

DOI: 10.13376/j.cblls/2019075

文章编号: 1004-0374(2019)06-0628-09

· 技术与应用 ·

CRISPR-dCas9转录调控系统及其在 遗传病治疗研究中的应用

李博文^{1,2}, 梁世倩², 白 健², 秦鸿雁^{2*}

(1 空军军医大学药理学系2015级生物技术专业, 西安 710032;

2 空军军医大学基础医学院医学遗传与发育生物学教研室, 西安 710032)

摘要: CRISPR-Cas9 是一种强大的基因组编辑系统, 随着研究的深入, 科学家建立了调控基因组转录的 CRISPR-dCas9 系统。该系统的建立基于 dCas9 的发现, dCas9 丧失核酸酶活性, 虽不具有 DNA 切割活性, 但仍然具有 DNA 结合活性, 其可在 sgRNA 的引导下靶向目的基因, 将特定的转录激活因子 (或抑制因子) 携带至目的基因上游, 实现对目的基因的转录激活 (CRISPRa) 或转录抑制 (CRISPRi)。目前该系统已用于遗传病治疗的实验研究, 取得了可喜的进展, 具有潜在的临床应用价值。该文从 CRISPR-dCas9 系统建立、发展以及在几种遗传病治疗领域的研究进行了综述。

关键词: 死亡 Cas9; CRISPR 激活; CRISPR 抑制; 杜氏肌营养不良; 脆性 X 染色体综合征; 色素性视网膜炎

中图分类号: Q-7

文献标志码: A

The CRISPR-dCas9 system regulating genomic transcription and its application in genetic disease therapy

LI Bo-Wen^{1,2}, LIANG Shi-Qian², BAI Jian², QIN Hong-Yan^{2*}

(1 2015 Biological Technology Major, School of Pharmacy, The Fourth Military Medical University,

Xi'an 710032, China; 2 Department of Medical Genetics and Developmental Biology,

The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: The bacterial CRISPR-Cas system is one powerful genome editing system guided by a single guide RNA (sgRNA). Recently, using an engineered nuclease-deficient Cas9, termed dCas9, one new CRISPR-dCas9 system is established, which can target genomic DNA without cleaving. In detail, dCas9, carrying a specific transcriptional activator (or inhibitor) to upstream of the target gene, can regulate specific gene expression including repression through CRISPR interference (CRISPRi) and activation through CRISPR activation (CRISPRa). The CRISPR-dCas9 system has been applied in studies of genetic disease therapy, which have the potential clinic application value. In this review, we elucidate the development of CRISPR-dCas9 system and its application in several genetic disease therapy, such as Duchenne muscular dystrophy, fragile X syndrome and retinitis pigmentosa.

Key words: dead Cas9; CRISPR activation; CRISPR interference; Duchenne muscular dystrophy; fragile X syndrome; retinitis pigmentosa

CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced
short palindromic repeats/CRISPR associated 9) 系统是

细菌和古生菌在长期进化过程中形成的一种适应性
免疫系统, 用于保护宿主细胞抵抗外源物质 (如病

收稿日期: 2018-11-08; 修回日期: 2018-12-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81530018); 肿瘤生物学国家重点实验室青年自主课题(CBSKL-2017Z13)

*通信作者: E-mail: hyqin@fmmu.edu.cn

毒和质粒等)的入侵^[1-2]。该系统由核酸酶 Cas9 蛋白和具有识别靶向核酸序列的单链向导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 组成, 利用 RNA 引导的 Cas 蛋白降解外源 DNA 的原理, 实现对目的基因的切割^[3]。相对于传统的遗传修饰技术, 该技术操作步骤简单、实验周期短, 因而快速发展为基因编辑的利器, 只通过一步法即可实现对斑马鱼、小鼠、大鼠、猕猴等多物种的靶向基因编辑^[4-7]。不仅如此, 通过对 Cas9 蛋白的深入研究, 发现了保留 DNA 结合活性但丧失核酸酶活性的死亡 Cas9 (dead Cas9, dCas9), 利用 sgRNA/dCas9 复合物对目的基因的高效识别作用, 融合在 dCas9 上的转录调控效应分子可被“运载”至目的基因的 DNA 结合位点上, 实现对目的基因的靶向激活或靶向抑制, 即 CRISPR 激活 (CRISPR activation, CRISPRa) 和 CRISPR 抑制 (CRISPR interference, CRISPRi)^[8-11]。由于其高效靶向性, 该系统被形象地描述为“一辆装有 GPS 系统的汽车”, 并广泛用于基因功能和疾病的研究中。本文以 CRISPRa 为主, 介绍了 CRISPR-dCas9 系统的不同变体, 综述了该系统在遗传病治疗的研究领域的进展, 并对该系统在未来临床治疗的潜在价值进行了展望。

1 CRISPR-dCas9转录调控系统简介

自 2013 年 Bikard 等^[12]在大肠杆菌中将 RNA 聚合酶与 dCas9 融合表达研究 CRISPR-dCas9 系统对报告基因激活开始, 靶向基因组编辑系统就不断丰富和完善, 现已被应用于基础研究各个领域。该系统的原理基于 II 型 CRISPR/Cas9 系统, 目前对酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 Cas9 蛋白的研究和应用最为广泛, Cas9 具有两个关键的结构域, 即 DNA 识别 (recognition, REC) 结构域和核酸酶 (nuclease, NUC) 结构域 (图 1A)。DNA 识别结构域对 RNA-DNA 的结合是必需的; 核酸酶结构域包含 RuvC、HNH 和 PAM 相互作用 (PAM interaction, PI) 结构域, 其中 PI 结构域识别非互补 DNA 链的 5'-NGG-3' PAM 序列, 而不是互补链上的 3'-NCC-5' 序列^[13], 随后通过 RuvC 和 HNH 对目的序列进行切割 (图 1A), 形成双链断裂切口 (double strand break, DSB), 再通过细胞自身的 DNA 损伤修复系统, 以非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 或同源重组修复 (homology directed repair, HDR) 的方式对双链断裂缺口进行修复, 进而实现对目的基因的编辑。若对核酸酶结构域中的两个关键氨基酸进行突变 (位于 RuvC 中的 D10A 和位于 HNH 的

