

DOI: 10.13376/j.cblls/2022135

文章编号: 1004-0374(2022)10-1207-10

· 专刊: 基因编辑技术3.0 ·



刘光慧, 博士, 中国科学院动物研究所研究员, 衰老与再生研究组组长, 膜生物学国家重点实验室副主任, 中国科学院干细胞与再生医学科学数据中心主任, 北京干细胞与再生医学研究院副院长, 国家自然科学基金委创新研究群体项目负责人, 杰出青年基金项目获得者。2002年, 毕业于北京大学医学部, 获理学学士学位; 2007年, 于中国科学院生物物理研究所获得理学博士学位; 2007—2012年, 先后在美国斯克利普斯研究所(The Scripps Research Institute)和索尔克生物研究所(Salk Institute for Biological Studies)从事博士后(Research Associate)研究; 2012年, 加入中国科学院生物物理研究所, 任研究员(PI); 2019年至今, 任中国科学院动物研究所研究员(PI)。

## CRISPR筛选在生命医学研究中的应用

刘黎啸<sup>1,2</sup>, 荆耀彬<sup>2,3,4,5</sup>, 冀喆君<sup>4,6</sup>, 王思<sup>7\*</sup>, 曲静<sup>2,4,6\*</sup>, 张维绮<sup>1,2\*</sup>, 刘光慧<sup>2,3,4,5\*</sup>

(1 中国科学院北京基因组研究所(国家生物信息中心), 中国科学院精准基因组医学重点实验室, 北京 100101; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 中国科学院动物研究所膜生物学国家重点实验室, 北京 100101; 4 北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101; 5 中国科学院大学未来技术学院, 北京 100190; 6 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101; 7 首都医科大学宣武医院国家老年疾病临床医学研究中心, 人脑保护高精尖中心, 北京 100053)

**摘要:** CRISPR/Cas9 是一种高效、便捷的基因编辑工具, 在生命科学领域具有广泛的应用。基于 CRISPR/Cas9 系统构建基因组文库进行高通量筛选, 有助于解析不同生物学背景下编码基因的功能和调控元件的特征。覆盖全基因组或特定生物途径的 CRISPR 筛选支持在不同的遗传背景和时空环境下进行, 有助于鉴定关键的生物学靶点, 并阐述生理、病理条件下的基因功能及相互作用网络。本文总结了近年来 CRISPR 筛选在衰老、肿瘤等疾病研究中的重要进展, 概述了 CRISPR 筛选与单细胞测序、功能基因组学等方法相结合的研究策略, 并讨论了 CRISPR 筛选面临的挑战以及可能的解决方案。

**关键词:** CRISPR 筛选; 衰老; 肿瘤; 单细胞测序

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A

## Application of CRISPR screen in biomedical research

LIU Li-Xiao<sup>1,2</sup>, JING Yao-Bin<sup>2,3,4,5</sup>, JI Zhe-Jun<sup>4,6</sup>, WANG Si<sup>7\*</sup>, QU Jing<sup>2,4,6\*</sup>, ZHANG Wei-Qi<sup>1,2\*</sup>, LIU Guang-Hui<sup>2,3,4,5\*</sup>

(1 CAS Key Laboratory of Genomic and Precision Medicine, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and China National Center for Bioinformation, Beijing 100101, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 State Key Laboratory of Membrane Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 4 Beijing Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing 100101, China; 5 School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 6 State Key Laboratory of Stem

收稿日期: 2022-06-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2020YFA0804000, 2018YFC2000100, 2021ZD0202401); 中国科学院战略重点研究计划项目(XDA16000000); 国家自然科学基金项目(81921006, 82125011, 92149301, 92168201, 91949209, 92049116, 82122024, 82071588); 腾讯基金项目(2021-1045)

\*通信作者: E-mail: ghliu@ioz.ac.cn (刘光慧); zhangwq@big.ac.cn (张维绮); qujing@ioz.ac.cn (曲静); wangsi@xwh.ccmu.edu.cn (王思)

Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 7 Advanced Innovation Center for Human Brain Protection, National Clinical Research Center for Geriatric Disorders, Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China)

**Abstract:** CRISPR/Cas9 is an efficient and convenient gene-editing tool, which has been widely used in life science. The construction of a genome library based on CRISPR/Cas9 system for high-throughput screening can help to characterize the functions and regulatory elements of coding genes in different biological contexts. Genome-wide or specific biological pathways CRISPR screening supports experiments in different genetic and spatial-temporal settings. CRISPR screening can help identify key biological targets and explore the molecular, cellular, and systemic mechanisms underlying physiological and pathological conditions. Here, we review the important progress of CRISPR screening in the study of aging, tumor, and other diseases in recent years. We also outline the combined application of CRISPR screening with single-cell RNA sequencing, functional genomics, and other approaches. Finally, we discuss potential challenges for CRISPR screening and envision possible solutions.

**Key words:** CRISPR screening; aging; tumor; single-cell sequencing

2003年,人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)完成,生命科学研究进入了后基因组时代,揭示基因组的功能和调控机制,理解遗传信息和生物学过程之间的联系,成为研究人员的新目标<sup>[1]</sup>。基因编辑技术的出现和发展彻底改变了研究人员对基因组功能的研究方式。基因编辑技术自问世以来已经更迭了至少3代,从锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)技术到类转录激活因子效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术,再到成簇规律间隔短回文重复序列及其相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9, CRISPR/Cas9)技术,基因编辑技术变得更加简便、高效和精确<sup>[2]</sup>。CRISPR序列最早由日本科学家在大肠杆菌中发现<sup>[3]</sup>,后经研究人员证明,这是一种存在于原核生物的天然免疫系统,用于防御噬菌体、质粒和其他DNA序列入侵<sup>[4]</sup>。2012年,埃马纽埃尔·卡彭蒂耶(Emmanuelle Charpentier)和詹妮弗·杜德纳(Jennifer A. Doudna)教授将其改造成CRISPR/Cas9基因编辑系统,并因此获得2020年诺贝尔化学奖。

## 1 CRISPR筛选的基本原理

CRISPR/Cas9基因编辑技术通过小向导RNA(small guide RNA, sgRNA)靶向基因组的特定序列,核酸内切酶Cas9蛋白切割DNA产生双链断裂(double strand breaks, DSBs),经过细胞自身DNA损伤修复,产生碱基缺失、插入等突变<sup>[5]</sup>。近年来,CRISPR/Cas9基因编辑技术已被广泛应用于遗传密码破译、疾病机制探索、动植物育种等领域<sup>[6-7]</sup>。

