

DOI: 10.13376/j.cblls/2022137

文章编号: 1004-0374(2022)10-1227-13



李劲松, 中国科学院院士, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心(生化与细胞所)研究员, 细胞生物学国家重点实验室主任。1993年毕业于江西农业大学, 获学士学位; 1996年毕业于扬州大学, 获硕士学位; 2002年毕业于中国科学院动物研究所, 获博士学位; 2002—2007年, 在洛克菲勒大学从事博士后研究; 2007年8月起任生化与细胞所研究员; 2021年被增选为中国科学院院士。李劲松博士主要从事干细胞与胚胎发育相关研究。率领团队建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“类精子干细胞”), 证明其能代替精子使卵子受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用类精子干细胞携带 CRISPR-Cas9 文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 基于此, 提出并推动基于类精子干细胞技术的基因组标签计划。研究成果于2011年和2012年入选“中国科学十大进展”。以第一作者或通讯作者身份在 *Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Nature Cell Biology* 等杂志发表60余篇研究论文。入选中科院“百人计划”、国家杰出青年科学基金、中青年科技创新领军人才、国家百千万人才工程、中组部“万人计划”。

类精子干细胞介导的遗传改造

杨振华¹, 李劲松^{1,2,3,4*}

(1 上海科技大学生命科学与技术学院, 上海 201210; 2 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海市分子男科学重点实验室, 细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031; 3 中国科学院大学, 北京 100049; 4 中国科学院大学杭州高等研究院生命科学学院, 杭州 310024)

摘要: 在基因编辑领域, 以 CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) 为代表的技术的广泛应用, 使得科学家能快速、高效、精确地对靶基因序列进行遗传改造。但是, 由于包括人类在内的真核细胞二倍性的特点, 要获得纯合编辑的细胞系和模式动物仍需大量的时间和人力成本。类精子干细胞(DKO-AG-haESCs)系统的建立及其与 CRISPR-Cas9 技术的结合则可以快速地在基因、染色体等水平上进行任意遗传操作并转化为动物个体, 实现疾病模拟。本文将对类精子干细胞介导的遗传改造进行总结和讨论。

关键词: 基因编辑; 类精子干细胞; 疾病模拟; 基因组标签计划; 染色体改造

中图分类号: Q343; R-332 **文献标志码:** A

Sperm-like stem cell-mediated genome editing

YANG Zhen-Hua¹, LI Jin-Song^{1,2,3,4*}

(1 School of Life Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China; 2 State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4 School of Life Science, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China)

收稿日期: 2022-06-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31821004, 32030029, 31730062)

*通信作者: E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

Abstract: The extensive application of technology represented by CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9), make the genetic modification more efficient. However, it remains a laborious endeavor to obtain homozygous gene-edited cell lines and model animals because of the diploidy of human cells and model organisms. The establishment of sperm-like stem cells (DKO-AG-haESCs) and its combination with CRISPR-Cas9 technology can rapidly transform genetic operation at the gene level and chromosome level into animals so that we can realize disease simulation. Here, we will summarize the sperm-like stem cells mediated gene editing.

Key words: gene editing; sperm-like stem cells; disease simulation; genome tagging project; chromosome modification

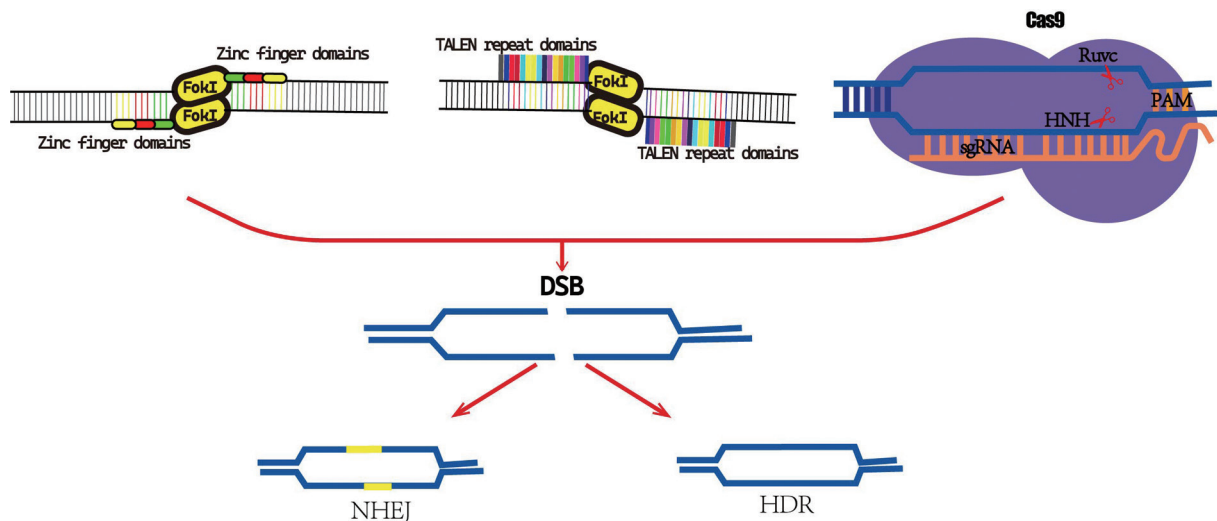
1 基因编辑技术简介

1.1 基因编辑技术的发展与应用

早期, 科学家利用同源重组 (homologous recombination) 介导的基因打靶技术对基因组进行编辑和改造。自 1987 年 Smithies 和 Capecchi 实验室分别利用基因打靶技术获得基因编辑的小鼠胚胎干细胞 (ESCs)^[1-2] 以来, 基因编辑技术迅速发展。为了克服基因打靶技术效率低下^[3-4] 的问题, 研究人员开发出了由核酸内切酶介导的基因编辑技术——锌指核酸内切酶^[5-7] (zinc finger nucleases, ZFNs) 和类转录激活因子效应物核酸酶^[8] (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), 但是两者依旧存在效率低、成本高、操作繁琐等弊端^[9]。直到 2012 年, 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) 基因编辑系统横空出世^[10-13] (图 1), 真正实现了高效率、低

成本的靶基因敲除、敲入、点突变等遗传操作, 吸引了全世界的科研人员迅速将其大规模地应用到基因编辑领域中。

特别是自张锋实验室 2013 年的研究证实了 CRISPR-Cas9 系统可以在哺乳动物细胞中应用^[12] 以来, 基于此系统的重要研究成果层出不穷。研究人员充分发挥创造力, 在传统 CRISPR-Cas9 系统的基础上开发了一系列衍生工具, 极大地推动了生命科学领域的研究进程。研究发现, Cas9 的 RuvC 和 HNH 是其重要的酶活结构域^[10]; 同年, Qi 等^[13] 将上述两个结构域失活得到了无切割活性的 dCas9 (dead Cas9), 其与 gRNA (guide RNA) 共表达得到的 CRISPRi (CRISPR interference) 系统可以有效地抑制目标基因在大肠杆菌和真核生物^[14] 中的表达。类似地, dCas9 与 VP64 等转录激活元件结合构成的 CRISPRa (CRISPR activation)^[15-17] 系统可以有效地实现对内源目的基因的激活表达; 与 DNA 甲基



