)与不同类型的胞嘧啶脱氨酶融合可以高效地诱导胞嘧啶向胸腺嘧啶转变,并且其活性只局限于间隔序列的特定碱基,因此可以实现高效率的单碱基精确编辑^[19-20]。这些研究一起证明了靶向性的胞嘧啶脱氨酶作为基因编辑工具的可行性和优势。后续的研究将进一步提高这一系统的效率以及扩展突变的类型(如A/T碱基的修饰)。

参考文献 (References)

- Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, *et al.* Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* 2015; 348(6238): 1036-9.
- Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, *et al.* The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012; 486(7403): 400-4.
- Daub H, Specht K, Ullrich A. Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(12): 1001-10.
- Nachman MW, Crowell SL. Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 2000; 156(1): 297-304.
- Takahasi KR, Sakuraba Y, Gondo Y. Mutational pattern and frequency of induced nucleotide changes in mouse ENU mutagenesis. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 52.
- Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014; 157(6): 1262-78.
- Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346(6213): 1258096.
- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 2013; 10(10): 957-63.
- Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 2013; 23(10): 1163-71.
- Martin A, Bardwell PD, Woo CJ, Fan M, Shulman MJ, Scharff MD. Activation-induced cytidine deaminase turns on somatic hypermutation in hybridomas. *Nature* 2002; 415(6873): 802-6.
- Dörner T, Foster SJ, Farner NL, Lipsky PE. Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: Targeting of RGYW motifs on both DNA strands. *Eur J Immunol* 1998; 28(10): 3384-96.
- Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 1-22.
- Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF, *et al.* The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 481-511.
- Yoshikawa K, Okazaki IM, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, *et al.* AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* 2002; 296(5575): 2033-6.
- Di Noia J, Neuberger MS. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature* 2002; 419(6902): 43-8.
- Nardi V, Azam M, Daley GQ. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Curr Opin Hematol* 2004; 11(1): 35-43.
- Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galiotta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol* 2003; 4(2): 75-85.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 2016; 353(6305): doi: 10.1126/science.aaf8729.
- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 2016; 533(7603): 420-4.
- Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, *et al.* Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science* 2016; 353(6305): doi: 10.1126/science.aaf8729.