随着CRISPR/Cas9技术的发展和成熟,研究

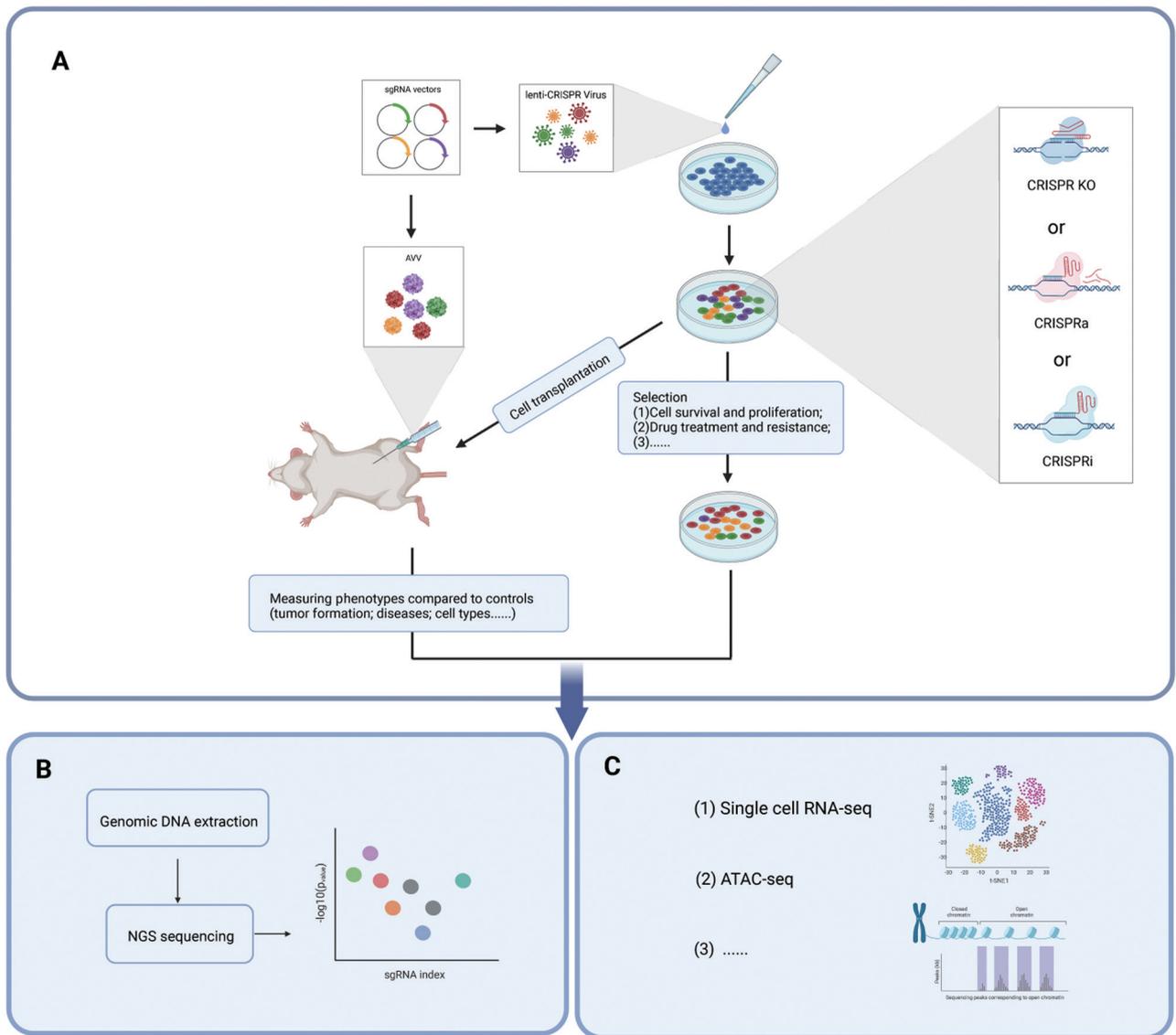
人员将核酸酶失活的Cas9蛋白(nuclease-dead Cas9, dCas9)融合转录因子,开发出CRISPR抑制(CRISPR inhibition, CRISPRi)<sup>[8]</sup>和CRISPR激活(CRISPR activation, CRISPRa)系统<sup>[9-10]</sup>。利用sgRNA的靶向性,将转录因子携带至转录起始位点(transcription start site, TSS)上游,在不改变基因组序列的前提下,干扰基因的转录表达。此外,研究人员将改造后的细菌-噬菌体防御相关操纵子Retron与CRISPR/Cas9结合,连接sgRNA的Retron逆转录产生大量靶序列副本,经过同源重组整合到基因组中<sup>[11]</sup>,在哺乳动物细胞中实现了精准的基因编辑,同时避免了Cas9切割导致的DNA双链断裂<sup>[12]</sup>。CRISPR/Cas9技术还为揭示基因调控元件(启动子、增强子等)<sup>[13]</sup>、非编码RNA(noncoding RNA)<sup>[14]</sup>、表观基因组<sup>[15]</sup>的功能和调控机制提供平台。此外,Cas家族其他成员也具有基因编辑的潜力,如Cas12a仅需crRNA(CRISPR RNA)即可实现特异性靶位点切割、Cas13特异性切割靶RNA等,它们相继被开发为更高效、更稳定的基因编辑系统<sup>[16-17]</sup>,在病原体核酸诊断、肿瘤基因检测和临床基因治疗等领域得到了广泛的应用<sup>[18-19]</sup>。

高通量筛选技术是鉴定特定表型相关基因的有效手段。RNA干扰(RNA interference, RNAi)是功能缺失型(loss of function)筛选常用的方法,利用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)或短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)靶向降解mRNA,降低蛋白质翻译水平。但在长期研究中发现,RNAi表现出脱靶率高、难以有效抑制高转录水平基因或非编码基因转录等局限性<sup>[20]</sup>。另一方面,传统的功能获得型(gain of function)筛选基于克隆cDNA过

表达文库, 通过将编码基因的开放阅读框序列 (open reading frame, ORF) 构建到质粒文库中, 导入细胞提高基因的表达量。但哺乳动物细胞的转录本存在多种可变剪接, 一个基因可能存在多个转录本, 这增加了 cDNA 文库构建的工作量和时间成本, 同时外源导入的 cDNA 表达不受细胞内源调控, 异常高表达具有潜在的细胞毒性<sup>[21]</sup>。

