

• 综述 •

CRISPR/Cas9 技术在感染性疾病中的应用

张雨超^{1,2},郝瑞栋²,徐建青^{1,2}

1. 温州医科大学,温州 325014; 2. 复旦大学附属公共卫生临床中心,上海 201508

摘要:成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9〔clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9), CRISPR/Cas9〕是一种新兴的基因编辑技术,与以前的三大基因编辑技术——归巢核酸内切酶、锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶技术相比,其在靶向特异性、操作简便性、治疗彻底性、应用广泛性等方面具有更大的优势和发展潜力。艾滋病、乙型肝炎、疟疾等感染性疾病的治疗一直是医学上的重大难题,科学家正努力尝试利用 CRISPR/Cas9 技术解决这些医学难题。本文主要综述了 CRISPR/Cas9 技术在这些感染性疾病中应用的研究进展。

关键词:成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9;共价闭合环状 DNA;锌指核酸酶;转录激活因子样效应物核酸酶;单导向 RNA

The application of CRISPR/Cas9 technology in infectious diseases

ZHANG Yuchao^{1,2}, HAO Ruidong², XU Jianqing^{1,2}

1. Wenzhou Medical University, Wenzhou 325014, China; 2. Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China

Abstract: The clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9) technology is a new gene editing technique. Compared with the previous gene editing techniques, such as homing endonuclease technology, zinc finger nuclease technology and transcription activator-like effector nuclease technology, it has greater advantages in target specificity, operation simplicity, treatment completeness and broad applications. Hepatitis B, acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), malaria and other infectious diseases have been the major problems in clinic. Scientists are trying to use CRISPR/Cas9 technology to solve these medical problems. This article mainly summarizes the progress on CRISPR/Cas9 technology applied in infectious diseases.

Key words: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9; Covalently closed circular DNA; Zinc finger nuclease; Transcription activator-like effector nuclease; Single guide RNA

成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关蛋白 9〔clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9(Cas9), CRISPR/Cas9〕系统是细菌和古

细菌在长期进化过程中形成的一种免疫防御机制,用来抵御噬菌体等外源 DNA 的入侵^[1]。它可诱导靶基因组位点发生 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB)以促进基因组编辑。CRISPR 衍生

基金项目:上海市高等级生物安全病原微生物检测专业技术服务平台建设项目(15DZ2290200)

通信作者:徐建青

Corresponding author. XU Jianqing, E-mail: xujianqing2014@126.com

RNA(CRISPR-derived RNA, crRNA)通过碱基配对与反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)结合形成 RNA 双链, 后者指导 Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列的靶定位点切断 DNA 双链。在缺乏修复模板时, DSB 通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 重新连接, 导致插入/缺失(insertion-deletion, InDel)突变。

1 CRISPR/Cas 的研究背景

大多数 CRISPR/Cas 系统存在一种最简单且具有单一效应的 DNA 核酸内切酶——Cas9, 它通过两种小 RNA(crRNA 和 tracrRNA)被引导至其病毒 DNA 靶位^[1]。最初科学家将 CRISPR/Cas 系统应用于哺乳动物细胞的 DNA 编辑, 并从酿脓链球菌中获取 Cas9 蛋白, 证实酿脓链球菌 Cas9 蛋白在哺乳动物细胞中可通过 tracrRNA 和 crRNA 的融合转录指向 DNA 靶位, 一经结合, Cas9 引起的 DNA 裂解会因 NHEJ 而易发生突变。

2 CRISPR/Cas 的应用

来源于微生物 CRISPR 适应性免疫系统的 RNA 引导的 Cas9 核酸内切酶可促进真核细胞的高效基因编辑。CRISPR/Cas9(特别是 Cas9)在导向 RNA(guide RNA, gRNA)的参与下, 可识别和切割真核细胞中的靶基因组, 然后通过同源指导或 NHEJ 修复靶基因。由于细胞在缺乏同源修复模板的情况下更倾向于 NHEJ 途径, 所以基因组双链断裂后, 基因组通过 NHEJ 途径发生插入/缺失突变。这种插入/缺失通常在基因开放读码框架的下游引入提前成熟的终止密码子, 导致目标基因表达缺失。CRISPR/Cas9 基因编辑技术不仅应用于真核细胞, 还能在抗病毒感染中发挥重要作用。病毒通常先利用特异性受体感染细胞, 然后其基因组经过转录、复制、翻译, 完成生命循环, 最终使病毒基因组(如某些 DNA 病毒和反转录病毒)整合到细胞基因组中。利用这些靶基因组序列的可识别性, CRISPR/Cas9 在治疗顽固性和潜伏性病毒感染中可发挥作用。

