

Hintergrund: CRISPR/Cas (Risiken)

Neue Genom-Editierungsverfahren entwickeln sich derzeit rasant weiter. Damit wächst auch die Notwendigkeit eines verantwortungsvollen Umgangs mit den einhergehenden Risiken. Das derzeit wohl am häufigsten eingesetzte und vielversprechendste Verfahren ist das CRISPR/Cas-System (technische Details dazu werden im Hintergrundpapier: CRISPR/Cas (Technik) erläutert). Das vorliegende Hintergrundpapier gibt einen Überblick über Risiken, die beim Einsatz von CRISPR/Cas auftreten können, und fasst den aktuell vorliegenden Wissensstand kurz zusammen.

Wenn CRISPR/Cas in Zellen und den Zellkern eingebracht wird, können zum einen auf zellulärer Ebene ungewollte Veränderungen am Erbgut, an der RNA oder an Proteinen stattfinden. Zum anderen werden die möglichen Risiken und Folgen unbeabsichtigter und beabsichtigter Veränderungen auf systemischer Ebene erläutert. Diese betreffen den veränderten Organismus in seiner Gesamtheit und seine Wechselwirkungen mit der Umwelt.

Risiken auf zellulärer Ebene

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Off-Target-Effekten und unerwünschten On-Target-Effekten. Off-Target-Effekte beschreiben Veränderungen an ungewollten Bereichen der DNA, die durch eine unspezifische bzw. ungenaue Bindung der guide RNA entstehen können. Unerwünschte On-Target-Effekte beschreiben das unbeabsichtigte Einfügen von DNA-Fragmenten in die Zielsequenz des Zielorganismus. Hierbei können zum Beispiel Teile der DNA, die für die Cas-Nuklease kodiert, eingebaut werden.

Off-Target-Veränderungen der DNA-Sequenz

Ein Nebeneffekt, der beim Anwenden des CRISPR/Cas-Systems auftreten kann, sind ungewollte Veränderungen der DNA an Nicht-Zielsequenzen (Off-Target-Effekte). Die Nuklease Cas9 wird durch eine guide RNA an die Zielsequenz im Erbgut geleitet. Die guide RNA ist komplementär zur Zielsequenz auf der DNA, sie ist also in der Lage, an die „Buchstaben“ (Basen) dieses DNA-Abschnittes zu binden. Das System ist jedoch nicht hundertprozentig genau, sondern toleriert eine gewisse Anzahl an Fehlpaarungen zwischen den Basen der guide RNA und denen der Zielsequenz (Cho

et al., 2014; Fu et al., 2013). Das kann dazu führen, dass Cas auch an anderen Stellen als der Zielsequenz im Genom bindet, dort die DNA schneidet und eine zusätzliche Veränderung ungewollt eingeführt.

Dabei ist wichtig zu beachten, dass die Organismen einer Art keine Klone sind, sondern eine große genetische Variabilität aufweisen. Die Individuen einer Population unterscheiden sich natürlicherweise untereinander in einzelnen Basen ihres Erbguts (sogenannte Polymorphismen), was die genetische Variation innerhalb einer Population erhöht. Diese Polymorphismen gehen auf ursprüngliche Punktmutationen zurück, die sich zum Teil innerhalb des Genpools einer Population durchgesetzt haben und somit vererbare genetischen Varianten darstellen. Genetische Varianten eines bestimmten Gens am gleichen Genort werden Allele genannt.

Die guide RNA für ein CRISPR/Cas Experiment wird anhand der Zielsequenz im Genom eines Organismus entworfen bzw. designt, die von einigen Individuen einer Art bekannt ist. Nicht bekannt ist die Gesamtheit aller Polymorphismen einer Art für diese Zielsequenz. Das kann dazu führen, dass zusätzliche Off-Target-Bereiche existieren, die man nicht bedacht hat. Es existieren für viele Arten Datenbanken mit sogenannten Referenzgenomen, die für eine vorsorgliche Bestimmung von Off-Target-Bereichen durch Computerprogramme genutzt werden können. Diese Referenzgenome können die komplette genetische Variabilität innerhalb einer Art jedoch nicht erfassen.