基于 CRISPR/Cas9 的高通量筛选通过设计靶向全基因组或特定基因通路的 sgRNA 质粒文库, 以病毒感染的方式导入细胞, 引起基因表达改变。

根据实验目的选择细胞群, 通过二代测序和生信分析鉴定富集基因。一般操作流程 (图 1) 主要包括: 设计、合成 sgRNA 文库; 病毒文库包装; 表型筛选 (增殖 / 存活 / 凋亡 / 荧光标记等); 高通量测序; 生物信息学分析; 候选基因验证。实验过程中通过控制病毒滴度 (multiplicity of infection, MOI) 和 sgRNA 标记筛选 (抗生物 / 流式等), 保证每个细胞至多导入一个 sgRNA。在此基础上, 研究人员整合 CRISPR 筛选技术和其他技术, 如 AVV 病毒包装和单细胞测序等, 开发出从体外到体内等多种可多维度、深



(A) CRISPR体外筛选前期基本流程: CRISPR-sgRNA质粒文库的构建、病毒感染、表型筛选、细胞富集; CRISPR体内筛选前期流程: 向小鼠组织中移植转染CRISPR-sgRNA的细胞或注射携带CRISPR-sgRNA文库的AVV病毒, 比较小鼠表型并富集组织细胞。(B)提取基因组DNA, 利用生物信息学分析sgRNA富集分布。(C)将筛选富集的组织细胞进行单细胞RNA测序、ATAC-seq等分析。

图1 基于CRISPR/Cas9的高通量基因筛选

层次探究基因功能的技术体系(图1)。

CRISPR/Cas9 筛选在肿瘤靶标鉴定、药物靶点筛选、基因表达调控元件分析等研究领域广泛应用,真正实现了大海捞针“精准化”。本文主要对近年来 CRISPR 筛选在生物研究领域的应用和进展进行综述,讨论 CRISPR 筛选与单细胞测序、功能基因组学等方法相结合的研究策略,并对 CRISPR 筛选面临的挑战以及可能的解决方案进行展望。

## 2 CRISPR在体外细胞模型筛选中的应用

### 2.1 CRISPR体外筛选在衰老研究中的应用

随着年龄的增加,细胞端粒缩短、DNA 损伤、氧化应激等多种因素引发细胞周期阻滞,导致细胞衰老。衰老的细胞表现出细胞体积变大、 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)表达增加、异染色质丢失、基因表达改变和衰老相关分泌表型(senescence associated secretory phenotype, SASP)等特征<sup>[22]</sup>。衰老的细胞在体内逐渐累积,并且分泌大量炎症细胞因子、趋化因子、生长因子和蛋白酶等,诱导器官和个体衰老<sup>[23]</sup>。研究人员已发现多种有效清除衰老细胞的手段延长了小鼠寿命,如:抗衰老药物(senolytics)、靶向清除衰老细胞、中和 SASP<sup>[23]</sup>。因此,延缓或逆转细胞衰老为干预衰老相关疾病提供了治疗策略,而了解衰老的遗传和表观遗传机制可为探索和开发干预机体衰老的治疗手段提供科学依据。早在 2005 年,研究人员在秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中进行 RNAi 筛选,发现 100 余个影响线虫寿命的基因,其中多数基因参与能量代谢,表明代谢调控在衰老过程中发挥重要作用<sup>[24-25]</sup>。2008 年,研究人员借助 shRNA 筛选发现,敲低 *CXCR2* 延缓人成纤维细胞衰老;机制研究发现, NF- $\kappa$ B 和 C/EBP $\beta$  调节 *CXCR2* 与趋化因子结合,诱导细胞衰老<sup>[26]</sup>。儿童早衰症(Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS)是一种常染色体罕见遗传病,由于 *LMNA* 基因第 1 824 位碱基点突变导致 RNA 错误剪接,产生早老蛋白 Progerin, Progerin 的积累导致细胞核膜结构和功能异常,加速细胞和组织器官衰老<sup>[27-28]</sup>。HGPS 患者身体衰老的速度是常人的 5~10 倍,平均寿命 13 岁,90% 以上患者由于冠状动脉和脑血管硬化死亡<sup>[29]</sup>。2016 年,研究人员以 GFP-Progerin 为指征,在 HGPS 患者来源的皮肤成纤维细胞中进行 siRNA 筛选,发现 NRF2 氧化应激通路受损是 HGPS 发生的关键原因,并发现 NRF2 激动剂奥替普拉可以延缓 HGPS 细胞衰老,为 HGPS 的临床治疗提供了新的靶标和

治疗策略<sup>[30]</sup>。

此外,研究人员利用 CRISPR 筛选技术在博来霉素和原癌基因 RAS<sup>V12</sup> 诱导的人成纤维细胞衰老模型中进行筛选,鉴定出 1 378 个衰老相关基因,发现 SASP 相关基因的表达在 *CHEK2*、*HAS1* 或 *MDK* 基因敲除时增加,而在 *MTOR*、*CRISPLD2* 或 *MORF4L1* 基因敲除时降低<sup>[31]</sup>。转录因子 AP-1 在原癌基因诱导的细胞衰老(oncogene-induced senescence, OIS)模型中发挥重要的转录调节作用,因此研究人员构建了一个 CRISPR-Cas9 sgRNA 文库,旨在靶向由 AP-1 调节的衰老诱导的增强子,并将其用于功能筛选;由此鉴定出 OIS 过程中受 AP-1 调节的增强子元件  $\text{Enh}^{\text{AP1-OIS1}}$ ,并揭示了下游靶基因 *FOXF1* 参与 OIS 进程<sup>[32]</sup>。以上研究基于成纤维细胞和原癌基因诱导细胞衰老模型,鉴定出一系列衰老调控基因,在一定程度上丰富了对人类衰老基因的认识。