H840A), 可使 Cas9 丧失核酸酶活性, 形成 dCas9^[2,7,13]。将 dCas9 与转录激活因子相融合, 即可招募共激活复合物或 RNA 聚合酶实现对目的基因的转录激活作用 (图 1B)。同理, 当把 dCas9 与转录抑制因子相融合, 可实现对目的基因的转录抑制作用。对 spCas9-sgRNA-target DNA 三联复合物的晶体结构的解析发现^[13], sgRNA 的四联环 (tetraloop) 与茎环-2 (stem loop 2) 突出于 dCas9-sgRNA 蛋白核酸复合物的外侧 (图 2), 这两个茎环结构的远端 4 bp 完全没有与 dCas9 氨基酸侧链发生相互作用。替换或删除四联环和茎环中的突出核苷酸并不影响 Cas9 的催化功能^[14]。因而选择合适的适配体并招募转录激活因子 (或抑制因子) 可增强 dCas9 介导的转录调控作用。CRISPR-dCas9 转录调控系统的发展已经历了从最初将 dCas9 与转录调控因子融合表达, 到充分利用其结构特性招募更多的转录调控因子的阶段, 其技术进步为其广泛应用打下了基础。

2 CRISPR-dCas9转录调控系统的分类

按照 CRISPR-dCas9 靶向基因组编辑系统的作用原理和调控方式, 可将其分为以下几种: (1) dCas9-转录调控蛋白融合系统; (2) dCas9-表观遗传修饰系统; (3) 可诱导的 dCas9 靶向基因调控系统。

2.1 dCas9-转录调控蛋白融合系统

基于 sgRNA 引导 dCas9 识别并结合目的基因 DNA 的原理, 研究人员将不同的转录激活结构域直接与 dCas9 蛋白融合, 利用 dCas9 的 DNA 结合活性, 直接 (或间接) 将各类转录激活因子携带到目的基因的转录起始位点上游, 通过转录激活因子直接招募转录起始复合物, 实现目的基因的激活。按照转录激活系统的发展和作用效果, 将其分为基础型转录激活系统和增强型转录激活系统。增强型转录激活系统包括 VPR 系统、Sun Tag 系统和 SAM 系统。三种系统各有特点, 且都能显著增强目的基因的转录激活效率。同理, 当把转录抑制结构域与 dCas9 蛋白相融合, 即可实现目的基因的转录抑制。

基础型转录激活系统是将转录激活因子如 VP64^[15] (由 4 个单纯疱疹病毒的转录激活结构域 VP16 串联组成) 或 p65 的转录激活结构域 (p65AD)^[16] 直接融合到 dCas9 (图 1B), 通过 sgRNA-dCas9 复合物介导其与目的序列的结合, 将这些转录激活因子携带到转录起始位点上游, 进而招募转录起始复合物实现目的基因的转录激活调控作用^[7,11,17]。有研究显示, 这种激活效应的强度与 sgRNA 和

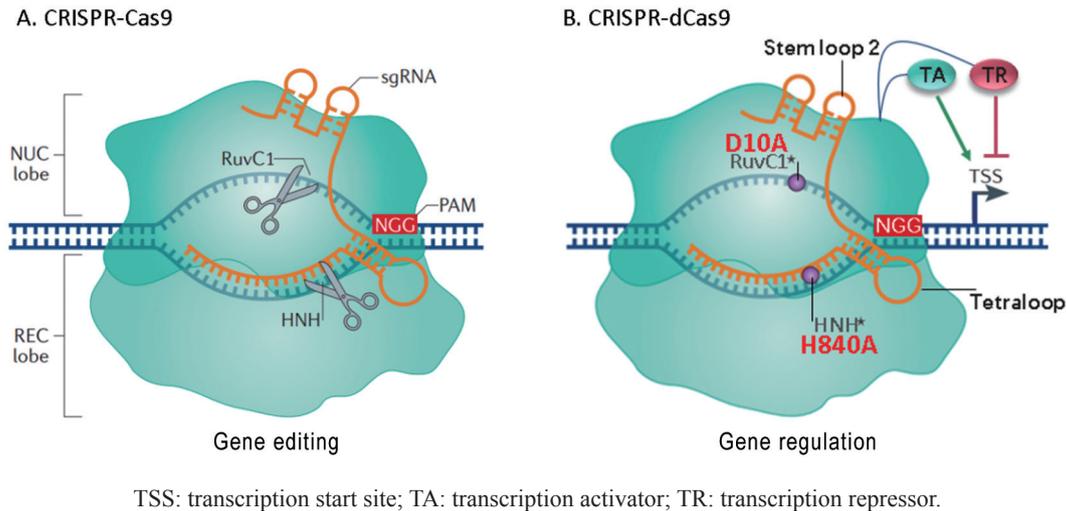


图1 CRISPR-Cas9靶向基因编辑与CRISPR-dCas9靶向基因激活(基于文献^[9]并修改)