Auch mehrere unterschiedliche Gene können auf einmal durch CRISPR/Cas verändert werden, was als Multiplexing bezeichnet wird (J. F. Li et al., 2013; Xing et al., 2014). Daraus ergeben sich schwer abschätzbare Fragen: Auch wenn die einzelnen Veränderungen dabei nur kleine Abschnitte der DNA umfassen, kann die Summe der Veränderungen und die Wechselwirkungen auf der Ebene des gesamten Organismus zu ungewollten Eigenschaften führen, die nicht aufgrund der einzelnen Gen-Orte vorhersagbar sind.

Off-Target-Effekte bei Pflanzen

Off-Target-Effekte sind auch bei der Anwendung von CRISPR/Cas bei Pflanzen ein Risiko, da das Genom bestimmter Pflanzenarten wie Mais besonders groß ist und Genabschnitte in mehreren Kopien und Variationen vorliegen können. Viele Pflanzenarten, wie Weizen oder Mais, besitzen mehr als zwei Chromosomensätze, was in der Biologie als Polyploidie bezeichnet wird. Weiterhin kommen im pflanzlichen Genom Genfamilien vor innerhalb derer die Gene sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich beziehungsweise identisch sind. Diese Genfamilien sind evolutionär

durch Verdopplungen bestimmter Gene entstanden. Ob gewollt oder ungewollt, das CRISPR/Cas-System ist in der Lage alle Gen-Orte mit identischer oder sehr ähnlicher Genstruktur auf einmal zu verändern.

On-Target-Effekte: Einbau von zellfremder DNA

Es können sich auch ungewollte Veränderungen durch den Einbau von zellfremder DNA in das Genom der Pflanze ergeben. Ein potentielles Risiko birgt hier zum Beispiel das Einschleusen der DNA in die Zelle, die als Vorlage für die Herstellung der Cas-Nuklease (siehe Hintergrundpaier zu CRISPR/Cas (Technik)) dient. Diese DNA-Vorlage ist die Grundlage für die Synthese der „Gen-Schere“. Sie kann für einen längeren Zeitraum, auch wenn sie zunächst nicht im Erbgut verankert ist, innerhalb der Zellen verbleiben, bevor sie abgebaut wird (Kouranova et al., 2016).

Diese DNA (beziehungsweise die Fragmente dieser DNA), kann am Zielort (On-Target-Effekt) als auch an anderen Off-Target-Bereichen der DNA unbeabsichtigt in das Erbgut eingefügt werden (Z. Li et al., 2015; Liang et al., 2017). Es besteht die Gefahr, dass solche Off-Target-Veränderungen übersehen werden, da häufig nur an der Zielsequenz nach möglichen Resten der DNA für die Nuklease gesucht wird oder an Bereichen die der Zielsequenz sehr ähnlich sind. Andere Bereiche des Genoms werden häufig nicht näher nach Off-Target Effekten untersucht (Kim, Kim, Cho, Kim, & Kim, 2014).

DNA ist ein dynamisches, hoch interaktives Molekül

Bei der Bewertung von auftretenden Risiken der Veränderungen durch das CRISPR/Cas-System ist es wichtig sich vor Augen zu führen, dass die DNA nicht als starres, lineares Molekül im Zellkern vorliegt, sondern hoch-dynamische Wechselwirkungen eingeht. Die DNA im Zellkern ist flexibel und schleifenartig angeordnet, was bewirkt, dass weit voneinander entfernte Abschnitte der DNA sich räumlich sehr nah kommen. So können regulatorische Bereiche auf der DNA die Expression von weit entfernt lokalisierten Genen bestimmen (Kaiser & Semple, 2017).

Auch kleinste Veränderungen der DNA (sowohl unbeabsichtigte als auch beabsichtigte) durch das CRISPR/Cas-System können somit einen Einfluss auf andere Bereiche haben. Zusätzlich steht die DNA im engen Kontakt mit regulatorischen Proteinen, was eine weitere Ebene an Komplexität öffnet. Einzelne kleine Veränderungen am Erbgut sollten somit nie isoliert auf das einzelne Gen reduziert werden, sondern immer im Kontext des Zusammenspiels aller beteiligten Komponenten innerhalb einer Zelle betrachtet werden.