衰老过程中伴随着干细胞的衰竭和组织再生能力的下降<sup>[33]</sup>,建立干细胞衰老模型为探究机体衰老的分子机制、开发干预衰老新策略提供了实验平台。成人早衰症(Werner syndrome, WS)是由 *WRN* 基因突变引起的常染色体隐性遗传病。患者 18 岁之后出现系统衰老,出现硬皮病样皮肤改变、内分泌失调及代谢疾病,并伴发各种肿瘤,平均寿命 47 岁<sup>[34]</sup>。研究早衰症的发病机制对揭示自然衰老规律及防治衰老相关疾病具有重要意义。研究人员先后建立了 HGPS 和 WS 间充质前体细胞(human mesenchymal precursor cells, hMPCs)模型,二者分别表现出晚发-急性早衰特征和早发-轻度早衰表型<sup>[35]</sup>。2021 年,我国研究人员在 WS 和 HGPS hMPCs 中进行全基因组 CRISPR 敲除筛选,鉴定出百余个新的衰老促进基因,并对排名前 50 名的基因进行了功能验证,证实敲除这些基因均可以延缓人间充质干细胞衰老。其中,组蛋白乙酰转移酶编码基因 *KAT7* 是排名最高的候选基因。在 hMPCs 中过表达 *KAT7* 后会加速细胞衰老,该过程主要是由于 *KAT7* 催化 H3K14 乙酰化促进 p15<sup>INK4b</sup> 的转录表达导致的。为了进一步证明 *KAT7* 在个体衰老中的关键性作用,研究人员向衰老小鼠的尾静脉注射编码 Cas9/sg-Kat7 的慢病毒,发现小鼠的肝脏衰老状态有所延缓。此外,敲除 *KAT7* 可延长小鼠 25% 的中位寿命,81% 的 *KAT7* 敲除小鼠年龄超过 130 周,而对照组小鼠则只有 27% 可以活到 130 周<sup>[36]</sup>。该研究通过 CRISPR 筛选产生了丰富的人类衰老促进基因名录,从概念上首次证明了基于单因子失活的基因治疗策

略有助于延缓衰老、延长健康寿命, 为干预衰老及衰老相关疾病提供了新的靶标和思路。

## 2.2 CRISPR体外筛选在肿瘤研究中的应用

肿瘤是一种异常和过度生长的组织, 主要分为良性肿瘤、原位肿瘤和恶性肿瘤。恶性肿瘤细胞大多具有: 无限的复制潜力、逃避生长抑制因子、抵抗细胞死亡、诱导血管生成、转移侵袭、能量代谢重编程和免疫逃逸等特征<sup>[37]</sup>。通过构建高通量文库筛选平台、筛选调控肿瘤发生发展和转移的关键基因、开发肿瘤靶向药物, 可为肿瘤的治疗提供新的治疗策略<sup>[38-39]</sup>。

利用全基因组 CRISPR 敲除筛选, 研究人员发现心磷脂合成酶 PTPMT1 维持肝癌细胞在缺氧条件下生存。在缺氧条件下, PTPMT1 抑制剂阿来西定 (Alexidine dihydrochloride) 可以有效抑制肝癌细胞生长<sup>[40]</sup>; 研究人员在 30 种癌症类型、324 种人类肿瘤细胞中筛选出 92 个泛癌靶点和 617 个癌症类型特异性靶点, 鉴定出 *WRN* 是肿瘤细胞的分子标记物<sup>[41]</sup>; 通过筛选肿瘤细胞对药物的敏感性和耐受性, 发现敲除 *ELP5* 降低吉西他滨诱导的转移性胆囊癌细胞 (gallbladder cancer, GBC) 的凋亡, 表明 *ELP5* 可作为评估 GBC 患者对吉西他滨治疗敏感性的临床指标<sup>[42]</sup>。

## 2.3 CRISPR体外筛选在其他疾病研究中的应用

CRISPR 筛选在探索其他疾病的发病机制和开发治疗靶点中也发挥重要作用。转录因子 *DUX4* 的错误表达产生毒性 *DUX4* 是面部肩胛肱骨肌营养不良症 (facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD) 的发病原因之一。研究人员利用 CRISPR 敲除筛选, 在肌肉细胞中鉴定了调控毒性 *DUX4* 的关键基因: 他们发现, 参与细胞缺氧反应途径的 HIF1 复合体亚基 (*HIF1A* 和 *HIF1B/ARNT*) 在维持肌肉细胞存活过程中发挥关键作用, 毒性 *DUX4* 通过激活 *HIF1A* 表达和细胞缺氧信号通路从而诱导细胞死亡<sup>[43]</sup>。*C9ORF72* 的六核苷酸重复扩增被翻译成二肽重复 (dipeptide repeat, DPR) 蛋白可导致神经毒性, 是肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的病因之一。研究人员在人永生骨髓性白血病细胞系 K562 中筛选调节 *C9ORF72* DPR 蛋白毒性的修饰因子, 发现敲低 *TMX2* 抑制 *C9ORF72* DPR 引起的神经毒性, 并改善 ALS 患者的运动神经元生存能力<sup>[44]</sup>。

在细菌、病毒等传染病研究领域, 研究人员在人单核/巨噬细胞样细胞 U937 中进行筛选, 揭示

了 *CLORF43*、*KIAA1109*、*RAB10* 及其伴侣 *RABIF* 等在嗜肺军团菌发病过程中发挥的关键性作用<sup>[45]</sup>; 针对甲型流感病毒、埃博拉病毒等多种病毒感染细胞的能力, 鉴定出了 *WDR7*、*CCDC115*、*TMEM199*、*CMTR1*、*GNPTAB* 等多个关键基因可以调节细胞被病毒感染的能力, 为防止病毒传播、感染提供了科学依据<sup>[46-47]</sup>。近两年新型冠状病毒肺炎病毒 SARS-CoV-2 在世界范围内广泛传播, 已成为近百年来最大的公共卫生威胁。研究人员在长尾猴 (*Chlorocebus sabaues*) 细胞系 Vero-E6 和人胚肾 HEK293T 细胞系中筛选发现了 HMGB1、SWI/SNF 染色质重构复合体、LDLRAD3 和 CLEC4G 等多个蛋白参与 SARS-CoV-2 感染细胞的过程, 为 COVID-19 的治疗提供了关键线索<sup>[48]</sup>。

## 2.4 CRISPR体外筛选在非编码RNA研究中的应用

非编码 RNA 占人类基因组的 98%, 根据其长度可分为多种类型, 包括长链非编码 RNA (lncRNA)、microRNA (miRNA)、环状 RNA (circRNA)、小核 RNA (snRNA)、小核仁 RNA (snoRNA)、piRNA (PIWI-interacting RNA)、siRNA (small interfering RNA) 等, 多水平、多途径地调控基因的表达, 在细胞乃至个体层面发挥着重要作用。研究人员针对 16 401 个 lncRNA 位点构建 CRISPRi 文库, 并在包括髓系白血病细胞系、宫颈癌细胞系和胶质母细胞瘤细胞系在内的 7 种人类细胞系、6 种转化细胞系和诱导多能干细胞系中筛选生长必需的 lncRNA, 鉴定出 499 个不同类型细胞生长必需的 lncRNA, 揭示了 lncRNA 在不同细胞类型中存在功能特异性<sup>[49]</sup>。角质形成细胞是表皮的主要组成部分, 表皮干细胞位于基底膜的最内层, 可分化迁移形成基底上层, 维持表皮结构和屏障功能稳定。研究人员对 2 263 个表皮特异表达的 lncRNA 进行敲低筛选, 鉴定了 9 个调节表皮干细胞增殖的 lncRNA, 其中敲低 *PRANCR* 抑制表皮干细胞增殖, 并增加了 G<sub>2</sub>/M 期细胞的比例, 为表皮稳态破坏导致的皮肤病治疗提供了新的靶点<sup>[50]</sup>。