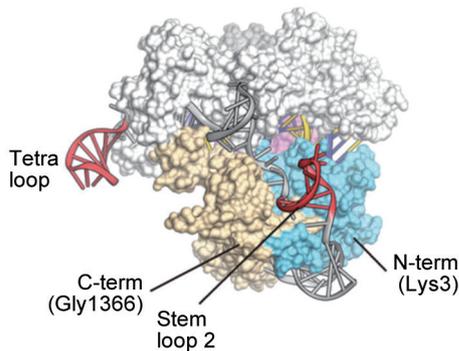


图2 Cas9-sgRNA-target DNA三联复合物的晶体结构^[14]

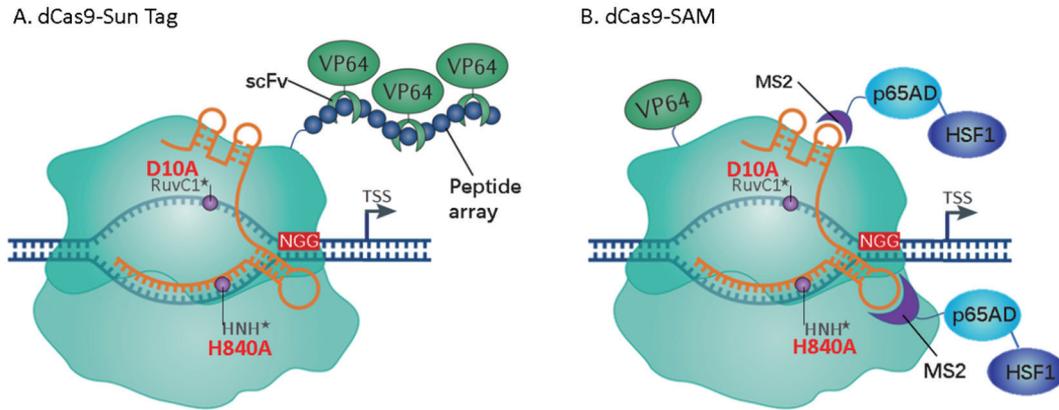
dCas9-VP64 存在明显的剂量依赖效应, 且联合使用多个位点的 sgRNA 可增强对目的基因的转录激活效率^[7,18]。例如, 增加 VP16 的拷贝数(由 4 个增加到 10 个), 形成的 dCas9-VP160 系统可增强转录激活的效率^[19-20], 但在不同基因间对比 VP64 和 VP160 的转录激活效率, 发现 VP160 并没有在 VP64 的基础上显著增强其转录激活效率^[18]。

VPR 系统是将 VP64、p65AD 和 Rta^[21] 三个转录激活结构域串联形成。在自然的转录系统中, 转录起始发生于多个转录激活结构域协调募集转录起始元件。研究人员假设串联融合多个转录激活结构域可模拟天然募集作用而提高转录激活水平。通过对 20 种转录激活因子进行研究发现, dCas9-VP64、dCas9-p65 和 dCas9-Rta 具有最强的转录激活活性。因而将这 3 个转录因子串联起来融合到 dCas9 上, 通过转录激活结构域的顺序组合, 确立了最优的组合结构 VP64-p65-Rta, 形成 dCas9-VPR 系统^[22]。相对于 dCas9-VP64 系统, dCas9-VPR 系统的内源

目的基因激活效应更优, 且具备稳定的多基因座激活效应^[22]。

Sun Tag 系统是基于抗体和抗原表位高效特异结合的原理建立的。抗体能以强的亲和力特异性地结合到短的、非结构化的短肽序列。同时, 短肽表位可设计成有别于基因组中自然形成的抗原表位, 如单链可变抗体 (single-chain variable fragment, scFv) 具有较强的抗原亲和力, 且相对分子质量小, 是高效的基因工程抗体。基于以上两点, 研究人员在 dCas9 的 C 末端融合表达 10 个拷贝的肽簇 (peptide array), 同时, 将与该肽簇对应的 scFv 抗体与 VP64 融合表达, 两者通过抗原抗体的高亲和力相结合, 进而将多个 VP64 携带到目的基因的转录起始位点上游, 从而显著增强转录激活效率, 形成 Sun Tag 系统 (图 3A)。研究结果显示, 该系统通过单个的 sgRNA 即可实现目的基因表达的显著增强, 进而调控细胞功能^[23]。

SAM 系统是基于 Cas9-sgRNA-target DNA 三联复合物晶体结构而建立的^[13-14]。前面提到, 替换或删除该复合物 sgRNA 中四联环和茎环 -2 中突出 Cas9 酶的核苷酸片段并不影响 Cas9 的功能, 因而选择合适的适配体拼接到 sgRNA 相应部位并融合转录激活因子到 dCas9 上可增强 dCas9 介导的转录激活作用。研究者在 dCas9-VP64 系统的基础上, 选择了最小的发夹结构适配体^[14], 它是 MS2 噬菌体复制酶编码基因 5' 端存在的一个由 19 个碱基组成的茎环结构, 能够选择性地结合 MS2 噬菌体的衣壳蛋白二聚体。用这种适配体通过 GC 束与 sgRNA 剩余部分相连, 同时, 将 p65AD 和 HSF1 串



scFv: 单链可变抗体; Peptide array: 抗原表位阵列; MS2: MS2噬菌体衣壳蛋白二聚体。

图3 dCas9-SunTag系统和dCas9-SAM系统模式图

联融合到 MS2 噬菌体衣壳蛋白二聚体中 (图 3B), 形成 MS2-p65-HSF1 (MPH), 通过适配体和 MS2 二聚体的选择性结合, 即可将 p65 转录激活结构域和 HSF1 携带到目的基因转录起始位点上游, 构成 SAM 系统, 在 dCas9-VP64 的基础上发挥显著增强的转录激活作用。该系统不仅显著地提高了内源性编码基因的转录活性, 还能够有效激活非编码基因的转录^[14]。