Erhöhtes Risiko von Off-Target-Effekten bei hohen Konzentrationen der CRISPR/Cas-Komponenten

Damit das CRISPR/Cas-System optimal funktioniert, müssen die CRISPR/Cas-Komponenten in einer auf den jeweiligen Zelltyp genau abgestimmte Menge in der Zelle vorliegen. Ist die Konzentration der eingesetzten CRISPR/Cas-Komponenten zu hoch, treten vermehrt Off-Target-Effekte auf (Pattanayak et al., 2013), ist sie zu niedrig, werden die erwünschten Effekte nicht erreicht. Es muss also ein geeignetes Verhältnis zwischen der On-Target-Effizienz und den Off-Target-Effekten gefunden werden (Hsu et al., 2013).

Falsch zusammengesetzte Proteine (Exon-Skipping)

Ein weiterer möglicher biologischer Nebeneffekt von CRISPR/Cas-Veränderungen ist das sogenannte Exon-Skipping. Dabei werden die veränderten Genabschnitte anders abgelesen, als dies beabsichtigt war. Die daraus gebildeten Proteine können ungewollte Strukturen und Eigenschaften aufweisen, obwohl die Zielsequenz scheinbar korrekt verändert wurde. Manchmal werden auch die ursprünglichen Proteine weiterhin in der Zelle gebildet, obwohl das zugrundeliegende Gen ausgeschaltet wurde (Kapahnke, Banning, & Tikkanen, 2016; Lalonde et al., 2017; Mou et al., 2017).

Bei dem Ablesen und Zusammensetzen von Proteinen aus einer DNA-Sequenz (kodierendes Gen) heraus gibt es Bereiche, die direkt in die Aminosäuresequenz des Protein übersetzt werden (Exons), und andere, dazwischen liegende Bereiche (Introns), die herausgeschnitten werden. Zwischen einem Exon und einem benachbarten Intron sind DNA-Sequenzen, die Anfang und Ende beider Elemente markieren. Bereits eine kleine Veränderung der DNA-Sequenz kann dazu führen, sich der „Leserahmen“ verschiebt und die Gene anders abgelesen werden. Dadurch können einzelne Exons übersprungen werden und irrtümlich gebildete, verkürzte Proteine entstehen. Diese können immer noch funktionell in der Zelle arbeiten, aber im Vergleich zum normalerweise gebildeten Protein veränderte Funktionen aufweisen.

Genome Editing auf der Ebene der Epigenetik hat Potential für ungewollte Nebeneffekte

Das CRISPR/Cas-System kann auch dazu verwendet werden, die Epigenetik, das heißt die Genregulierung zu verändern. Dazu wird nicht die DNA verändert, sondern bestimmte biochemische Moleküle werden entfernt oder eingeführt, die Einfluss auf die Aktivität der Gene haben. Derartige biochemische Veränderungen können zu

einem Abschalten bestimmter Gene führen (z.B. durch Methylierung von DNA) und zum anderen zu einer Aktivierung von Genen (z.B. durch Acetylierung von Histonen). Um die Epigenetik beeinflussen zu können, wurde die Nuklease Cas9 so verändert, dass sie zwar nicht mehr die DNA schneidet (dead Cas9/dCas9), sie jedoch noch an der DNA andocken kann und als Träger für biochemisch aktive Enzyme fungiert. Diese Enzyme, gekoppelt an das Cas-Protein, werden durch guide RNAs an die Zielsequenz geführt und sollen dort spezifisch die biochemischen Veränderungen einführen (Hilton et al., 2015; Kearns et al., 2014).

Enzyme, die an die Nuklease gekoppelt sind, können unspezifisch über das gesamte Erbgut aktiv werden und es besteht die Möglichkeit, dass sie an ungewollter Stelle epigenetische Veränderungen einführen und damit die Genexpression an ganz anderer Stelle beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses System genomweit zu einer Veränderung des epigenetischen Musters in Zelllinien führen kann (Galonska et al., 2018). Eine damit mögliche Veränderung der Genaktivität kann sich dabei auf große Teile des Erbguts auswirken und die Eigenschaften der betroffenen Tiere oder Pflanzen grundlegend verändern, ohne dass dies auf der Ebene der DNA erkennbar wäre.