为提高筛选效率, 研究人员构建了靶向非编码基因剪接位点的 CRISPR 文库, 通过敲除外显子或滞留内含子干扰 lncRNA 表达。基于此, 研究人员在慢性髓性白血病细胞、HeLa 细胞以及人 B 淋巴细胞中分别筛选并鉴定出参与细胞存活、增殖的 lncRNA<sup>[51]</sup>。为实现 lncRNA 的彻底敲除, 研究人员开发出 pgRNA (paired-guide RNA), 通过大片段删除基因组序列来破坏 lncRNA 表达及功能, 实现

lncRNA 功能性筛选，并在多个肿瘤细胞系中鉴定出 51 个正向及负向调控肿瘤细胞增殖的 lncRNA<sup>[52]</sup>。

circRNA 作为广泛存在于多种真核生物体内的非编码 RNA，已被证实多种疾病中具有调控作用<sup>[53]</sup>。研究人员开发了 circRNA 抑制系统——CRISPR-RfxCas13d/BSJ-gRNA，并通过筛选发现多个调控细胞增殖、小鼠胚胎植入前发育的 circRNA，证明 *circFAM120A* 抑制 IGF2BP2 与 *FAM120A* 的 mRNA 结合，维持 FAM120A 蛋白表达，促进细胞增殖<sup>[54]</sup>。

### 3 CRISPR在体内动物模型筛选中的应用

细胞发挥生物学功能受到周围细胞、细胞因子、细胞外基质和免疫微环境等影响，将 CRISPR 筛选转移到生物体内进行，可还原细胞生长微环境，系统、全面地揭示基因表达对细胞稳态的影响。研究人员将感染 sgRNA 文库的肿瘤细胞移植到小鼠体内，对形成的肿瘤组织进行分析，鉴定调控肿瘤生成的关键基因。通过构建包含肿瘤发生、发展及免疫调节相关基因的 CRISPR 敲除文库，将其转染至三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 细胞模型 (小鼠 4T1 细胞) 中，并注射于小鼠乳腺脂肪垫中，发现敲除 E3 泛素连接酶 *Cop1* 延长了患肿瘤小鼠的寿命，*Cop1* 通过调节趋化因子分泌和巨噬细胞浸润增强抗肿瘤免疫，提示 *Cop1* 可以作为临床治疗 TNBC 的潜在靶点<sup>[55]</sup>。上皮性卵巢癌是一种致命的妇科癌症，对现有的抗癌药物具有耐药性，给临床治疗带来困难。研究人员通过体内功能缺失筛选 (CRISPR 敲除筛选和 RNAi 筛选) 寻找有效的药物靶点，将转染 sgRNA 文库的上皮性卵巢癌细胞通过腹腔注射到裸鼠体内形成肿瘤，发现了 *KPNB1* 在内的 10 个上皮性卵巢癌的潜在药物靶点，进一步结合药物测试发现伊维菌素和紫杉醇可作为一种更有效的药物组合方式治疗上皮卵巢癌<sup>[56]</sup>。

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体可以携带小于 4.8 kb 的外源基因片段，在不同细胞中干扰基因表达，具有安全、高效等优点<sup>[57]</sup>。研究人员利用 AAV 病毒包装 sgRNA 文库，原位注射到小鼠脑中，诱导胶质母细胞瘤产生，利用靶向捕获测序鉴定出多个胶质母细胞瘤突变基因，并发现 *Mll3-Nf1*、*Zc3h13-Rb1* 等多个共突变组合与诱导胶质母细胞瘤的产生相关<sup>[58]</sup>；在针对小鼠肝癌的研究中，研究人员利用 AAV 介导的 CRISPR 筛选鉴定出 *Trp53*、*Setd2*、*Cic* 等基因的突变诱导肝脏肿瘤的发生，进一步绘制了抑制肿瘤发生的基因图谱<sup>[59]</sup>。

由于 AAV 病毒感染细胞的过程中不整合基因组，靶向捕获 sgRNA 信息的数量和准确度受限，体内筛选难以扩大。因此，研究人员基于 AAV 载体构建了“睡美人” (Sleeping Beauty, SB) 转座子系统，通过睡美人转座酶将 AAV 携带的外源基因整合至小鼠基因组中，并随细胞分裂而复制。研究人员在恶性胶质瘤 (glioblastoma, GBM) 小鼠模型中尾静脉注射感染文库 AAV 病毒的 T 细胞，发现了 *Pdia3*、*Mgat5*、*Emp1*、*Lag3*、*Pde5a*、*Ccdc80* 等基因的富集，并进一步发现敲除 *Pdia3*、*Mgat5*、*Emp1* 等基因的 CD8<sup>+</sup> T 细胞表现出抗肿瘤活性增加、T 细胞激活信号通路更加灵敏的特征，GBM 小鼠存活时间更长，为 GBM 疾病治疗提供了新的治疗靶点<sup>[60]</sup>。

CD8<sup>+</sup> T 细胞在消除细胞内感染和恶性细胞中起关键作用，而且其分化状态与其在生理和病理条件下的杀伤作用、增殖和生存密切相关<sup>[61-62]</sup>。CD8<sup>+</sup> T 细胞的免疫功能依赖于由其分化产生的效应 T 细胞 (effector T cell, T<sub>EFF</sub>) 和记忆 T 细胞 (memory T cell, T<sub>MEM</sub>) 的功能。在淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒导致的急性感染小鼠模型中，研究人员通过 CRISPR/Cas9 体内筛选系统分析了决定 T<sub>EFF</sub> 和 T<sub>MEM</sub> 命运的代谢基因，并关注负向调节 T<sub>MEM</sub> 应答的基因。研究发现，氨基酸转运体 *Slc7a1* 和 *Slc38a2* 通过部分调节 mTORC1 信号转导，抑制了 T<sub>MEM</sub> 分化的幅度；*Pou1f1* (蛋白-O-岩藻糖基转移酶-1) 和 GDP-岩藻糖作为 Notch-Rbpj 信号通路的下游，通过破坏这一营养信号通路阻断终末效应 T 细胞的分化，但促进环境依赖的 T<sub>EFF</sub> 增殖和 T<sub>MEM</sub> 发育进程<sup>[63]</sup>。在心肌细胞的功能研究中，研究人员开发了基于 CRISPR/Cas9-AAV9 的体细胞突变平台 (CRISPR/Cas9-AAV9-based somatic mutagenesis, CAAAV)，构建了心肌细胞特异的基因缺失小鼠模型<sup>[64]</sup>。利用该技术平台，研究人员筛选发现 *Rnf20* 和 *Rnf40* 是调控心肌细胞成熟的关键基因，二者形成的复合物参与组蛋白 H2B 第 120 位赖氨酸 (H2BK120) 的单泛素化修饰，是心肌细胞成熟的必要因素<sup>[65]</sup>。