从左到右依次是ZFNs、TALENs、CRISPR-Cas9。三种方法都可以实现特定区域的双链DNA断裂, 然后借助细胞内的不同修复方式实现靶位点的基因编辑。

图1 基因编辑领域使用的编辑工具

化酶的偶联实现了对表观遗传修饰的精准干预^[18]; 与胞嘧啶脱氨酶^[19]以及尿嘧啶糖基化酶抑制剂^[20]共同作用, 可以对单个碱基进行定向且高效的替换。dCas9 的另一个广泛应用是与不同荧光蛋白融合表达以实现目标基因的精确定位^[21-22]。2015年, Moritoshi Sato 教授开创性地将光遗传学与 Cas9 结合^[23-24]应用, 利用光照和一种“磁蛋白”实现了对 Cas9 蛋白活性的可逆控制, 进一步拓宽了 CRISPR-Cas9 技术在基因编辑领域的应用。

CRISPR-Cas9 系统操作简便, 使高通量的基因编辑和筛选成为可能。理论上来说, 只需设计靶向不同基因的 gRNAs, 进一步结合测序技术便可实现对全基因组的编辑和筛选^[25-26]; 另外, 在免疫细胞疗法研究中, Cas9 编辑的 CAR-T 细胞也极大地提高了该方法的有效性^[27-28]; 此系统与干细胞研究、显微操作技术^[29-30]以及 AAV 病毒结合应用^[31]可以获得各种动物疾病模型, 以帮助人们更好地实现疾病模拟和治疗^[32]研究; 随着组织工程技术的进步, 研究人员可以在体外构建各种类器官^[33-34], 在类器官的研究中, CRISPR-Cas9 技术也发挥了巨大的作用。例如, 2015年 Freedman 实验室在源自患者的诱导多功能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 的基础上借助 CRISPR 技术培育出肾脏类器官, 并进行了多囊性肾病 (polycystic kidney disease, PKD) 的研究^[31]。此系统及其衍生系统操作简单、在多种模式动物和人类细胞中均具有高效性等特点极大地促进了生命科学领域的发展, 也使得该技术成为了最年轻的诺奖技术。

1.2 CRISPR-Cas9 技术的局限性

即便 CRISPR-Cas9 在如今的生命科学研究中已经几乎完全取代了其他的基因编辑技术, 该技术本身在实际应用中也存在一定的缺点和局限性。

首先, 此系统需要设计恰当的 sgRNA, 但并不是所有位点都有合适的 PAM 序列能够满足设计需求; 其次, 脱靶切割^[35]可能会引入非目的突变甚至是大范围的基因组缺失或重排, 最终导致动物的癌症或植物的不良表型^[36], 这也是此系统临床应用的一个巨大阻碍; 再次, 不论是病毒感染或脂质体介导的细胞转染, Cas9 编辑系统在细胞或组织中的递送效率均不能得到保证。另外, 在对哺乳动物等二倍性基因组进行遗传改造时, CRISPR-Cas9 容易造成杂合编辑, 而有些基因的显性拷贝会使隐性突变无表型, 这在一定程度上阻碍了细胞水平上大规模的遗传筛选研究; 而且, 直接利用此系统获

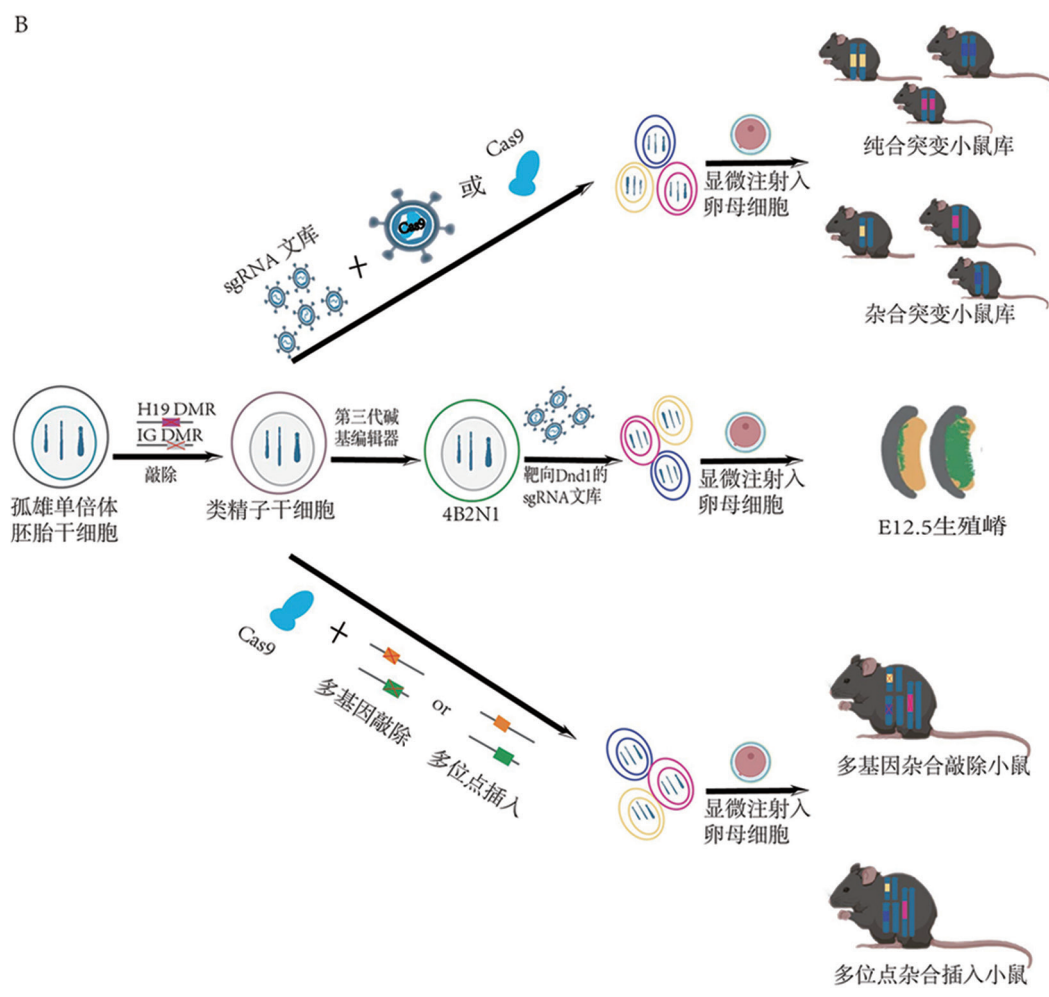
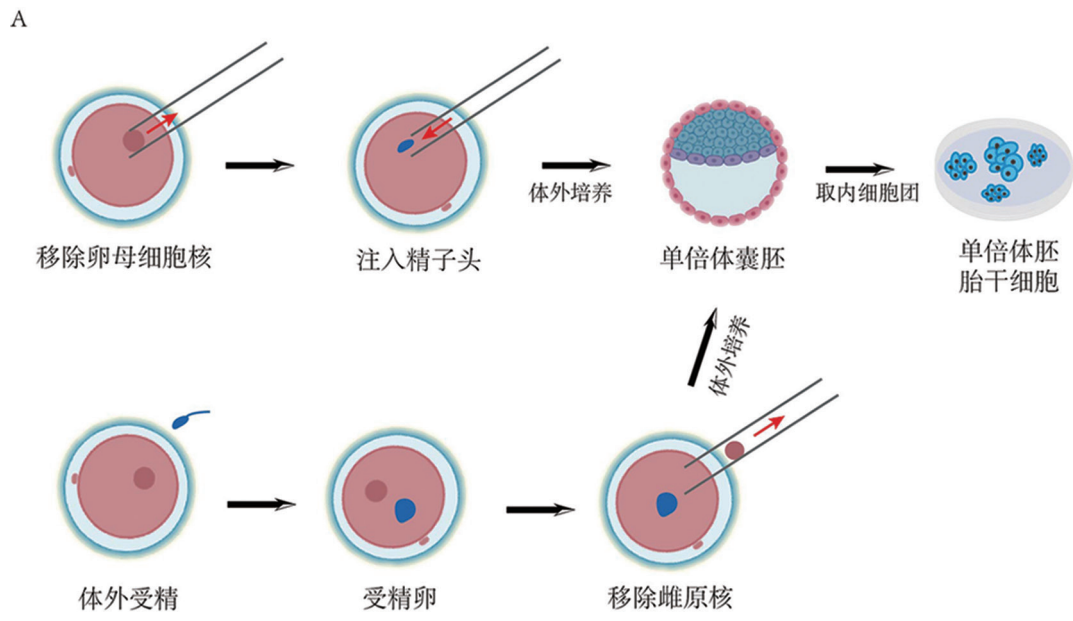
得的动物模型往往是基因型不明确的个体, 大部分是嵌合个体, 因此在模拟多基因突变的疾病模型时需要漫长且繁杂的交配和基因型鉴定过程。上述问题均阻碍了 CRISPR-Cas9 系统在遗传改造中的应用, 也在一定程度上影响了基因编辑领域的研究。