Das Einbringen des CRISPR/Cas-System in die Zellen kann zu strukturellen Veränderungen des Genoms führen

Die Verfahren, mit denen das CRISPR/Cas-System in die Zellen eingeschleust wird, stellen ein weiteres Risiko für das Auftreten von ungewollten Effekten dar. Bei vielen Anwendungen muss zunächst die DNA für die Synthese der Nuklease in das Erbgut integriert werden. Erst in einem nächsten Schritt soll dann die Nuklease die DNA an einer anderen Stelle gezielt verändern.

Der erste Schritt – die Einführung der DNA für die Nuklease – wird mit Standard-Verfahren durchgeführt. Der Einbau der Gene erfolgt dabei nicht gezielt, wodurch es oft ungewollte Veränderungen im Erbgut gibt.

Insbesondere die weit verbreitete Methode, DNA in pflanzliche Zellen mit dem Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* einzubringen, kann zu gravierenden Veränderungen in der Struktur des Erbguts führen (Jupe, 2018). Hierbei können große chromosomale Veränderungen wie Insertionen, Deletionen und Translokationen (große chromosomale Abschnitte werden auf ein anderes Chromosom übertragen) auftreten. Mindestens ebenso häufig sind Nebenwirkungen beim Einsatz der sogenannten „Genkanone“. Dabei wird die DNA zusammen mit winzigen Metallpartikeln in einer Art „Schrotschussverfahren“ in die Zellen eingebracht. Auch hier können Gene ungezielt und mehrfach in das Erbgut eingefügt werden.

Auswirkungen auf der Ebene des Organismus und der Umwelt

Auch wenn die Veränderungen der DNA durch Genome Editing Verfahren erfolgreich und zielgenau sind, können die Wirkungen dieser Veränderungen auf der Ebene des Organismus ganz anders sein als beabsichtigt. Hier darf präzise nicht mit sicher gleichgesetzt werden. Durch Wechselwirkungen mit anderen Genen kann sich beispielsweise die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe von Pflanzen verändern oder diese anfälliger für Krankheiten werden. Betroffen können beispielsweise auch die Interaktionen mit Bestäubern, Bodenorganismen (Mikrobiom der Pflanzen) oder der Nahrungskette sein.

Diese Auswirkungen sind zum Teil schwer zu entdecken, weil es hier nicht ausreicht, nur die Struktur der DNA zu untersuchen. Stattdessen müssten oft komplexe Stoffwechselfvorgänge in der Zelle genauer untersucht werden.

Wirkung von CRISPR/Cas

Durch CRISPR/Cas verursachte Veränderungen am Erbgut können neben den gewünschten Effekten auch in andere Signalwege oder Stoffwechselwege eingreifen. Bei einem gezielten Ausschalten eines bestimmten Gens wird also nicht nur die Bildung des korrespondierenden Proteins und damit einer bestimmten Eigenschaft verhindert, sondern kann auch die Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen beeinflussen. Signalwege und regulatorische Netzwerke stehen in engem Austausch miteinander. So können Proteine miteinander in Wechselwirkung treten und sich dabei zum Beispiel in ihren Funktionen stimulieren oder aber auch inhibieren. Auch Wechselwirkungen zwischen RNA und DNA-Elementen, Proteinen und DNA-Bereichen und Proteinen und RNAs sind bekannt. Veränderungen am Erbgut durch CRISPR/Cas können im Zielorganismus zu einem Ungleichgewicht dieses gut koordinierten Zusammenspiels führen.

Wird nun beispielsweise die Genexpression, also das Ablesen eines Gens ausgeschaltet und das entsprechende Protein nicht mehr gebildet, kann dies, neben den gewünschten Effekten, auch zu einem Ungleichgewicht in anderen Signalwegen der Zelle führen. Die Veränderungen sollten also niemals isoliert und linear betrachtet werden, sondern immer im Kontext eines im Gleichgewicht stehenden biologischen Systems.

Die Folgewirkungen der Veränderungen auf Signalwege der Zellen können durch sogenannte Omics-Verfahren untersucht und bewertet werden (siehe unten).