转录抑制系统是将转录抑制因子融合到 dCas9 所构成。转录抑制因子, 包括 Kox1 基因的 KRAB 结构域、HP1 α 基因的 CS 结构域、Hes1 基因的 WRPW 结构域。其中 dCas9-KRAB 介导的转录抑制能力最强^[11], 得到广泛的应用。

2.2 dCas9-表观遗传修饰系统

表观遗传修饰对基因表达的调控发挥着重要的作用。DNA 元件百科全书 (encyclopedia of DNA elements, ENCODE)^[24] 和路标表观基因组计划 (roadmap epigenomics project)^[25] 已经检测出了人类基因组中数百万个表观遗传学标记^[26]。通过改变基因组表观遗传标记不仅可用于细胞重编程、构建疾病模型, 还可将其用于再生医学或基因治疗以造福于人类^[26]。联合基因编辑技术 (如 ZFN、TALEs) 和表观遗传修饰酶可有效实现对目的基因表观遗传标记的修改, 调控基因表达^[27-32]。基于 CRISPR-Cas9 系统的易操作性和特异性, 研究人员将 CRISPR-dCas9 与表观遗传修饰酶 (甲基转移酶、乙酰基转移酶等) 相结合, 形成了 dCas9-表观遗传修饰系统。目前常见的激活目的基因表达的表观遗传修饰酶主要有组蛋白乙酰基转移酶和 DNA 去甲基转移酶, 如 p300 和 Tet1, 而抑制目的基因表达的表观遗传修饰酶主要有 DNA 甲基转移酶 DNMT3a、组蛋白

去甲基酶 LSD1 和组蛋白去乙酰化酶 HDAC3。

p300 是一种高度保守的乙酰基转移酶, 可以调节组蛋白 H3K27 的乙酰化, 是基因表达调控中重要的辅激活因子^[33-35]。最早发展起来的 dCas9-VP64 转录激活系统仅通过招募转录起始复合物来激活基因表达, 并不能调控染色质的状态, 当将 p300 的乙酰基转移酶核心结构域^[35] 与 dCas9 融合, 可在 sgRNA 引导下靶向增强子或启动子, 调控组蛋白的乙酰化水平, 进而调控染色质的状态, 有效激活基因表达, 激活效率远远高于 dCas9-VP64, 但不同于包括 dCas9-VP64 在内的其他系统, dCas-p300 在多个 sgRNA 的作用下并没有表现出相似的增效作用, 仅单个 sgRNA 即可实现内源基因表达的显著增强, 对目的基因的激活具有高度的特异性^[26]。

Tet1 是一种去甲基转移酶, 全称为 Ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase (Tet1)^[36]。哺乳动物基因胞嘧啶第 5 位碳原子上的甲基化修饰 (5-mC) 在生命活动过程中起着重要的作用, 包括基因组印记、细胞命运选择、染色质重塑和基因表达调控等^[37-39]。5-mC 会阻碍转录因子复合体与 DNA 结合, 抑制基因表达, 去甲基化可使一个沉默基因重新激活。Tet1 催化 5-mC 转化为 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hmC)^[40], 帮助甲基化的去除, 而甲基转移酶 (DNMTs) 可将 S-腺苷甲硫氨酸上的甲基转移至胞嘧啶核苷酸的第 5 位碳原子上, 催化甲基化的建立。将 dCas9 与 DNMT 或 Tet1 融合, 即可实现对 DNA 甲基化修饰的修改, 即 Tet1 催化去甲基化, 激活目的基因表达, 而 DNMT 催化甲基化, 抑制基因表达。Liu 等^[40] 将 dCas9 分别与 DNMT3a 或 Tet1 融合, 在体内体外实验中均实现了对目的基因甲基化修改, 逆转了目的基因的表达。

LSD1 (lysine-specific demethylase 1) 是第一个被发现的组蛋白赖氨酸特异的去甲基化酶^[41], 它可占据基因的增强子而发挥转录抑制作用^[42]。将 LSD1 与 dCas9 融合即可实现目的基因的转录抑制作用^[43]。

HDAC3 属于组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 家族, 研究人员将 HDAC3 与 dCas9 融合, 发现靶向内源性的乙酰化位点的 sgRNA 对其转录抑制效率非常关键, 通过 sgRNA 靶向临近 H3K27ac 标记的位置可实现目的基因的转录抑制作用, 且转录抑制效率与 sgRNA 呈现剂量依赖效应^[44]。

2.3 可诱导的dCas9靶向基因调控系统

复杂的基因网络对于生物的生命周期至关重要, 如细胞编程、新陈代谢、昼夜节律等。建立可诱导的靶向基因编辑技术可帮助人们了解不同生命过程中特定基因的功能。CRISPR/Cas9 系统是一类非常强大的基因编辑工具。联合可诱导蛋白和 Cas9, 可实现对目的基因的时空特异性调控。目前发展起来的可诱导靶向基因激活技术主要是通过光诱导和化学药物诱导的, 即基于蓝光诱导的转录激活系统^[45-46]和基于雷帕霉素 (rapamycin) 诱导的转录激活系统^[47]。