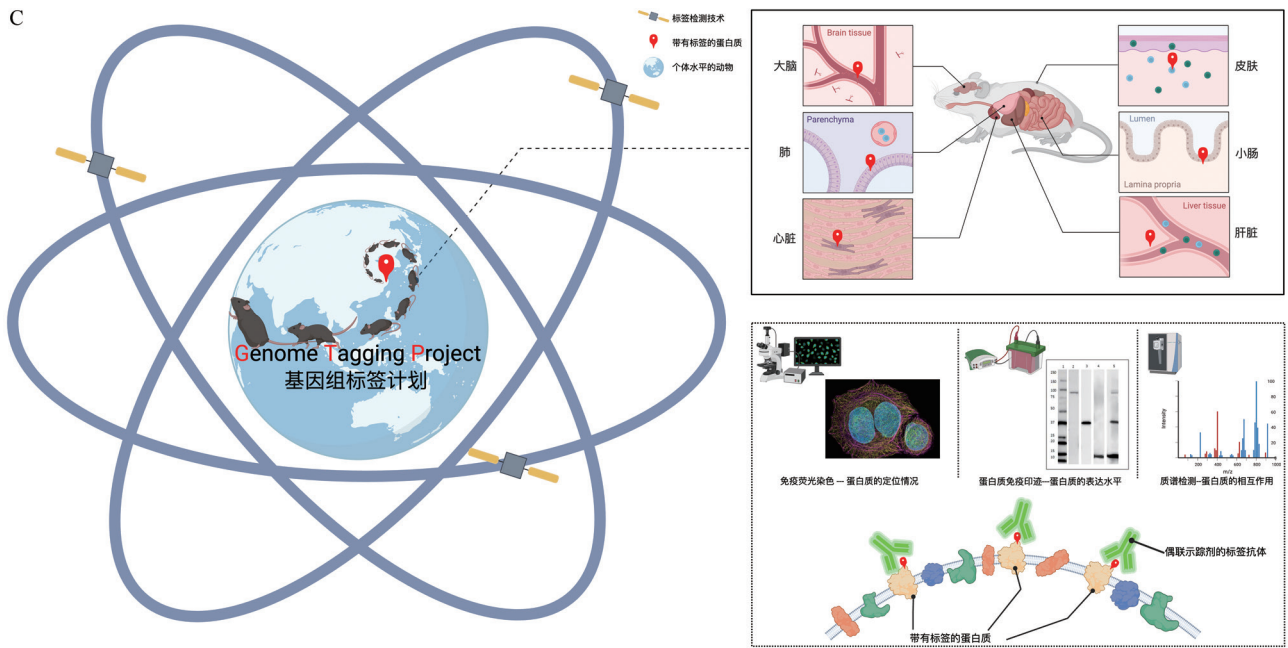
2 类精子干细胞

2.1 类精子干细胞的建立

CRISPR-Cas9 作为基因编辑领域中的明星系统几乎可以解决基因编辑过程中的绝大部分问题, 但在实际应用中不可忽视的一点则是大部分模式生物和人类基因组的二倍性特征使获得纯合编辑个体存在难度, 阻碍了基因功能的研究和复杂动物模型的快速获得。而单倍型的生殖细胞难以在体外进行传代培养和编辑, 于是科学家开始着手建立单倍/近单倍型的细胞进行编辑研究。研究人员先后利用紫外辐射精子^[37]和显微操作^[38]的方法得到了青鳉鱼和豹蛙等低等脊椎动物来源的单倍体细胞, 并在 2004 年利用斑马鱼的单倍体胚胎进行了遗传筛选^[39]。在哺乳动物中, 近单倍体细胞被从一些癌细胞中建立得到^[40-41], 但由于其是近单倍体且来源于癌细胞, 极大地限制了其广泛应用。令人兴奋的是, 2011 年, Leeb 和 Wutz^[42]成功利用孤雌激活得到了孤雌单倍体胚胎干细胞, 并在此细胞上进行了正向遗传筛选; 同年, Elling 等^[43]也成功建立了小鼠孤雌来源的单倍体胚胎干细胞 (parthenogenetic haploid embryonic stem cells, PG-haESCs)。

2012 年, 李劲松^[44]和周琪^[45]实验室 (图 2A) 先后利用显微操作结合流式富集的方法成功建立了精子来源的小鼠单倍体胚胎干细胞 (androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)。特别是前者的研究证实, AG-haESCs 可以代替精子通过胞浆注射 (intracytoplasmic AG-haESCs injection, ICAHCI) 得到正常且具有生育能力的个体——半克隆 (semi-clonal, SC) 小鼠, 且支持初步的遗传改造。在此基础上, 他们利用 CRISPR-Cas9 技术敲除了 AG-haESCs 中的 H19 和 IG 两个差异甲基化区域 (differentially methylated region, DMR) (图 2B), 进一步将 SC 小鼠的出生效率提高到 22.3%, 接近球形精子注射的出生效率, 且幼仔几乎都能存活并具有正常生殖能力, 他们将由此获得的双敲细胞 (double knockout, DKO) 命名为类精子干细胞^[46]。实验证明, DKO-AG-haESCs 支持 CRISPR-Cas9 介导的多位点基因敲除和插入以及大规模的遗传筛选, 再借助 ICAHCI





(A)孤雄单倍体胚胎干细胞的建立。(B)在AG-haESCs细胞系上通过双敲H19和IGF2 DMR得到可以高效获得半克隆小鼠的类精子干细胞: 上面为利用类精子干细胞进行细胞和个体水平的大规模遗传筛选; 中间为结合碱基编辑器进行点突变的筛选; 下面为利用类精子干细胞一步得到多位点编辑的小鼠模型。(C)全基因组蛋白质标签计划的应用。