Unerwartete Effekte können sich in unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Pflanzen offenbaren

Die Wirkung einzelner Gene ist immer auch abhängig von anderen Genen und der Genregulation in den jeweiligen Zellen eines Organismus. Man spricht vom „genetischen Hintergrund“. Dieser kann auch innerhalb einer Art sehr heterogen, das heißt unterschiedlich, sein. Die Unterschiede können durch Variationen in der Struktur der DNA (Polymorphismen) oder in der Genregulierung verursacht werden. Wegen unterschiedlicher genetischer Hintergründe können sich Erbgutveränderungen beispielsweise in Pflanzensorten, die in verschiedenen Regionen gezüchtet wurden, unterschiedlich stark ausprägen. Dies wurde beispielsweise beim Einsatz bisheriger Gentechnik an Reis beobachtet (Bollinedi et al., 2017), der bei dem Einkreuzen in einen anderen genetischen Hintergrund einen veränderten Wuchs und weniger Ertrag zeigte.

Äußere Einflüsse können unerwartete biologische Effekte innerhalb der veränderten Pflanze auslösen

Veränderungen durch das CRISPR/Cas-System können ungewollte Effekte auslösen, die sich erst in der Umwelt zeigen, das heißt, wenn der veränderte Organismus als Ganzes äußeren Stressfaktoren wie zum Beispiel Trockenheit, schwankenden Temperaturbedingungen oder Schädlingen ausgesetzt wird. Diese Umweltfaktoren können innerhalb der Pflanze Prozesse hervorrufen, bei denen Gene an- bzw. abgeschaltet werden, um auf die jeweilige Stress-Situation zu reagieren und die Pflanze zu schützen. Auch diese unbeabsichtigten Auswirkungen, die sich erst in Reaktion auf Umweltstress zeigen, sollten bei der Anwendung von CRISPR/Cas-Verfahren untersucht werden.

Bewertung der durch CRISPR/Cas bewirkten Veränderungen durch Omics-Verfahren

Für eine geeignete Bewertung der Veränderungen am Erbgut durch Genome-Editing-Verfahren gibt es eine Reihe von molekularen Methoden, die eingesetzt werden können, um die Auswirkungen der Veränderungen auf allen Ebenen der Zelle zu untersuchen: auf der Ebene der DNA (Genomics), der RNAs (Transkriptomics), Proteine (Proteomics) und Stoffwechselfvorgängen (Metabolomics).

Bei den Genomics können sogenannte Whole Genome Sequencing (WGS)-Verfahren eingesetzt werden, um das Erbgut eines Organismus zu sequenzieren und damit die Abfolge der Basen der DNA zu entschlüsseln. Mit Hilfe eines

Referenzgenoms kann ein Abgleich erfolgen, welche Veränderungen durch das CRISPR/Cas-System ins Erbgut eingeführt wurden. Mit diesen Verfahren können ungewollte Veränderungen der DNA-Sequenz ermittelt werden. WGS-Methoden werden derzeit immer weiter entwickelt, um auch schwer zu sequenzierende Bereiche des Erbguts (z.B. hoch repetitive Bereiche) zu entschlüsseln (Jain et al., 2018)

Unter dem Begriff Transkriptomik werden Verfahren zusammengefasst mit deren Hilfe man alle vorhandenen RNA-Moleküle innerhalb einer Zelle nachweisen kann. RNA ist zum einen das Zwischenprodukt ausgehend von der DNA-Sequenz zur Bildung von Proteinen, kann aber auch regulatorische Funktionen haben (z.B. miRNA, long non-coding RNA). Durch Transkriptomik-Verfahren kann die Gesamtheit aller RNAs einer durch CRISPR/Cas veränderten Zelle ermittelt und mit unveränderten Zellen verglichen werden, um so ungewollte Nebeneffekte, wie Veränderungen der Genexpression von Nicht-Ziel-Genen, nachzuweisen.

Die Verfahren der Proteomik erfassen die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und ermöglichen den Vergleich von veränderten mit unveränderten Zellen. Damit können ungewollte Nebeneffekte ermittelt werden wie zum Beispiel falsch zusammengesetzte Proteine durch Exon-Skipping.

Durch Metabolomik-Methoden lassen sich Moleküle, die an Stoffwechselprozessen beteiligt sind, innerhalb einer Zelle nachweisen und ermöglichen den Vergleich mit einer entsprechenden Referenz. Kommt es durch eine Veränderung zu unvorhergesehenen Effekten im Stoffwechsel, so kann ein Ungleichgewicht entstehen und in Pflanzen beispielsweise die Bildung von sekundären Metaboliten gestört werden. Dies kann einen Einfluss auf den Organismus an sich haben, aber auch auf andere Organismen.