蓝光诱导的靶向基因激活技术基于拟南芥中分离出来的隐花色素 (cryptochrome 2, CRY2) 及其结合配体 CIB1^[48]。两个研究组率先报道了这种蓝光诱导的 dCas9 转录激活系统。其中日本京都大学的研究者将 dCas9 与 CIB1 相融合构成基因组的锚定探针, 将 CRY2 的光裂合酶同源区 (photolyase homology region of CRY2, CRY2PHR) 和转录激活因子相融合, 形成激活探针^[45]。在蓝光照射下, CRY2PHR 和 CIB1 形成异二聚体, 并将转录激活因子携带到目的基因, 实现其转录激活作用。在其优化改造中, 研究者分别向其锚定探针和激活探针中加入了核定位信号 (nuclear localization signal, NLS), 发现 CIB1 的 C 端截短体 (C-terminal truncated, trCIB1) 与 dCas9 相融合 (NLS-dCas9-trCIB1) 并没有影响其转录激活效率, 激活探针中 NLSx3-CRY2PHR-p65 实现了最高的报告基因活性。随后将两者转入细胞中, 发现

其可在蓝光的诱导下实现报告基因和内源基因的激活, 而去除蓝光后可逆转对目的基因的激活, 从而实现目的基因的时空特异性调控^[45]。之后, 美国杜克大学的研究者报道了相似的光诱导 dCas9 转录激活系统^[46], 他们在 dCas9 的 N 端和 C 端同时融合 CIB1, 同时, 在 CRY2 上融合 VP64, 在蓝光诱导的作用下实现对内源基因的时空特异性调控, 研究者将其称为光激活的 CRISPR/Cas9 效应器 (light-activated CRISPR/Cas9 effector, LACE)。

雷帕霉素诱导的转录激活系统基于对 FKBP-rapamycin·FRB 复合物相互间亲和力的认识^[49]。FKBP-rapamycin 复合物与 FRB 高度亲和, 没有雷帕霉素的情况下, FKBP 与 FRB 不能相互作用^[49]。研究者将 dCas9 的 N 末端 (N) 通过 linker 与 FRB 相融合, 并在两端加上核输出序列 (nuclear export sequence, NES), 同时, 将 dCas9 的 C 末端 (C) 通过 linker 与 FKBP 相融合, 并在两端加上核定位序列 (nuclear localization sequences, NLS), 在该融合蛋白复合物中连接转录激活结构域 VP64 (图 4), 两者可在雷帕霉素的作用下相结合, 在 sgRNA 的引导下将转录激活因子带到目的基因的转录起始位点, 实现目的基因的时空特异性调控^[47]。需要指明的是, 研究人员在此使用的是 Cas9 的另一个突变体 N863A, 其作用与 H840A 无异^[13]。

3 CRISPR-dCas9靶向基因转录调控系统在遗传病研究中的应用

CRISPR/Cas9 系统由于产生 DNA 双链断裂而限制了其在临床治疗中的应用。而新出现的 CRISPR/dCas9 表观基因组修饰系统由于不会对基因组产生非预期的永久性突变, 但可以调控基因表达水平, 可成为遗传缺陷的治疗手段, 具有潜在的临床应用价值。已有研究人员将其应用于治疗人类遗传病的实验研究, 取得可喜的进展。

3.1 在杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy, DMD)研究中的应用

DMD 是常见的致死性遗传病, 呈 X 连锁隐性遗传, 患者一般在 20 岁左右因心力衰竭 / 呼吸衰竭



图4 雷帕霉素诱导的转录激活系统模式图^[47]

而死亡。该病的发生是由于 dystrophy 基因的功能丧失 (loss-of-function) 所致。由于 dystrophy 基因的编码区过长 (其 cDNA 大约为 14 kb), 通过传统病毒载体很难实现补充完整功能基因的基因治疗^[50]。通过对损伤的器官进行干细胞移植也不能实现有效的治疗^[51]。也有科学家利用 CRISPR/Cas9 直接去除突变的外显子以产生缩短的肌营养不良蛋白基因来治疗 DMD^[52-54], 但效果并不理想。有研究人员通过基于 CRISPR/Cas9 的靶向基因激活来补充 dystrophy (gain-of-function) 的表达^[55], 为 DMD 的治疗带来了新的思路。具体方法如下: 考虑到基因治疗的 AAV 病毒的容量, 研究人员对 SAM 系统进行了优化改造, 即通过靶向序列较短的 sgRNAs (14 nt 或 15 nt) 来引导野生型 Cas9 (而非 dCas9) 到目标基因座位点。研究显示, 将 sgRNA 中与靶序列配对的核苷酸由 20 个减少为 14 或 15 个能够介导有效的激活, 同时, 可抑制 Cas9 的核酸内切酶活性, 不能产生有效的 indels, 因此, 被称为致死性 sgRNAs (dead sgRNAs, dgRNAs)^[56-57]。同时, 研究人员对 dgRNAs 的骨架结构进行改造, 改变 MS2 茎环结构适配体骨架区的 G、C 含量, 确定了最优化的 dgRNA 骨架结构。通过 AAV 将 dgRNA 和 MPH (MS2-p65-HSF1) 分别进行包装, 共同转入 DMD 小鼠中, 可显著改善小鼠的肌肉功能, 有效缓解了 DMD 的症状。