图2 类精子干细胞的建立及应用

技术便可以一步获得携带目的修饰的 SC 模型小鼠。此项技术的诞生也使得哺乳动物细胞和个体水平的大规模遗传改造成为可能。

2.2 类精子干细胞的应用

2.2.1 基因组标签计划(Genome Tagging Project, GTP)

人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 始于 1990 年结束于 2004 年。随着技术的发展, 科学家得到了更加完整精确的人类基因组图谱^[47-48], 虽然此项工作花费了巨大的人力物力财力, 但其是生命科学研究领域中极具里程碑意义的工作。现在后基因组时代的一个重要任务是阐明蛋白质在细胞内的相互作用和动态变化过程。然而, 蛋白质特异性抗体的效果并不总是令人满意, 这在很大程度上阻碍了蛋白质功能的研究, 解决此问题的一个方法便是通过基因编辑给蛋白质的编码基因带上标签, 如绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 和血凝素 (hemagglutinin, HA), 这样就可以利用成熟且高度特异的 GFP/HA 抗体来可视化目的蛋白^[49-50]。

基于同源重组和细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 的蛋白质标记已经成功地用于酵母^[51]、线虫^[52] 和果蝇^[53] 等基因组较小的物种的蛋白质功能研究中, 但是 BAC 方法的随机插入特性很难应用于哺乳动物 (如小鼠) 的全基因

组中。另一方面, 哺乳动物染色体的二倍性也使得借助基因编辑技术获得原位标记的纯合标签细胞和小鼠的难度大大增加。

而小鼠类精子干细胞系统的建立可以很好地解决上述问题, 由于其单倍体的特性, 借助基因编辑技术可以快速获得定点插入标签的胚胎干细胞系而不需考虑杂合问题。理论上来说, 类精子干细胞和 CRISPR-Cas9 技术的结合可以构建小鼠全基因组蛋白质标签细胞, 得到全基因组蛋白质标签干细胞库, 进一步结合显微操作技术并进行两次配繁便可高效获得纯合的标签小鼠, 快速地实现在细胞和个体水平上的基因功能研究。类精子干细胞可以在体外进行长期稳定的传代培养, 使得研究人员能够灵活地选择合适的标签插入方法和插入位置来进行相关基因的研究; 再者, 蛋白质标签小鼠可以根据需要随时得到, 因此, 这是一种省时省力省空间的方法, 能够合理快速地获得基因组标签小鼠。在 2017 年 5 月上海生物化学与细胞生物学研究所 (Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, SIBCB; 现为中国科学院分子细胞科学卓越创新中心: Center for Excellence in Molecular and Cellular Sciences, Chinese Academy of Sciences) 举办的分子细胞科学研讨会上, 利用类精子干细胞获得全基因组蛋白质标签小鼠的计划

被正式命名为“基因组标签计划”(GTP)^[54](图2C),旨在利用类精子干细胞对小鼠全基因组进行标记,并高效产生用于研究的细胞系和模式小鼠,加快基因功能研究。迄今为止,GTP项目已经成功产生1 947个标签细胞系和360个标签小鼠,应用到国内外70余个实验团队。此技术的成功应用也将为疾病研究和药物研发开拓更广阔的空间。

2.2.2 细胞和个体水平的大规模遗传筛选

在反向遗传学研究中,大规模遗传筛选是非常必要的;通常采用的RNA干扰(RNA interference, RNAi)^[55]和慢病毒携带sgRNA文库^[56]的方法较难做到大规模靶向,并且存在产生突变小鼠效率低的问题,难以实现大规模的在体遗传筛选。于是科学家将类精子干细胞和CRISPR-Cas9两大利器结合起来,极大地促进了大规模遗传筛选的研究。

类精子干细胞技术在建立之初便被证实可以很好地应用于正向和反向遗传筛选研究中。2015年,钟翠青等^[46]证实可以利用CRISPR-Cas9技术在类精子干细胞中进行*Tet1*、*Tet2*、*Tet3*的多重敲除和定点插入;进一步地,他们将携带靶向19 150个小鼠蛋白质编码基因的87 897个sgRNA文库的类精子干细胞和Cas9 mRNA注射入卵母细胞后一步获得了纯合编辑的小鼠(图2B)。为了提高效率,研究人员优化了类精子干细胞中sgRNA文库的携带方法:他们利用慢病毒感染的方式使细胞中持续表达sgRNA和Cas9,由此得到的类精子干细胞进一步结合显微注射介导的半克隆技术,首次实现了大规模个体水平遗传筛选,ICAHCI得到的SC小鼠中有42%携带了纯合的编辑^[57]。2019年,研究人员也利用类精子干细胞与慢病毒文库实现了与骨骼发育相关基因的大规模在体筛选,并确定了*Rln1*和*Irx5*两个新的候选基因^[58]。CRISPR-Cas9是通过在DNA上引入双链断裂(double strand break, DSB)后借助细胞内的修复机制达到基因编辑的目的,因此某些时候也会引入非必要的突变。为了减少副产物的产生或对蛋白质的特定氨基酸功能进行研究,科学家在CRISPR-Cas9系统的基础上开发出碱基编辑器(base editor, BE),可以根据需要仅仅对某个目的碱基进行定向突变^[59]。碱基编辑器和类精子干细胞的结合也在小鼠个体水平上成功从77个DND1的候选点突变中筛选确定了4个对小鼠原始生殖细胞(primordial germ cell, PGC)发育至关重要的功能氨基酸位^[60](图2B)。

总而言之,类精子干细胞和CRISPR-Cas9的

强强联合使得在小鼠个体水平的大规模遗传筛选成为可能,极大地推动了反向遗传筛选的研究进程。

2.2.3 一步获得疾病小鼠模型

在生物学研究中获得点突变或者基因编辑的小鼠模型是至关重要的。以往的研究中确实可以通过向受精卵中注射Cas9 mRNA和sgRNA单链一步获得基因编辑的小鼠^[61-62],但是,此方法导致的嵌合体 and 引入不明确突变的问题也在一定程度上阻碍了进一步的研究。类精子干细胞系统具有可以在体外稳定长期培养、仅有一套染色体更容易进行编辑、具备发育全能性的优势,这无疑从新的角度提供了解决问题的方法。此系统已被证明可以直接利用编辑之后的DKO-AG-haESCs借助ICAHCI高效产生*Tet1*、*Tet2*、*Tet3*同时敲除或eGFP定点插入的杂合SC小鼠^[46],魏磊鑫等^[63]在2017年的工作也表明,在类精子干细胞上进行编辑时利用1.0~1.5 kb的点突变双链作为修复供体可以高效获得携带杂合点突变的SC小鼠。