CRISPR/Cas9 还应用于艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 治疗。根据联合国艾滋病规划署 (the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS) 发布的 2013 年全球艾滋病报告, 全世界超过 3 500 万人感染人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)^[2-3], 且并发症、药物滥用、不规

范药物治疗和病毒变异等因素使 AIDS 的治疗更加棘手。起初, 高效抗反转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HAART) 的出现让人们看到了治愈的曙光——坚持这种治疗方法的患者体内病毒载量很低甚至检测不到, CD4⁺ T 细胞群也接近正常。于是人们很自然地相信, 只要继续坚持治疗, 最后一定会痊愈。然而没过多久, 科学家发现这些患者体内存在病毒潜伏感染细胞, 它们只产生极微量的病毒蛋白, 成功躲过了细胞杀伤作用和宿主免疫清除作用^[2,4-5]。细胞中残留的 CD4⁺ T 细胞被认为是最显著的病毒潜伏感染细胞群。根据所涉终末器官的不同, 中枢神经系统、小胶质细胞和巨噬细胞都可能成为最主要的病毒生产源和储存源^[6-7]。一旦受到 HAART 刺激或治疗中断, 就会使体内残留的 CD4⁺ 记忆性 T 细胞群产生感染性病毒微粒, 这是 AIDS 治愈的主要障碍。随着 CRISPR/Cas9 技术的广泛应用, 科学家设想通过靶定整合在宿主基因组特定位点的 HIV 序列, 利用 CRISPR/Cas9 技术对其进行切除, 以期实现治愈的目的。其中一个很重要的思路是通过靶定 HIV-1 前病毒基因组高度保守的 5' 和 3' 端长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR) 及其中特异的顺式作用元件, 将病毒 DNA 序列从宿主基因组中移除^[8-9]。这一过程遇到了许多阻碍——CRISPR/Cas9 系统需设计出与靶切除位 5' 和 3' 端相同的 gRNA; 为减少脱靶的影响, 这些序列不能与宿主基因组同源; HIV 与许多人类内源性反转录病毒有相似序列^[10-11]; 存在 HIV 的高突变性、患者个体间和患者自身的变异性。

CCR5 是 HIV-1 侵入人体的重要共同受体之一, 而拥有 CCR5Δ32 变种的个体不会感染 HIV-1, 这使 CCR5 成为控制 HIV-1 感染的重要靶点^[12-13]。CRISPR/Cas9 作为自然存在于原核生物中的适应性免疫系统组成部分, 可用于哺乳动物细胞的基因编辑。CRISPR/Cas9 可有效调节细胞系中 CCR5 位点的剪辑, 使细胞表面的 CCR5 表达受抑制。后代基因测序表明, CCR5 的预测断裂位点出现了各种各样的突变。在预测最可能发生脱靶的 3 个位点中, 并没有检测到很明显的脱靶现象。更重要的是, 通过构建携带 CRISPR/Cas9 的 Ad5F35 腺病毒, 有效转换了原始 CD4⁺ T 细胞, 破坏了 CCR5 表达, 且正向转换细胞对 HIV-1 产生抗性。这是有记载以来第一次在原始 CD4⁺ T 细胞中利用腺病毒 CRISPR/Cas9 对 HIV-1 产生抗性。

CRISPR/Cas9 系统可特异靶定并切割乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因组的保守位点,强力抑制其表达和复制。乙型肝炎很难治愈的关键在于 HBV 感染细胞中长期存在一种共价闭合环状 DNA (covalently closed circle DNA, cccDNA), 它是 HBV 基因组和前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 复制的原始模板^[14-15]。利用 Cas9 核酸内切酶直接靶定 cccDNA, 使其发生 DSB, 可达到灭活 cccDNA 的效果而抗 HBV 感染。Ramanan 等利用 CRISPR 在线设计工具获得 24 种以 HBV 基因组为靶位的单导向 RNA(single guide RNA, sgRNA), 通过靶定核心位点、聚合酶位点和 X 开放读码框架位点设计了一些 sgRNA(包括 sgRNA 13、sgRNA 14、sgRNA 15、sgRNA 16、sgRNA 17、sgRNA 18、sgRNA 19、sgRNA 21)。为评价这些 sgRNA 的效果, 他们将 HBV 表达质粒与 HepG2 肝癌细胞株、Cas9 表达体和独立 gRNA 共转染, 测定 HBV 3.5 kb RNA(编码 pgRNA) 与 HBV 表面抗原(HBV surface antigen, HBsAg) 的表达量。结果表明, sgRNA 17 和 sgRNA 21 能持续降低 HBV 中 pgRNA 水平并抑制 HBsAg 表达。此外, 利用 sgRNA 17/sgRNA 21 复合体靶定 HBV 基因组, 可产生更强的抑制效果^[15]。