3.2 在脆性X染色体综合征(FXS)研究中的应用

FXS 是造成男性智力缺陷的最常见遗传形式, 其在男性中的发病率为 1/3 600, 患者常伴有自闭症谱系障碍, 如智力、认知和社交障碍^[58]。该病是由 FMR1 基因编码的 FMRP (fragile X mental retardation protein) 的功能丧失所致。FMR1 基因的 5' 端有三核苷酸重复序列 (CGG)_n, CGG 重复序列的重复次数在人群中具有多态性, 正常人具有 6~50 个 CGG 重复序列, FXS 患者的 CGG 重复序列则达到 200~1 000, 当 CGG 重复序列大于 200 时, FMR1 基因的 5' 端发生高度甲基化, 形成异染色质, 造成 FMR1 基因的转录失活和沉默表达^[59]。FMRP 在神经元突触维持和可塑性中是必需的^[60-61], 使 FMR1 基因重新激活成为治疗 FXS 的策略^[62]。由于将 CGG 重复序列插入到小鼠 FMR1 基因中并不能复制出类似人类的 FMR1 高度甲基化和 FMR1 基因的沉默, FXS 患者来源的 iPSCs 因为可模拟 CGG 重复序列高度甲基化和 FMR1 基因的沉默而成为研究 FXS 的重要模型^[63]。CRISPR-Cas9 技术已被用于

缩短 CGG 重复序列, 进而使 FXS 患者来源的细胞正常表达 FMR1^[64-65], 但由于存在产生 DSB 带来的潜在风险而限制了其临床应用价值, 发展更好的靶向基因激活技术可能为 FXS 的治疗带来新的启发。麻省理工学院 Rudolf Jaenisch 领导的研究组通过 dCas9-Tet1 的方法将单个 sgRNA (靶向 FMR1 基因的 5' 端 CGG 重复序列处) 和 dCas9 导入患者来源的 iPSCs 中, 不仅使 CGG 重复序列发生低甲基化, 也逆转了其他表观遗传标记, 如 H3K27 的乙酰化增加, H3K9 的三甲基化减少, 使 FMR1 基因由转录抑制转化为转录激活, 重建了 FXS 患者来源的 iPSCs 中 FMRP 的表达^[66]。研究结果显示通过这种方法没有产生明显的脱靶作用。通过 Cas9 酶活性抑制剂 Acr II A4 抑制 dCas9-Tet1 的作用后, FMR1 的表达和启动子的去甲基化可维持至少两周。这说明在没有持续性 dCas9-Tet1 存在的情况下, 染色质的活化状态可持续存在。dCas9-Tet1 作用 iPSCs 后, 将其诱导为神经祖细胞后注射到出生后 1 d 的免疫缺陷小鼠脑中, 在其成长到 3 个月时发现分化的神经元中仍表达 FMR1, 表明这种活化状态可在体内稳定存在^[66]。

3.3 在色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa, RP)研究中的应用

RP 是一种遗传性视网膜营养不良的慢性眼病, 其在人群的发病率为 1/4 000, 致病机理表现为视杆细胞的渐进性退变, 随后引发视锥细胞的退化和死亡。临床表现为早期夜盲、视野向心性缩小, 最终呈管状视野, 双目失明或濒临失明, 在失明眼病中占有相当大的比例^[67]。受累患者中已发现有超过 200 个异质性的基因突变^[68], 很难通过传统的基因治疗对该病进行有效干预。研究显示: 发育中视杆细胞和视锥细胞的分化受到光感受器转录因子 Nr1 (neural retina leucine zipper gene, Nrl) 的调控, Nrl 在发育中作为细胞命运转换的开关, 打开 Nrl 的光感受器前体可分化为视杆细胞, 而关闭 Nrl 的光感受器前体则分化为视锥细胞^[68]。有研究报道敲除 Nrl 的视网膜中视锥细胞可长期存活, 外核层也得以保留, 仅在起始阶段出现了瞬间的细胞丢失^[69], 提示通过敲除 Nrl 对视杆细胞进行重编程可以治疗由视杆细胞基因突变引发的视网膜炎。相对于 CRISPR-Cas9 基因编辑系统, CRISPR-dCas9 转录调控系统可实现对目的基因的转录抑制, 且不会造成基因组的损伤修复, 带来未知风险的 indels。基于以上原理, 研究人员通过拆分 dCas9 方法, 构建

了转录抑制调控的两个 AAV 载体, 即 KRAB-N-dCas9 (1-573) 和 C-dCas9 (574-1398), 克服了 AAV 载体的容量限制, 并在载体 1 中插入 2 个靶向 Nrl 基因的 gRNA (图 5), 实现 gRNA 引导 dCas9 靶向 Nrl 的转录抑制调控。研究显示, 将包含上述载体的 AAV 注射到出生后 7 d 的 RP 小鼠模型的视网膜下空间, 可有效发挥对 Nrl 的转录抑制, 达到调控视杆细胞向视锥细胞的分化并实现治疗的效果, 6 周后的检测发现经过治疗的小鼠其视觉功能得到显著的改善^[70], 该研究为体内基因治疗提供了新的治疗策略, 具有潜在的临床应用价值。

4 展望

遗传病的产生多由于基因的功能丧失或功能获得所致。目前已报道的文献通过两种方法实现遗传病动物模型的治疗, 一种是通过生殖细胞进行基因组编辑, 另一种则是通过对体细胞进行基因组编辑, 然后将修正的细胞移植到疾病模型体内, 而第二种方法完全可以被 CRISPR-dCas9 表观基因组编辑所替代, 且新的方法不会产生 DSB 而带来潜在风险。因而, 相对于 CRISPR-Cas9 基因组编辑系统, CRISPR-dCas9 转录调控系统可在不改变基因组的情况下, 瞬时或稳定调控基因的表达, 为遗传病的研究领域和未来的临床治疗领域带来了新的思路。此外, 由于该系统提供了一种非常简单的修饰多基因的方法, 即导入针对不同基因的 sgRNA, 即可实现对多基因的表达调控, 因而在多基因遗传病的研究中具有重要的应用价值。