多基因复杂疾病的研究对科研人员来说一直是巨大的挑战,因为导致疾病的基因有多个,在构建小鼠模型时,往往仅其中一个基因的突变或者几个基因的杂合突变并不能很好地模拟人类的疾病表型。利用传统方法构建单基因纯合突变的小鼠模型便需要耗费大量的时间和精力,更何况同时构建多个基因同时突变的小鼠模型。但是,利用类精子干细胞即可以高效、快速地达到此目的(图2B)。类精子干细胞可以在体外长期稳定培养,科研人员便可以在细胞水平上对目的基因进行多次编辑,而细胞水平的编辑和基因型鉴定相对来说更加快速和简便,直到获得正确的多基因编辑的细胞系后再结合ICAHCI技术便可一步得到多位点编辑的小鼠模型。2019年,尹奇等^[64]结合类精子干细胞和基因编辑技术一步产生了携带多基因杂合突变的小鼠,模拟多基因剂量下调,成功再现了I型强直性肌营养不良(myotonic dystrophy type 1, DM1)的复杂表型;2020年,汪凌波等^[65]结合半克隆和CRISPR-Cas9技术首次针对女性苗勒管发育不良(Müllerian anomalies, MA)开展研究,在快速构建了两组双基因突变小鼠模型后确定“*Gen1+Wnt9b*”组合突变可以导致小鼠MA,为此疾病的遗传咨询和筛查提供了重要的理论指导。

综上,类精子干细胞系统的建立成功解决了科研人员在基因编辑研究中的诸多困难,特别是其结合CRISPR-Cas9和sgRNA文库能一步产生多基因

突变的 SC 小鼠的特性, 使筛选从细胞一步延伸到小鼠个体, 极大地节约了科研人员的时间和精力, 促进了蛋白质动态研究以及在体大规模遗传筛选、构建复杂疾病模型等小鼠个体水平的相关研究。

3 基于类精子干细胞的染色体工程

3.1 染色体结构变异

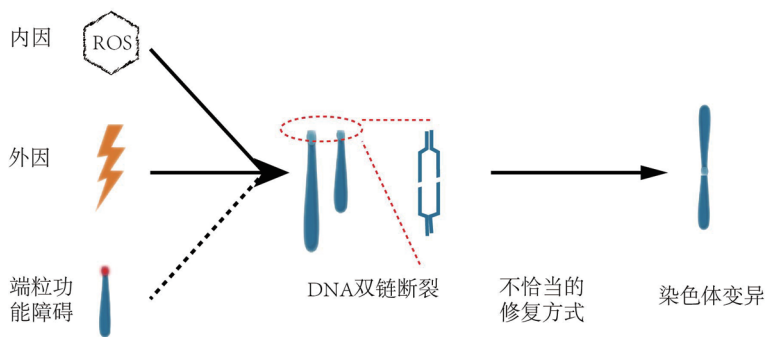
真核生物拥有复杂的细胞结构, 由于诸多内外界因素的作用, 细胞内遗传物质会发生改变, 其中单个核苷酸改变导致的基因突变是引起细胞和个体表型改变的最主要因素。但是, 有些情况下外界刺激也会导致整个基因组 3D 结构的变化, 产生染色体变异。与基因突变不同的是, 染色体变异通常是不当的 DSB 修复造成的^[66]。细胞内源性因素^[67](活性氧、不恰当修复的单核苷酸病变、未修复的单链断裂、DNA 复制应激、减数分裂和淋巴细胞中的自我诱导等) 和外源性因素^[68](化学诱变剂、电离辐射等) 均可造成 DSB (图 3)。不同类型的染色体变异对细胞及个体的影响差异极大, 有些在亲本或者细胞中没有明显表型, 甚至能够遗传下去, 有些则会直接导致细胞、个体的死亡或流产。

宏观上来说染色体变异分为结构变异 (structure variations, SVs) 和数目变异 (number variations, NVs)。除了 DSB 诱因之外, 端粒功能障碍也会诱发 SVs^[69]。在 DNA 复制过程中, 丢失端粒的染色体被错误识别为 DSB, 细胞利用自身修复机制造成染色体端粒与端粒之间的融合, 从而产生双臂染色体 (图 3), 罗氏易位 (Robertsonian translocation, Rob) 便是其中一个典型的例子。另外一种结构变异的类型是环状染色体, 这种多在双臂染色体上发生的 SV 几乎在人类所有染色体中都有发现, 在新生儿中的发

病率约为 1/50 000。研究认为, 环化染色体是由于染色体双臂的端粒或远端区域断裂 - 融合形成的, 随后, 取代了正常染色体的环状染色体可能会因为分裂的不稳定性而在携带者体内呈现一种动态嵌合的特点, 携带者的表型通常是由于环的分裂不稳定或者染色体片段的缺失造成的^[70]。环状染色体在结构上也分为两种: 染色体双臂端粒之间融合而不丢失遗传物质的完整环染色体, 或通过一次或多次断裂 - 融合造成的染色体末端或中间缺失和重复的不完整环状染色体。由有丝分裂检查点信号减弱、染色体内聚力或附着缺陷以及多极纺锤体形成等因素导致的染色体的不均等分裂则会产生异倍体, 最终导致 NVs。

3.2 染色体变异的影响

染色体变异通常与诸多罕见病、癌症以及进化遗传学和临床上的流产、出生后缺陷有密切联系^[71], 研究指出, 每 160 个新生儿中便有 1 人是染色体变异的携带者^[72]。某些情况下, 由于 SVs 影响了 DNA 的高级结构, 如拓扑结构 (topologically associating domains, TADs), 从而可以在不改变基因拷贝数的情况下改变基因的表达水平^[73]; 也正是由于高级结构的存, SVs 会在基因组大范围内产生影响^[74]。除了散发型染色体微缺失综合征和孟德尔病 (Mendelian disease), 许多常见的复杂疾病, 包括自闭症^[75]、精神分裂症、传染病和与健康相关的代谢疾病^[76]以及不孕不育^[77]都可能与染色体变异有关。特别是近年来在多种癌症中都陆续发现了染色体结构变异, 如原发性和与治疗相关的急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 以及骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 中常伴随有 SVs。除常染色体外, 人和小鼠的性染色体也有 SVs^[77-78],



端粒功能障碍导致细胞将端粒处错误识别为DSB, 可能会导致染色体的罗氏易位。图中只举例给出了一种导致染色体变异的DSB位置以及错误修复后的结果。

图3 染色体变异的诱因及过程

通常性染色体相关的 SVs 在个体上无明显表型，但是会影响个体的生育能力或者在子代中致病。除了较单一的 DSB 导致的染色体重排外，SVs 还可能涉及一条、两条或多条染色体，多次重排相互关联相互依赖，但通常不是一次性发生的^[79]，如前列腺癌、淋巴恶性肿瘤和甲状腺癌^[80]中的 SVs。虽然 SVs 与多种疾病的发生有关，但是也存在个体甚至群体都表现正常且能正常遗传的结构变异，比如自然界中存在的小鼠的罗氏易位。

三体或单体是最常见的 NVs^[81]，临床上公认的自然流产中有 35% 是三体或单体导致的，死产中三体或单体占 4%，而新生儿中约有 0.3% 为非整倍体^[82]。即便能出生并存活，携带 NVs 的个体也存在各种严重疾病，比如唐氏综合征 (Down syndrome, DS)、爱德华氏综合征 (Edwardrs syndrome)、帕陶氏综合征 (Patau syndrome)、克氏综合征 (Klinerfelter syndrome, KS)、特纳综合征 (Turner syndrome, TS) 等。其中 KS (代表性核型为 47, XXY) 占新生儿比例的 1/660，DS (21 三体综合征) 占新生儿比例的 1/800^[72]。发病率较高的 KS 的诊断和并发症的预防和治疗一直是一个挑战，除了不育这一经典临床表型外，KS 患者还有很多并发症，比如静脉曲张、自身免疫疾病、生殖细胞瘤、心血管疾病^[83]和一些女性中常见的乳腺癌和骨质疏松^[84]等。