### 4 CRISPR筛选与其他技术的联合应用

随着科技的不断发展，生命科学领域涌现出众多新型技术，为解开更多的生物学奥秘带来希望。近年来，CRISPR 筛选与 DNA 条形码、单细胞测序等技术联合应用，为揭开更复杂、精细的细胞命运调控机制提供了平台。

生物学过程受到基因间相互作用的调控，对单

个基因的干预难以同时评估两个或多个基因组合的功能。2016年, 研究人员开发了大规模组合遗传学 (combinatorial genetics *en masse*, CombiGEM) 技术, 将 CRISPR-Cas9 系统和条形码组合基因库相结合, 在人类细胞模型中以快速、高通量的方式鉴定复杂基因组合的功能。研究人员构建了包含条形码的双 sgRNA 组合文库, 在人卵巢癌细胞中筛选抑制细胞生长的基因对, 发现靶向 *KDM4C/BRD4* 和 *KDM6B/BRD4* 等多个基因对在抑制卵巢癌细胞生长中发挥协同作用<sup>[66]</sup>。进一步, 研究人员设计了包含多个启动子和 sgRNA 的组合载体, 开发了 CombiGEM-CRISPR v2.0, 可同时识别三个基因协同的治疗靶点组合<sup>[67]</sup>。研究人员在肝癌细胞中同时敲除多个药物靶基因, 评估不同的肝癌治疗药物组合的治疗效果, 发现血管舒张药物 Ifenprodil 和肝癌药物 Sorafenib 可联合应用于肝细胞癌的治疗<sup>[68]</sup>。

高通量 RNA 测序改变了生物学领域研究, 然而 RNA 测序通常是批量进行的, 代表所有细胞的基因表达模式的平均值, 掩盖了细胞之间的差异性。单细胞 RNA 测序 (single cell RNA-sequencing, scRNA-seq) 通过分离单细胞、使用条形码标记每个细胞的转录本, 从单细胞水平评估细胞群和生物系统的特性。基于单细胞的 CRISPR 筛选技术可在单细胞水平深度追踪基因扰动的影响, 目前主要有 CRISPR-seq、Perturb-seq、CROP-seq 和 Mosaic-seq 技术。CRISPR-seq 技术通过 UGI (unique guide index) 标记 sgRNA, 从 scRNA-seq 数据中识别出 sgRNA 信息, 从而在单细胞层面分析单基因干扰引起的转录组变化<sup>[69]</sup>。Perturb-seq 技术利用条形码 (guide barcode, GBC) 识别单细胞中的 sgRNA, 通过生信分析将单个细胞和 GBC 相匹配。研究人员已利用该技术绘制调节骨髓细胞分化及其对病原体反应的分子网络<sup>[70]</sup>, 并系统分析了诱导未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 的信号通路<sup>[71]</sup>。CROP-seq 技术基于液滴捕获技术, 在 sgRNA 整合基因组的同时, 复制一个可转录出携带多聚腺苷酸 (poly (A)) 尾的拷贝, 并由单细胞转录组测序捕获<sup>[72]</sup>。Direct-capture Perturb-seq 技术: 在 RNA 测序时的逆转录过程中, 将 mRNA 序列的条形码扩展到非聚腺苷酸化 sgRNA 的 3' 或 5' 端, 可从单个细胞中检测到多个不同的 sgRNA 序列, 提高了单细胞 CRISPR 筛选的准确性和灵活性<sup>[73]</sup>。Mosaic-seq 技术: 将 CRISPRi 和高通量 scRNA-seq 结合, 通过载体中携带的条形码指示增强子和细胞基因表达之间的关系, 在单细胞水平

探究基因调控元件的功能<sup>[74]</sup>。

单细胞 CRISPR 筛选能够全面、高通量地解析基因扰动引起的分子与表型变化的联系, 然而在该过程中组织被解离、均质化, 无法评估基因扰动引起的细胞外效应, 如临近细胞补偿、分泌因子对细胞命运和基因表达的影响。近期, 研究人员将蛋白质条形码 (Pro-Code)、CRISPR 筛选和单细胞测序相结合, 开发出 Perturb-map 技术, 利用 Pro-Code 系统标记表达不同 sgRNA 的细胞, 实现了体内空间功能基因组学研究。在小鼠肺癌模型中, 平行敲除 35 个免疫细胞互作因子相关基因, 同时评估每个基因敲除后如何影响肿瘤生长、组织病理和免疫组成。结合空间转录组学数据发现, 在 *Tgfb2* 基因敲除的肿瘤中, 肿瘤微环境 (TME) 被转化为纤维黏液状态, T 细胞被排除在外, TGF $\beta$  表达增加, 同时 TGF $\beta$  介导的成纤维细胞激活通路上调, 表明癌细胞上 TGF $\beta$  受体的丧失增加了 TGF $\beta$  的生物利用率及其对 TME 的免疫抑制作用<sup>[75]</sup>。Perturb-Map 技术可在细胞分辨率下保留空间结构, 规模化分析细胞表型与细胞通讯、细胞微环境等外界因素的紧密联系。