在将来的临床研究和应用中仍有一些问题需要深入探讨, 如 CRISPR-dCas9 转录调控系统的调控效率、脱靶效应、生物递送系统的安全性等问题。

研究人员在不同物种的细胞系中对比了多个目的基因中基础型转录激活系统 (VP64) 和增强型转录激活系统 (VPR、Sun Tag、SAM) 的转录激活效率, 发现增强型转录激活系统的效率优于基础型转录激活系统^[18]。更加高效的转录调控系统有待于深入探索。dCas9-表观遗传修饰系统因其可以调控染色质的水平而高效调控转录效率, 并且可以激活沉默基因的表达, 但通过 sgRNA 引导的 dCas9-表观遗传修饰酶能否特异性的靶向目的基因仍需要深入探索。可诱导的 dCas9 靶向基因调控系统可实现目的基因的时空特异性调控, 但如何有效地在体内发挥作用是值得进一步探讨的问题。

无论是 CRISPR-Cas9 基因组编辑系统, 还是 CRISPR-dCas9 转录调控系统, 脱靶效应及其产生的生物安全性问题是限制该技术应用的一个关键瓶颈。研究人员应用染色质免疫共沉淀及深度 DNA 测序的结果显示 dCas9 可结合到多个脱靶位点^[71-73], 但其作用效应却远远低于目的基因。这说明尽管 dCas9 可以错误结合到脱靶位点, 但仅有非常少的脱靶位点可以有效发挥作用, 并且脱靶效应与目的基因的特异性、sgRNA 的特异性以及特定的基因环境 (如染色质水平) 都密切相关。因而在具体的实验设计以及将来的临床应用中需全面考虑这些问题。

目前, 全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 研究鉴定了大量的疾病或性状相关的遗传变异体, 其中大约 93% 变异出现在蛋白质编码序列之外, 提示基因表达的异常调控和非编码 RNA 在疾病发生中发挥重要的作用。因而, 充分理解 CRISPR-dCas9 转录调控系统并利用它来纠正基因表达正成为具有前景的临床治疗遗传病的策略之一。

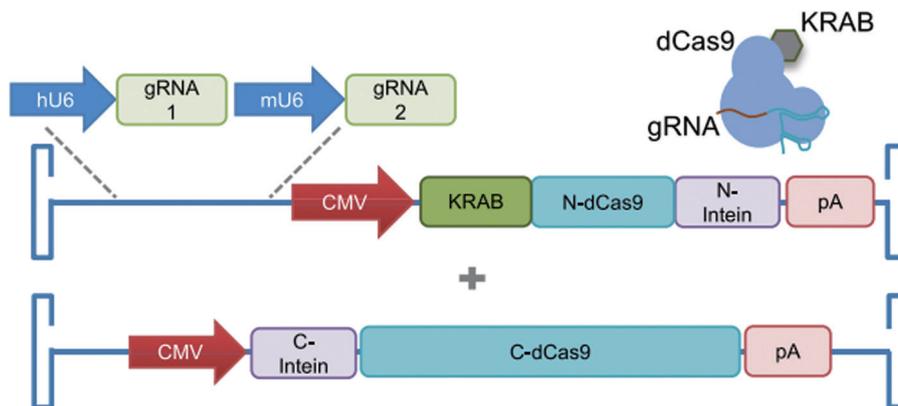


图5 发挥转录抑制调控作用的AAV载体组成^[70]

[参 考 文 献]

- [1] Saprunauskas R, Gasiunas G, Fremaux C, et al. The *streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: 9275-82
- [2] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [3] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols*, 2013, 8: 2281-308
- [4] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 230-2
- [5] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154: 1370-9
- [6] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [7] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10: 973-6
- [8] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [9] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17: 5-15
- [10] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152: 1173-83
- [11] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [12] Bikard D, Jiang W, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 7429-37
- [13] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156: 935-49
- [14] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583-8
- [15] Beerli RR, Segal DJ, Dreier B, et al. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the *erbB-2/HER-2* promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 14628-33
- [16] van Essen D, Engist B, Natoli G, et al. Two modes of transcriptional activation at native promoters by NF- κ B p65. *PLoS Biol*, 2009, 7: e73
- [17] Mali P, Aach J, Stranges PB, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 833-8
- [18] Chavez A, Tuttle M, Pruitt BW, et al. Comparison of Cas9 activators in multiple species. *Nat Methods*, 2016, 13: 563-7
- [19] Cheng A W, Wang H, Yang H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res*, 2013, 23: 1163-71
- [20] Perrin A, Rousseau J, Tremblay JP. Increased expression of laminin subunit $\alpha 1$ chain by dCas9-VP160. *Mol Ther Nucl Acids*, 2017, 6: 68-79
- [21] Gwack Y, Baek HJ, Nakamura H, et al. Principal role of TRAP/mediator and SWI/SNF complexes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA-mediated lytic reactivation. *Mol Cell Biol*, 2003, 23: 2055-67
- [22] Chavez A, Scheiman J, Vora S, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*, 2015, 12: 326-8
- [23] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159: 635-46
- [24] Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 2012, 489: 57-74
- [25] Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, et al. The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 1045-8
- [26] Hilton I B, D'Ippolito AM, Vockley CM, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 510-7
- [27] Snowden AW, Gregory PD, Case CC, et al. Gene-specific targeting of H3K9 methylation is sufficient for initiating repression *in vivo*. *Curr Biol*, 2002, 12: 2159-66
- [28] Maeder ML, Angstman JF, Richardson ME, et al. Targeted DNA demethylation and activation of endogenous genes using programmable TALE-TET1 fusion proteins. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1137-42
- [29] Mendenhall EM, Williamson KE, Reyon D, et al. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 1133-6
- [30] Rivenbark AG, Stolzenburg S, Beltran AS, et al. Epigenetic reprogramming of cancer cells *via* targeted DNA methylation. *Epigenetics*, 2014, 7: 350-60
- [31] Konermann S, Brigham MD, Trevino A, et al. Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature*, 2013, 500: 472-6
- [32] Keung AJ, Bashor CJ, Kiriakov S, et al. Using targeted chromatin regulators to engineer combinatorial and spatial transcriptional regulation. *Cell*, 2014, 158: 110-20
- [33] Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, et al. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 1996, 87: 953-9
- [34] Chen J, Li Q. Life and death of transcriptional co-activator p300. *Epigenetics*, 2011, 6: 957-61
- [35] Delvecchio M, Gaucher J, Aguilar-Gurrieri C, et al. Structure of the p300 catalytic core and implications for chromatin targeting and HAT regulation. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1040-4