疟疾是人类健康的另一重要杀手, 源于疟原虫感染。疟原虫“居住”在红细胞内, 一段外源 DNA 必须穿过 4 层膜(红细胞膜、空泡膜、疟原虫质膜、疟原虫核膜)才能到达疟原虫细胞核。由于疟原虫特殊的生活习性, 其基因组很少有编码现象, 且许多存在于真核细胞中的酶无法在寄生虫体内找到, 故现有基因编辑技术很难成功应用于这一虫种。尽管目前已测出很多疟原虫基因组序列, 但近一半的基因功能尚不明确^[16]。很多基因编辑技术包括基因敲除、基因标签、等位置换等广泛应用于疟原虫基因功能的研究^[17-19], 基本上都是利用同源重组技术, 将一段含有药物选择性标记的 DNA 插入靶基因或利用修饰的基因序列取代原有基因。但这些方法既耗时又低效, 且需经过长时间的药物选择和疟原虫克隆。另外, DNA 插入或置換位点并不特异, 易发生在一个随机的同源区域。可喜的是, 最近一种高效、位点特异的基因编辑技术——锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)修饰技术可应用于恶性疟原虫的基因研究^[20-21]。但有限的靶位点及昂贵的价格限制了其广泛应用。另一种技术——转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like

effector nuclease, TALEN) 技术^[22-23] 虽已广泛应用于许多生物体的基因编辑, 但尚未成功应用于疟原虫。最近, 科学家终于将 CRISPR/Cas9 技术成功应用于疟原虫的基因编辑^[24-28]。一般情况下, CRISPR/Cas9 系统介导疟原虫基因编辑需两种成分的表达, 即 Cas9 和靶定 sgRNA。为降低构建质粒的大小及克服疟原虫可选标记的有限性, 科学家设计了一个包含 *hdhfr-2A peptide-gfp* 基因的表达质粒和瞬时表达 *hdhfr-2A-Flag-SpCas9* 融合基因的转基因寄生虫, 并通过蛋白免疫印迹法证实了 Cas9 的表达。与其他基因编辑技术相比, Cas9/sgRNA 具有独特优势: Cas9/sgRNA 的瞬时表达减少了对外源 DNA 和邻近 DNA 的影响; CRISPR/Cas9 系统允许许多基因定点修饰, 无需担心药物选择性标记不够用。结果证明这一技术能在疟原虫基因组中引起定点 DSB 并被同源重组修复, 且能在多重疟原虫基因中实现高效靶基因切除(100%)、信号导入(22%~45%) 和等位置换(22%~45%)。这一现象标志着一种高效、精确的疟原虫基因修饰方法的形成, 也为后续研究疟原虫基因功能提供了重要思路。

3 结语

CRISPR/Cas9 技术已应用于 AIDS、乙型肝炎、疟疾等感染性疾病的治疗研究, 并显示出巨大优势。尽管这一技术仍存在诸如脱靶、治疗不彻底等问题, 但随着科学技术的不断发展, 一定会在不久的将来为人类带来更多的福音。

参考文献

- [1] Kennedy EM, Cullen BR. Bacterial CRISPR/Cas DNA endonucleases: A revolutionary technology that could dramatically impact viral research and treatment [J/OL]. Virology, 2015. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682215000707>.
- [2] Dampier W, Nonnemacher MR, Sullivan NT, Jacobson JM, Wigdahl B. HIV excision utilizing CRISPR/Cas9 technology: attacking the proviral quasispecies in reservoirs to achieve a cure [J/OL]. MOJ Immunol, 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4399856>.
- [3] UNAIDS. Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013 [EB/OL]. [2013-09-23]. <http://reliefweb.int/report/world/global-report-unaid-report-global-aids-epidemic-2013>.
- [4] Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1 [J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134 (1): 12-19.
- [5] Siliciano RF, Greene WC. HIV latency [J]. Cold Spring