表观遗传学主要研究非 DNA 序列变化产生的可遗传的基因表达变化, 包括 DNA/RNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控、染色质三维结构改变等。dCas9 融合表观遗传效应因子 (epigenetic effectors, EEs), 在特定基因位点进行表观遗传修饰<sup>[15]</sup>。未来, 结合表观研究技术与 CRISPR 筛选, 从表观遗传角度解析基因表达调控将成为可能。研究人员开发出 Perturb-ATAC (perturbation-indexed single-cell ATAC-seq) 技术, 将单细胞染色质开放性测序 (single-cell assay for transposase-accessible chromatin using sequencing, scATAC-seq) 与 CRISPR 筛选结合, 以单细胞分辨率绘制基因 - 染色质易近性图谱, 并在人 B 淋巴细胞中鉴定出转录因子 (*EBF1*、*IRF8*、*NFKB1*、*RELA* 和 *SPI1*)、染色质修饰因子 (*BRG1*、*DNMT3A*、*EZH2* 和 *TET2*) 和非编码 RNA (*7SK*、*EBER1* 和 *EBER2*) 通过改变染色质开放程度影响 B 细胞的发育和功能<sup>[76]</sup>。未来, 借助 dCas9-EEs 筛选调控基因表达的特定修饰位点, 对于深度理解基因调控机制具有重要意义。

## 5 总结与展望

CRISPR 筛选凭借其高通量、精准、高效、高适用性等特点已被广泛应用于衰老、肿瘤等诸多生

物学领域, 为功能基因组学和结构基因组学研究提供了新策略。虽然 CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有许多优势, 但仍然存在脱靶效应、刺激免疫反应等缺陷。因此, 针对 CRISPR 筛选产生的候选基因必须以严谨的态度进行评估, 综合考虑多种实验方法的验证和数据支持, 避免技术缺陷导致的假阳性。

随着对疾病发病机制的理解进一步加深, 靶向基因治疗正在被应用于多种疾病, CRISPR 筛选在发现关键致病基因、鉴定高效靶向药物方面将发挥重要作用。另外, 全球人口老龄化现象日益严重, 衰老相关疾病患病率日益增加。利用 CRISPR 筛选技术进一步鉴定衰老调控基因对深层次理解衰老、绘制衰老基因调控网络、预防衰老相关疾病(如新冠肺炎病毒感染)、提升老年人生活质量具有重要的科学和社会意义。目前, CRISPR 筛选已经为研究各种生物学过程提供了极大帮助; 未来, CRISPR 筛选与 AVV 病毒、单细胞测序、表观基因组测序等技术相结合, 将在生物学机制探索、个体化疾病治疗等方面展现出更广阔的发展和空间。

#### [参 考 文 献]

- [1] Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 2011, 470: 187-97
- [2] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397-405
- [3] 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 Bacteriol*, 1987, 169: 5429-33
- [4] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273-97
- [5] Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol*, 1994, 14: 8096-106
- [6] Zhang C, Quan RF, Wang JF. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Hum Mol Genet*, 2018, 27: R79-88
- [7] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci*, 2019, 232: 116636
- [8] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [9] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10: 977-9
- [10] Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa screens in mammalian cells for precision biology and medicine. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 406-16
- [11] Millman A, Bernheim A, Stokar-Avihail A, et al. Bacterial retrons function in anti-phage defense. *Cell*, 2020, 183: 1551-61.e12
- [12] Kong XF, Wang ZK, Zhang RX, et al. Precise genome editing without exogenous donor DNA via retron editing system in human cells. *Protein Cell*, 2021, 12: 899-902
- [13] Klann TS, Black JB, Chellappan M, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 561-8
- [14] Miano JM, Long XC, Lyu Q. CRISPR links to long noncoding RNA function in mice: A practical approach. *Vascul Pharmacol*, 2019, 114: 1-12
- [15] Li K, Liu Y, Cao H, et al. Interrogation of enhancer function by enhancer-targeting CRISPR epigenetic editing. *Nat Commun*, 2020, 11: 485
- [16] Wei Y, Zhou YS, Liu YJ, et al. Indiscriminate ssDNA cleavage activity of CRISPR-Cas12a induces no detectable off-target effects in mouse embryos. *Protein Cell*, 2021, 12: 741-5
- [17] Teng F, Cui T, Feng G, et al. Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering. *Cell Discov*, 2018, 4: 63
- [18] Pickar-Oliver A, Gersbach CA. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20: 490-507
- [19] Selvam K, Najib MA, Khalid MF, et al. RT-LAMP CRISPR-Cas12/13-based SARS-CoV-2 detection methods. *Diagnostics*, 2021, 11: 1646
- [20] Qi XL, Zhang JW, Zhao YZ, et al. The applications of CRISPR screen in functional genomics. *Brief Funct Genomics*, 2017, 16: 34-7
- [21] Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc*, 2017, 12: 828-63
- [22] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, et al. The essence of senescence. *Genes Dev*, 2010, 24: 2463-79
- [23] Birch J, Gil J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev*, 2020, 34: 1565-76
- [24] Hansen M, Hsu AL, Dillin A, et al. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genet*, 2005, 1: 119-28
- [25] Ni ZY, Lee SS. RNAi screens to identify components of gene networks that modulate aging in *Caenorhabditis elegans*. *Brief Funct Genomics*, 2010, 9: 53-64
- [26] Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 2008, 133: 1006-18
- [27] Gordon LB, Rothman FG, Lopez-Otin C, et al. Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell*, 2014, 156: 400-7
- [28] De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*, 2003,