3.3 染色体工程

随着科学研究的进步和对染色体高级结构认识的提升，科学家们越来越多地意识到，与单个基因突变相比，染色体的大片段变异在更大程度上与人类的进化、个体间遗传多样性等现象有关。很多情况下，染色体变异，特别是 SVs，对人类的进化和遗传多样性可能有积极的作用^[85-86]。目前研究染色体变异的主要方式是通过高通量测序对比患者和正常人的基因表达谱等来预测可能的基因型-表型关联性^[87-89]，但是测序方法的局限性在于能利用的样本量过少、取样大多为血液样本，各测序研究结果存在较大差异等。于是，科学家们致力于通过已有的基因操作方法实现对同种或异种染色体进行删除、添加、易位等改造，这就是染色体工程。

最初研究人员利用 Cre-loxp 系统进行特定位点的遗传操作，得到了 chr15 和 chr12^[90]以及 chr2 和 chr13^[91]部分易位的小鼠 ES 细胞系等；1997 年，Lewandoski 和 Martin^[92]通过将 Y 染色体上携带 loxp 的雄鼠与转基因的 Cre 雌鼠进行交配，得到了 XO 的小鼠。复制起始位点、着丝粒和两个端粒的

存在即可使染色体维持稳定的有丝分裂这一发现促进了人工染色体 (artificial chromosomes, ACs) 技术的发展，前人利用人类人工染色体 (human artificial chromosomes, HACs) 技术成功得到了含有人类染色体大片段且能在小鼠繁殖过程中稳定遗传的转染色体 (transchromosomal, Tc) 小鼠^[93-94]，随后科学家又利用小鼠自身染色体片段为载体得到小鼠人工染色体 (mouse artificial chromosomes, MACs)，MACs 可以在小鼠繁殖过程中更高效地保留在小鼠各个组织器官中，从而更好地实现相关疾病模型的建立^[95-96]。染色体工程的相关研究与基因编辑技术的发展关系紧密，与 ZFNs 和 TALENs^[97]相比，CRISPR-Cas9 技术的独特优势也为进展缓慢的染色体工程研究带来了新的曙光，当下已有诸多基于此技术的染色体改造研究。在体外，研究人员已经可以基于此系统实现多种癌症相关染色体易位^[98-99]以及大片段染色体的高效删除、倒位^[100]和插入^[101]等遗传操作。

另一方面，为了更好地了解染色体相关疾病的发病机制和研究治疗方法，建立动物模型是至关重要的，但是构建染色体变异小鼠模型的研究进展缓慢，除了利用病毒作为递送载体获得特定细胞类型或组织改造的动物模型^[102-104]外，目前只能通过胚胎嵌合^[105-107]和冗长的多代配繁^[108-109]的方法建立得到可遗传的动物模型，耗时耗力。因此，目前缺乏一套便捷简单的方法来构建染色体变异动物模型以便对此领域进行深入全面的研究。

3.4 基于类精子干细胞的染色体改造

在基因编辑领域，CRISPR-Cas9 和类精子干细胞技术的结合极大地促进了研究进展，那么两者的搭配是否也能为更大尺度上的染色体结构变异研究带来新的研究思路和方法呢？

小鼠作为生物学研究的重要模式动物，其染色体除 Y 为近端着丝粒外，其他 39 条染色体全为端着丝粒染色体^[110]。有趣的是，研究发现自然界中存在多种发生染色体结构变异的小鼠品系，且在长久的品系形成过程中不同核型的品系似乎对不同的环境表现出差异适应性。但是目前为止，除了自然界中存在的以及少数通过复杂且漫长人工配繁得到的 SV 小鼠品系外，缺乏规模化且遗传背景清晰的携带染色体结构变异的模式小鼠用来进行染色体变异的相关研究；而且，由于从患者体内分离得到的环状染色体体外培养的不稳定性，针对环状染色体的研究更是缺乏细胞和动物模型。另一方面，有关染色体数目变异的研究目前主要集中在对临床病例

的观察和测序上, 当然, 也有报道^[72, 111]利用育种的方法得到了携带 XXY 核型的小鼠并模拟了人类的 KS 表型^[112-113]。但是, 目前该领域研究主要还是通过育种的方式来获得模型小鼠, 这就决定了研究只能针对 NVs 小鼠胚胎或者是出生后小鼠的各组织器官、激素水平, 但是目前这些探究都没能清晰阐释 NVs 致病的分子机制。综上所述, 目前对于染色体变异的研究缺乏一套稳定、便捷、可靠的系统来获得细胞系和动物模型。

基于上述研究背景联合类精子干细胞的优势, 本课题组开创性地提出结合 CRISPR-Cas9 与类精子干细胞技术这两大利器来获取携带染色体变异的单倍体胚胎干细胞, 进一步借助胚胎操作得到染色体改造的小鼠模型。若此方案得以成功, 那么如此快速的携带染色体变异的细胞和小鼠模型的获得无疑会为理解细胞和个体对染色体变异的耐受性提供一定的指导作用, 并为人类染色体变异导致的生殖障碍和疾病研究提供材料。由于类精子干细胞单倍性和可长期体外操作等特点, 我们也有理由相信在其基础上进行染色体改造的可行性。令人兴奋的是, 近期王立宾等^[114]的报道证实了上述假设, 他们利用 CRISPR-Cas9 技术分别移除小鼠类精子干细胞(敲除了三个基因组印记区域)两条染色体的端粒和着丝粒, 将两者以首尾相接的方式融合在一起, 最终获得了具有 19 对染色体 (chr4+5) 的小鼠, 在近乎完整的染色体水平上实现了哺乳动物的染色体工程改造, 并证明染色体重排对建立生殖隔离和新物种的出现十分重要。

4 类精子干细胞介导的遗传改造的优点

总结来说, 类精子干细胞具有如下优点: (1) 只携带一套遗传物质, 遗传改造效率高; (2) 因其具有 ESCs 的特征, 即自我更新的特性, 可以在体外培养的细胞中完成复杂的遗传改造; (3) 可以在细胞水平上以简单的方式快速地选择携带正确基因型和不携带脱靶位点的细胞用于产生个体, 特别是携带复杂遗传改造的个体; (4) 可以在体外长期冷冻保存构建的细胞系, 随时取用且节约保存空间和成本; (5) 可以和快速发展的 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑技术结合实现体内的应用。综上所述, 类精子干细胞技术与 CRISPR-Cas9 技术强强联合, 能够在体外高效地实现可选择的复杂遗传改造, 进一步与半克隆技术结合使我们可以低成本、高效率地得到携带目的编辑的动物模型。

5 展望

技术的更新和发展也不会是绝对完美的, 类精子干细胞技术除了上述的众多优点外, 也存在一定的局限性。首先是单倍体自发二倍体化的问题, 随着培养代数的增加, 需要不断通过流式富集来维持单倍体, 这在一定程度上限制了缺乏流式细胞仪的实验室以及不具备流式技术的实验人员对类精子干细胞的应用。而对于单倍体二倍体化机制的研究, 一方面能够为单倍体胚胎干细胞的维持提供帮助, 另一方面也有助于理解哺乳动物细胞的倍性维持机制。其次, 利用携带 sgRNA 文库的 DKO-AG-haESCs 产生纯合突变小鼠的整体效率有待进一步提高。最后, 在非人灵长类研究中, 虽然已经获得了猴子来源的孤雌单倍体胚胎干细胞^[115], 但能否获得猴子来源的孤雄单倍体胚胎干细胞, 以及它们能否同样通过 ICAHCI 技术获得半克隆猴子等一系列未知且有趣的科学问题仍然值得探索。