- [36] Brocken D, Tark-Dame M, Dame RT. dCas9: a versatile tool for epigenome editing. *Curr Issues Mol Biol*, 2018, 26: 15-32
- [37] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002, 16: 6-21
- [38] Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, 2003, 33 Suppl: 245-54
- [39] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 204-20
- [40] Liu XS, Wu H, Ji X, et al. Editing DNA methylation in the mammalian genome. *Cell*, 2016, 167: 233-47
- [41] Shi Y, Shi Y, Lan F, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 2004, 119: 941-53
- [42] Whyte WA, Bilodeau S, Orlando DA, et al. Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2012, 482: 221-5
- [43] Kearns NA, Pham H, Tabak B, et al. Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat Methods*, 2015, 12: 401-3
- [44] Kwon DY, Zhao Y, Lamonica JM, et al. Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun*, 2017, 8: 15315
- [45] Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol*, 2015, 22: 169-74
- [46] Polstein LR, Gersbach CA. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 198-200
- [47] Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 139-42
- [48] Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA, et al. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2010, 7: 973-5
- [49] Banaszynski LA, Liu CW, Wandless TJ. Characterization of the FKBP·rapamycin·FRB ternary complex. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 4715-21
- [50] Janghra N, Morgan JE, Sewry CA, et al. Correlation of utrophin levels with the dystrophin protein complex and muscle fibre regeneration in duchenne and becker muscular dystrophy muscle biopsies. *PLoS One*, 2016, 11: e150818
- [51] Sienkiewicz D, Kulak W, Okurowska-Zawada B, et al. Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies. *Ther Adv Neurol Disord*, 2015, 8: 166-77
- [52] Long C, Amoasii L, Mireault AA, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 400-3
- [53] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, et al. *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, 351: 403-7
- [54] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J, et al. *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016, 351: 407-11
- [55] Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, et al. *In vivo* target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated *trans*-epigenetic modulation. *Cell*, 2017, 171: 1495-507
- [56] Dahlman Je AO, Joung JGJ, Zhang FKS. Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 1159-61
- [57] Kiani S, Chavez A, Tuttle M, et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression. *Nat Methods*, 2015, 12: 1051-4
- [58] Contractor A, Klyachko VA, Portera-Cailliau C. Altered neuronal and circuit excitability in fragile X syndrome. *Neuron*, 2015, 87: 699-715
- [59] Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, et al. Transcriptional reactivation of the FMR1 gene: a possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes*, 2016, 7: 49
- [60] Bassell GJ, Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron*, 2008, 60: 201-14
- [61] Schaeffer C, Beaulande M, Ehresmann C, et al. The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links. *Biol Cell*, 2003, 95: 221-8
- [62] Tabolacci E, Palumbo F, Nobile V, et al. Transcriptional reactivation of the FMR1 gene. A possible approach to the treatment of the fragile X syndrome. *Genes (Basel)*, 2016, 7: 49
- [63] Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, et al. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6: 407-11
- [64] Park C, Halevy T, Lee DR, et al. Reversion of FMR1 methylation and silencing by editing the triplet repeats in fragile X iPSC-derived neurons. *Cell Rep*, 2015, 13: 234-41
- [65] Xie N, Gong H, Suhl JA, et al. Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-mediated deletion of the expanded CGG-repeat of the fragile X chromosome. *PLoS One*, 2016, 11: e165499
- [66] Liu XS, Wu H, Krzisch M, et al. Rescue of fragile X syndrome neurons by DNA methylation editing of the FMR1 gene. *Cell*, 2018, 172: 979-92
- [67] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 2006, 368: 1795-809
- [68] Montana CL, Kolesnikov AV, Shen SQ, et al. Reprogramming of adult rod photoreceptors prevents retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 1732-7
- [69] Roger JE, Ranganath K, Zhao L, et al. Preservation of cone photoreceptors after a rapid yet transient degeneration and remodeling in cone-only *Nrl^{-/-}* mouse retina. *J Neurosci*, 2012, 32: 528-41
- [70] Moreno AM, Fu X, Zhu J, et al. *In situ* gene therapy via AAV-CRISPR-Cas9-mediated targeted gene regulation. *Mol Therapy*, 2018, 26: 1818-27
- [71] Kescu C, Arslan S, Singh R, et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 677-83
- [72] Wu X, Scott DA, Kriz AJ, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 670-6
- [73] O'Geen H, Henry IM, Bhakta MS, et al. A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: 3389-404