- 300: 2055
- [29] Ahmed MS, Ikram S, Bibi N, et al. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: a premature aging disease. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 4417-27
- [30] Kubben N, Zhang WQ, Wang LX, et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. *Cell*, 2016, 165: 1361-74
- [31] Liu XH, Wei L, Dong QY, et al. A large-scale CRISPR screen and identification of essential genes in cellular senescence bypass. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 4011-31
- [32] Han R, Li L, Ugalde AP, et al. Functional CRISPR screen identifies AP1-associated enhancer regulating FOXF1 to modulate oncogene-induced senescence. *Genome Biol*, 2018, 19: 118
- [33] Brunauer R, Kennedy BK. Progeria accelerates adult stem cell aging. *Science*, 2015, 348: 1093-4
- [34] Savva C, Sadiq M, Sheikh O, et al. Werner syndrome protein expression in breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 2021, 21: 57-73.e7
- [35] Wu ZM, Zhang WQ, Song MS, et al. Differential stem cell aging kinetics in Hutchinson-Gilford progeria syndrome and Werner syndrome. *Protein Cell*, 2018, 9: 333-50
- [36] Wang W, Zheng Y, Sun S, et al. A genome-wide CRISPR-based screen identifies KAT7 as a driver of cellular senescence. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabd2655
- [37] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-74
- [38] Liu D, Zhao X, Tang A, et al. CRISPR screen in mechanism and target discovery for cancer immunotherapy. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1874: 188378
- [39] He CL, Han SQ, Chang Y, et al. CRISPR screen in cancer: status quo and future perspectives. *Am J Cancer Res*, 2021, 11: 1031-50
- [40] Bao MH, Yang C, Tse AP, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 knockout library screening identified PTPMT1 in cardiolipin synthesis is crucial to survival in hypoxia in liver cancer. *Cell Rep*, 2021, 34: 108676
- [41] Behan FM, Iorio F, Picco G, et al. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*, 2019, 568: 511-6
- [42] Xu S, Zhan M, Jiang C, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies ELP5 as a determinant of gemcitabine sensitivity in gallbladder cancer. *Nat Commun*, 2019, 10: 5492
- [43] Lek A, Zhang Y, Woodman KG, et al. Applying genome-wide CRISPR-Cas9 screens for therapeutic discovery in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaay0271
- [44] Kramer NJ, Haney MS, Morgens DW, et al. CRISPR-Cas9 screens in human cells and primary neurons identify modifiers of C9ORF72 dipeptide-repeat-protein toxicity. *Nat Genet*, 2018, 50: 603-12
- [45] Jeng EE, Bhadkamkar V, Ibe NU, et al. Systematic identification of host cell regulators of *Legionella pneumophila* pathogenesis using a genome-wide CRISPR screen. *Cell Host Microbe*, 2019, 26: 551-63.e6
- [46] Flint M, Chatterjee P, Lin DL, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase as a potential antiviral target for Ebola virus. *Nat Commun*, 2019, 10: 285
- [47] Wei J, Alfajaro MM, DeWeirdt PC, et al. Genome-wide CRISPR screens reveal host factors critical for SARS-CoV-2 infection. *Cell*, 2021, 184: 76-91.e13
- [48] Zhu SY, Liu Y, Zhou Z, et al. Genome-wide CRISPR activation screen identifies candidate receptors for SARS-CoV-2 entry. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 701-17
- [49] Liu SJ, Horlbeck MA, Cho SW, et al. CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*, 2017, 355: eaah7111
- [50] Cai PF, Otten ABC, Cheng BB, et al. A genome-wide long noncoding RNA CRISPRi screen identifies PRANCR as a novel regulator of epidermal homeostasis. *Genome Res*, 2020, 30: 22-34
- [51] Liu Y, Cao ZZ, Wang YN, et al. Genome-wide screening for functional long noncoding RNAs in human cells by Cas9 targeting of splice sites. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 1203-10
- [52] Zhu SY, Li W, Liu JZ, et al. Genome-scale deletion screening of human long non-coding RNAs using a paired-guide RNA CRISPR-Cas9 library. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1279-86
- [53] Han B, Chao J, Yao HH. Circular RNA and its mechanisms in disease: from the bench to the clinic. *Pharmacol Ther*, 2018, 187: 31-44
- [54] Li S, Li X, Xue W, et al. Screening for functional circular RNAs using the CRISPR-Cas13 system. *Nat Methods*, 2021, 18: 51-9
- [55] Wang X, Tokheim C, Gu SS, et al. *In vivo* CRISPR screens identify the E3 ligase Cop1 as a modulator of macrophage infiltration and cancer immunotherapy target. *Cell*, 2021, 184: 5357-74.e22
- [56] Kodama M, Kodama T, Newberg JY, et al. *In vivo* loss-of-function screens identify KPNB1 as a new druggable oncogene in epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E7301-10
- [57] Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*, 2014, 1: 427-51
- [58] Chow RD, Guzman CD, Wang G, et al. AAV-mediated direct *in vivo* CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci*, 2017, 20: 1329-41
- [59] Wang G, Chow RD, Ye L, et al. Mapping a functional cancer genome atlas of tumor suppressors in mouse liver using AAV-CRISPR-mediated direct *in vivo* screening. *Sci Adv*, 2018, 4: eaao5508
- [60] Ye L, Park JJ, Dong MB, et al. *In vivo* CRISPR screening in CD8 T cells with AAV-Sleeping Beauty hybrid vectors identifies membrane targets for improving immunotherapy for glioblastoma. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1302-13
- [61] Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW. CD8<sup>+</sup> T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21: 718-38

- [62] Kallies A, Zehn D, Utzschneider DT. Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 128-36
- [63] Huang HL, Zhou PP, Wei J, et al. *In vivo* CRISPR screening reveals nutrient signaling processes underpinning CD8<sup>+</sup> T cell fate decisions. *Cell*, 2021, 184: 1245-61.e21
- [64] Guo Y, VanDusen NJ, Zhang L, et al. Analysis of cardiac myocyte maturation using CASA AV, a platform for rapid dissection of cardiac myocyte gene function *in vivo*. *Circ Res*, 2017, 120: 1874-88
- [65] VanDusen NJ, Lee JY, Gu W, et al. Massively parallel *in vivo* CRISPR screening identifies RNF20/40 as epigenetic regulators of cardiomyocyte maturation. *Nat Commun*, 2021, 12: 4442
- [66] Wong ASL, Choi GCG, Cui CH, et al. Multiplexed barcoded CRISPR-Cas9 screening enabled by CombiGEM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 2544-9
- [67] Zhou P, Chan BKC, Wan YK, et al. A three-way combinatorial CRISPR screen for analyzing interactions among druggable targets. *Cell Rep*, 2020, 32: 108020
- [68] Xu F, Tong M, Tong CSW, et al. A combinatorial CRISPR-Cas9 screen identifies ifenprodil as an adjunct to sorafenib for liver cancer treatment. *Cancer Res*, 2021, 81: 6219-32
- [69] Jaitin DA, Weiner A, Yofe I, et al. Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-seq. *Cell*, 2016, 167: 1883-96.e15
- [70] Dixit A, Parnas O, Li B, et al. Perturb-seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell*, 2016, 167: 1853-66.e17
- [71] Adamson B, Norman TM, Jost M, et al. A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response. *Cell*, 2016, 167: 1867-82.e21
- [72] Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C, et al. Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods*, 2017, 14: 297-301
- [73] Replogle JM, Norman TM, Xu A, et al. Combinatorial single-cell CRISPR screens by direct guide RNA capture and targeted sequencing. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 954-61
- [74] Xie S, Duan J, Li B, et al. Multiplexed engineering and analysis of combinatorial enhancer activity in single cells. *Mol Cell*, 2017, 66: 285-99.e5
- [75] Dhainaut M, Rose SA, Akturk G, et al. Spatial CRISPR genomics identifies regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 2022, 185: 1223-39.e20
- [76] Rubin AJ, Parker KR, Satpathy AT, et al. Coupled single-cell CRISPR screening and epigenomic profiling reveals causal gene regulatory networks. *Cell*, 2019, 176: 361-76.e17