前文所涉及到的染色体改造大多都是针对染色体片段而非整条染色体, 随着测序技术的蓬勃发展, 我们已经对之前被称作“黑匣子”的基因组, 如着丝粒和端粒等重复序列, 有了更为深入的了解, 而这些序列又与基因组和染色体的稳定性息息相关, 如果能对这些序列进行特定的遗传操作的话, 是否可以快速得到整条染色体甚至是更大尺度基因组改造的细胞系或动物模型呢? 本课题组的研究也对上述问题给予了肯定的回答。实验证明, 利用 CRISPR-Cas9 对类精子干细胞的染色体末端重复序列进行编辑, 进一步借助半克隆技术能够一步获得携带罗氏易位的小鼠, 在不破坏任何基因的情况下浓缩了百万年的时间, 快速模拟了自然界中存在的染色体易位^[116]。针对哺乳动物染色体的大规模遗传改造为理解基因组高级结构和物种进化提供思路的同时, 也彰显了类精子干细胞介导的半克隆技术的巨大应用潜力。

综上所述, 类精子干细胞技术与 CRISPR-Cas9 等基因编辑技术的结合应用前景是十分明朗的, 能够极大地促进哺乳动物的遗传分析。且随着基因编辑技术的发展, 脱靶效率进一步降低、可编辑范围进一步增加等, 相信两者持续性地联合应用将会更好地促进生命科学研究领域的大幅前进。

[参 考 文 献]

- [1] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*,

- 1987, 51: 503-12
- [2] Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, et al. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 1987, 330: 576-8
- [3] Tokunaga A, Anai H, Hanada K. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 523-33
- [4] te Riele H, Maandag ER, Berns A. Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 5128-32
- [5] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636-46
- [6] Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 2011, 188: 773-82
- [7] Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*, 2014, 370: 901-10
- [8] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397-405
- [9] Bukhari H, Müller T. Endogenous fluorescence tagging by CRISPR. *Trends Cell Biol*, 2019, 29: 912-28
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816-21
- [11] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339: 823-6
- [12] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819-23
- [13] 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
- [14] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154: 442-51
- [15] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159: 647-61
- [16] 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
- [17] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10: 977-9
- [18] Marx N, Dhiman H, Schmieder V, et al. Enhanced targeted DNA methylation of the CMV and endogenous promoters with dCas9-DNMT3A3L entails distinct subsequent histone modification changes in CHO cells. *Metab Eng*, 2021, 66: 268-82
- [19] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [20] Wang L, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27: 1289-92
- [21] Knight SC, Xie L, Deng W, et al. Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 2015, 350: 823-6
- [22] Guo DG, Wang DB, Liu C, et al. CRISPR-based genomic loci labeling revealed ordered spatial organization of chromatin in living diploid human cells. *Biochimica Biophysica Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866: 118518
- [23] Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T, et al. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 755-60
- [24] Nihongaki Y, Yamamoto S, Kawano F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chem Biol*, 2015, 22: 169-74
- [25] Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, et al. A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell Rep*, 2016, 17: 1193-205
- [26] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80-4
- [27] Hu Y, Zhou Y, Zhang M, et al. CRISPR/Cas9-engineered universal CD19/CD22 dual-targeted CAR-T cell therapy for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2021, 27: 2764-72
- [28] Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*, 2017, 543: 113-7
- [29] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720-3
- [30] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*, 2014, 156: 836-43
- [31] Porteus MH. Towards a new era in medicine: therapeutic genome editing. *Genome Biol*, 2015, 16: 286
- [32] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-62
- [33] Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 671-87
- [34] Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, et al. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J*, 2019, 38: e101654
- [35] Alkan F, Wenzel A, Anthon C, et al. CRISPR-Cas9 off-targeting assessment with nucleic acid duplex energy parameters. *Genome Biol*, 2018, 19: 177
- [36] Naem M, Majeed S, Hoque MZ, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing. *Cells*, 2020, 9: 1608
- [37] Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430-3
- [38] Freed JJ, Mezger-Freed L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1970, 65: 337-44
- [39] Wietllette E, Grinblat Y, Austen M, et al. Combined

- haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis*, 2004, 40: 231-40
- [40] Kotecki M, Reddy PS, Cochran BH. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res*, 1999, 252: 273-80
- [41] Sukov WR, Ketterling RP, Wei S, et al. Nearly identical near-haploid karyotype in a peritoneal mesothelioma and a retroperitoneal malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 202: 123-8
- [42] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [43] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [44] Yang H, Shi L, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605-17
- [45] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-11
- [46] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221-32
- [47] Nurk S, Koren S, Rhie A, et al. The complete sequence of a human genome. *Science*, 2022, 376: 44-53
- [48] Aganezov S, Yan SM, Soto DC, et al. A complete reference genome improves analysis of human genetic variation. *Science*, 2022, 376: eabl3533
- [49] Cabantous S, Waldo GS. *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods*, 2006, 3: 845-54
- [50] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60: 523-33
- [51] Gavin AC, Bösch M, Krause R, et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 2002, 415: 141-7
- [52] Sarov M, Murray JI, Schanze K, et al. A genome-scale resource for *in vivo* tag-based protein function exploration in *C. elegans*. *Cell*, 2012, 150: 855-66
- [53] Sarov M, Barz C, Jambor H, et al. A genome-wide resource for the analysis of protein localisation in *Drosophila*. *Elife*, 2016, 5: e12068
- [54] Jiang J, Yan M, Li D, et al. Genome tagging project: tag every protein in mice through 'artificial spermatids'. *Natl Sci Rev*, 2019, 6: 394-6
- [55] Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, 2006, 124: 1283-98
- [56] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 267-73
- [57] Bai M, Wu Y, Li J. Generation and application of mammalian haploid embryonic stem cells. *J Intern Med*, 2016, 280: 236-45
- [58] Bai M, Han Y, Wu Y, et al. Targeted genetic screening in mice through haploid embryonic stem cells identifies critical genes in bone development. *PLoS Biol*, 2019, 17: e3000350
- [59] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [60] Li Q, Li Y, Yang S, et al. CRISPR-Cas9-mediated base-editing screening in mice identifies DND1 amino acids that are critical for primordial germ cell development. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 1315-25
- [61] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-62
- [62] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Res*, 2013, 23: 720-3
- [63] Wei L, Wang X, Yang S, et al. Efficient generation of the mouse model with a defined point mutation through haploid cell-mediated gene editing. *J Genet Genomics*, 2017, 44: 461-3
- [64] Yin Q, Wang H, Li N, et al. Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1. *Cell Res*, 2020, 30: 133-45
- [65] Wang L, Zhang Y, Fu X, et al. Joint utilization of genetic analysis and semi-cloning technology reveals a digenic etiology of Müllerian anomalies. *Cell Res*, 2020, 30: 91-4
- [66] Currall BB, Chiang C, Talkowski ME, et al. Mechanisms for structural variation in the human genome. *Curr Genet Med Rep*, 2013, 1: 81-90
- [67] Agnez-Lima LF, Melo JT, Silva AE, et al. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2012, 751: 15-28
- [68] Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, et al. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 103-8
- [69] Bhargava R, Fischer M, O'Sullivan RJ. Genome rearrangements associated with aberrant telomere maintenance. *Curr Opin Genet Dev*, 2020, 60: 31-40
- [70] Hu Q, Chai H, Shu W, et al. Human ring chromosome registry for cases in the Chinese population: re-emphasizing cytogenomic and clinical heterogeneity and reviewing diagnostic and treatment strategies. *Mol Cytogenet*, 2018, 11: 19
- [71] Spielmann M, Lupiáñez DG, Mundlos S. Structural variation in the 3D genome. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 453-67
- [72] Driscoll DA, Gross S. Clinical practice. Prenatal screening for aneuploidy. *N Engl J Med*, 2009, 360: 2556-62
- [73] Valton AL, Dekker J. TAD disruption as oncogenic driver. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 36: 34-40
- [74] Fu DH, Jiang LY, Mason AS, et al. Research progress and strategies for multifunctional rapeseed: a case study of China. *J Integr Agr*, 2016, 15: 1673-84
- [75] Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, et al. An evidence-