Stand Juli 2018

Referenzen

- Bollinedi, H., S, G. K., Prabhu, K. V., Singh, N. K., Mishra, S., Khurana, J. P., & Singh, A. K. (2017). Molecular and Functional Characterization of GR2-R1 Event Based Backcross Derived Lines of Golden Rice in the Genetic Background of a Mega Rice Variety Swarna. *PLoS One*, *12*(1), e0169600. doi: 10.1371/journal.pone.0169600
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res*, *24*(1), 132-141. doi: 10.1101/gr.162339.113
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, *31*(9), 822-826. doi: 10.1038/nbt.2623
- Galonska, C., Charlton, J., Mattei, A. L., Donaghey, J., Clement, K., Gu, H., . . . Meissner, A. (2018). Genome-wide tracking of dCas9-methyltransferase footprints. *Nat Commun*, *9*(1), 597. doi: 10.1038/s41467-017-02708-5
- Hilton, I. B., D'Ippolito, A. M., Vockley, C. M., Thakore, P. I., Crawford, G. E., Reddy, T. E., & Gersbach, C. A. (2015). Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, *33*(5), 510-517. doi: 10.1038/nbt.3199
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., . . . Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, *31*(9), 827-832. doi: 10.1038/nbt.2647
- Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., . . . Loose, M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat Biotechnol*, *36*(4), 338-345. doi: 10.1038/nbt.4060
- Jupe, M., Rivkin, Zander, Motley, Sandoval, Slotkin, Chen, Castagnon, Nery, J. R. Ecker. (2018). The complex architecture of plant transgene insertions. *BioRxiv (Preprint)*.
- Kaiser, V. B., & Semple, C. A. (2017). When TADs go bad: chromatin structure and nuclear organisation in human disease. *F1000Res*, *6*. doi: 10.12688/f1000research.10792.1
- Kapahnke, M., Banning, A., & Tikkanen, R. (2016). Random Splicing of Several Exons Caused by a Single Base Change in the Target Exon of CRISPR/Cas9 Mediated Gene Knockout. *Cells*, *5*(4). doi: 10.3390/cells5040045
- Kearns, N. A., Genga, R. M., Enuameh, M. S., Garber, M., Wolfe, S. A., & Maehr, R. (2014). Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in

- human pluripotent stem cells. *Development*, 141(1), 219-223. doi: 10.1242/dev.103341
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24(6), 1012-1019. doi: 10.1101/gr.171322.113
- Kouranova, E., Forbes, K., Zhao, G., Warren, J., Bartels, A., Wu, Y., & Cui, X. (2016). CRISPRs for Optimal Targeting: Delivery of CRISPR Components as DNA, RNA, and Protein into Cultured Cells and Single-Cell Embryos. *Hum Gene Ther*, 27(6), 464-475. doi: 10.1089/hum.2016.009
- Lalonde, S., Stone, O. A., Lessard, S., Lavertu, A., Desjardins, J., Beaudoin, M., . . . Lettre, G. (2017). Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLoS One*, 12(6), e0178700. doi: 10.1371/journal.pone.0178700
- Li, J. F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., . . . Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31(8), 688-691. doi: 10.1038/nbt.2654
- Li, Z., Liu, Z. B., Xing, A., Moon, B. P., Koellhoffer, J. P., Huang, L., . . . Cigan, A. M. (2015). Cas9-Guide RNA Directed Genome Editing in Soybean. *Plant Physiol*, 169(2), 960-970. doi: 10.1104/pp.15.00783
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., . . . Gao, C. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 8, 14261. doi: 10.1038/ncomms14261
- Mou, H., Smith, J. L., Peng, L., Yin, H., Moore, J., Zhang, X. O., . . . Xue, W. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol*, 18(1), 108. doi: 10.1186/s13059-017-1237-8
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A., & Liu, D. R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 31(9), 839-843. doi: 10.1038/nbt.2673
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., . . . Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*, 14, 327. doi: 10.1186/s12870-014-0327-y