- based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med*, 2011, 13: 777-84
- [76] Hurler ME, Dermitzakis ET, Tyler-Smith C. The functional impact of structural variation in humans. *Trends Genet*, 2008, 24: 238-45
- [77] Signore F, Gulia C, Votino R, et al. The role of number of copies, structure, behavior and copy number variations (CNV) of the Y chromosome in male infertility. *Genes (Basel)*, 2019, 11: 40
- [78] Miller BM, Adler ID. Suspect spindle poisons: analysis of c-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 1989, 4: 208-15
- [79] Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*, 2013, 153: 666-77
- [80] Pividori M, Rajagopal PS, Barbeira A, et al. PhenomeXcan: mapping the genome to the phenome through the transcriptome. *Sci Adv*, 2020, 6: eaba2083
- [81] Niakan KK, Han J, Pedersen RA, et al. Human pre-implantation embryo development. *Development*, 2012, 139: 829-41
- [82] Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet*, 2001, 2: 280-91
- [83] Rau RE, Carroll AJ, Heerema NA, et al. Klinefelter syndrome and 47,XXY syndrome in children with B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 2017, 179: 843-6
- [84] Ferlin A, Schipilliti M, Foresta C. Bone density and risk of osteoporosis in Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr*, 2011, 100: 878-84
- [85] Kidd JM, Graves T, Newman TL, et al. A human genome structural variation sequencing resource reveals insights into mutational mechanisms. *Cell*, 2010, 143: 837-47
- [86] Mills RE, Walter K, Stewart C, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature*, 2011, 470: 59-65
- [87] Liu X, Tang D, Zheng F, et al. Single-cell sequencing reveals the relationship between phenotypes and genotypes of Klinefelter syndrome. *Cytogenet Genome Res*, 2019, 159: 55-65
- [88] D'Aurora M, Ferlin A, Di Nicola M, et al. Deregulation of sertoli and leydig cells function in patients with Klinefelter syndrome as evidenced by testis transcriptome analysis. *BMC Genomics*, 2015, 16: 156
- [89] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 2008, 456: 53-9
- [90] Smith AJH, De Sousa MA, Kwabi-Addo B, et al. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat Genet*, 1995, 9: 376-85
- [91] Van Deursen J, Fornerod M, Van Rees B, et al. Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 7376-80
- [92] Lewandoski M, Martin GR. Cre-mediated chromosome loss in mice. *Nat Genet*, 1997, 17: 223-5
- [93] Kazuki Y, Shinohara T, Tomizuka K, et al. Germline transmission of a transferred human chromosome 21 fragment in transchromosomal mice. *J Hum Genet*, 2001, 46: 600-3
- [94] Tomizuka K, Yoshida H, Uejima H, et al. Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat Genet*, 1997, 16: 133-43
- [95] Takiguchi M, Kazuki Y, Hiramatsu K, et al. A novel and stable mouse artificial chromosome vector. *ACS Synth Biol*, 2014, 3: 903-14
- [96] Abe S, Honma K, Okada A, et al. Construction of stable mouse artificial chromosome from native mouse chromosome 10 for generation of transchromosomal mice. *Sci Rep*, 2021, 11: 20050
- [97] Piganeau M, Ghezraoui H, De Cian A, et al. Cancer translocations in human cells induced by zinc finger and TALE nucleases. *Genome Res*, 2013, 23: 1182-93
- [98] Torres R, Martin MC, Garcia A, et al. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*, 2014, 5: 3964
- [99] Choi PS, Meyerson M. Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nat Commun*, 2014, 5: 3728
- [100] Blasco RB, Karaca E, Ambrogio C, et al. Simple and rapid *in vivo* generation of chromosomal rearrangements using CRISPR/Cas9 technology. *Cell Rep*, 2014, 9: 1219-27
- [101] Chen ZH, Yu YP, Zuo ZH, et al. Targeting genomic rearrangements in tumor cells through Cas9-mediated insertion of a suicide gene. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 543-50
- [102] Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 1987, 51: 919-28
- [103] 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
- [104] Reimer J, Knöb S, Labuhn M, et al. CRISPR-Cas9-induced t(11;19)/MLL-ENL translocations initiate leukemia in human hematopoietic progenitor cells *in vivo*. *Haematologica*, 2017, 102: 1558-66
- [105] Bronson SK, Smithies O, Mascarello JT. High incidence of XXY and XYY males among the offspring of female chimeras from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 3120-3
- [106] Kraft K, Geuer S, Will AJ, et al. Deletions, inversions, duplications: engineering of structural variants using CRISPR/Cas in mice. *Cell Rep*, 2015, 10: 833-9
- [107] Charton K, Suel L, Henriques SF, et al. Exploiting the CRISPR/Cas9 system to study alternative splicing *in vivo*: application to titin. *Hum Mol Genet*, 2016, 25: 4518-32
- [108] Hunt PA, Worthman C, Levinson H, et al. Germ cell loss in the XXY male mouse: altered X-chromosome dosage affects prenatal development. *Mol Reprod Dev*, 1998, 49:

- 101-11
- [109] López-Moncada F, Tapia D, Zuñiga N, et al. Nucleolar expression and chromosomal associations in Robertsonian spermatocytes of *Mus musculus domesticus*. *Genes (Basel)*, 2019, 10: 120
- [110] Schnedl W. The karyotype of the mouse. *Chromosoma*, 1971, 35: 111-6
- [111] Lue Y, Liu PY, Erkkila K, et al. Transplanted XY germ cells produce spermatozoa in testes of XXY mice. *Int J Androl*, 2010, 33: 581-7
- [112] Lue Y, Rao PN, Sinha Hikim AP, et al. XXY male mice: an experimental model for Klinefelter syndrome. *Endocrinology*, 2001, 142: 1461-70
- [113] Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, et al. Klinefelter's syndrome. *Lancet*, 2004, 364: 273-83
- [114] Wang LB, Li ZK, Wang LY, et al. A sustainable mouse karyotype created by programmed chromosome fusion. *Science*, 2022, 377: 967-75
- [115] Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23: 1187-200
- [116] Zhang XYM, Yan M, Yang ZH, et al. Creation of artificial karyotypes in mice reveals robustness of genome organization. *Cell Res*, 2022, doi: 10.1038/s41422-022-00722-x