- Harb Perspect Med, 2011, 1(1): a007096.
- [6] Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence [J]. Curr HIV Res, 2008, 6(5): 388-400.
- [7] Kramer-Hämmerle S, Rothenaigner I, Wolff H, Bell JE, Brack-Werner R. Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus [J]. Virus Res, 2005, 111(2): 194-213.
- [8] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus [J/OL]. Sci Rep, 2013. <http://www.nature.com/articles/srep02510>.
- [9] Qu X, Wang P, Ding D, Li L, Wang H, Ma L, Zhou X, Liu S, Lin S, Wang X, Zhang G, Liu S, Liu L, Wang J, Zhang F, Lu D, Zhu H. Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(16): 7771-7782.
- [10] Gonzalez-Hernandez MJ, Cavalcoli JD, Sartor MA, Contreras-Galindo R, Meng F, Dai M, Dube D, Saha AK, Gitlin SD, Omenn GS, Kaplan MH, Markovitz DM. Regulation of the human endogenous retrovirus K (HML-2) transcriptome by the HIV-1 Tat protein [J]. J Virol, 2014, 88(16): 8924-8935.
- [11] Contreras-Galindo R, López P, Vélez R, Yamamura Y. HIV-1 infection increases the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007, 23(1): 116-122.
- [12] Li C, Guan X, Du T, Jin W, Wu B, Liu Y, Wang P, Hu B, Griffin GE, Shattock RJ, Hu Q. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9 [J]. J Gen Virol, 2015, 96(8): 2381-2393.
- [13] Cornu TI, Mussolini C, Bloom K, Cathomen T. Editing CCR5: a novel approach to HIV gene therapy [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 848: 117-130.
- [14] Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses [J]. Annu Rev Biochem, 1987, 56: 651-693.
- [15] Ramanan V, Shlomai A, Cox DB, Schwartz RE, Michailidis E, Bhatta A, Scott DA, Zhang F, Rice CM, Bhatia SN. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus [J/OL]. Sci Rep, 2015. <http://www.nature.com/articles/srep10833>.
- [16] Zhang C, Xiao B, Jiang Y, Zhao Y, Li Z, Gao H, Ling Y, Wei J, Li S, Lu M, Su XZ, Cui H, Yuan J. Efficient editing of malaria parasite genome using the CRISPR/Cas9 system [J]. MBio, 2014, 5(4): 14.
- [17] Wu Y, Kirkman LA, Wellemes TE. Transformation of Plasmodium falciparum malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(3): 1130-1134.
- [18] van Dijk MR, Waters AP, Janse CJ. Stable transfection of malaria parasite blood stages [J]. Science, 1995, 268 (5215): 1358-1362.
- [19] van Dijk MR, Janse CJ, Waters AP. Expression of a Plasmodium gene introduced into subtelomeric regions of Plasmodium berghei chromosomes [J]. Science, 1996, 271 (5249): 662-665.
- [20] Straimer J, Lee MC, Lee AH, Zeitler B, Williams AE, Pearl JR, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Llinás M, Urnov FD, Fidock DA. Site-specific genome editing in Plasmodium falciparum using engineered zinc-finger nucleases [J]. Nat Methods, 2012, 9(10): 993-998.
- [21] McNamara CW, Lee MC, Lim CS, Lim SH, Roland J, Nagle A, Simon O, Yeung BK, Chatterjee AK, McCormack SL, Manary MJ, Zeeman AM, Dechering KJ, Kumar TR, Henrich PP, Gagaring K, Ibanez M, Kato N, Kuhen KL, Fischli C, Rottmann M, Plouffe DM, Bursulaya B, Meister S, Rameh L, Trappe J, Haasen D, Timmerman M, Sauerwein RW, Suwanarusk R, Russell B, Renia L, Nosten F, Tully DC, Kocken CH, Glynne RJ, Bodenreider C, Fidock DA, Diagana TT, Winzeler EA. Targeting Plasmodium PI₄K to eliminate malaria [J]. Nature, 2013, 504(7479): 248-253.
- [22] Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors [J]. Science, 2009, 326 (5959): 1501.
- [23] Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. Science, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [24] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [25] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach JA, Dicarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339 (6121): 823-826.
- [26] Hwang WY, Fu Y, Reyne D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 227-229.
- [27] Shan QW, Wang YP, Li J, Zhang Y, Chen KL, Liang Z, Zhang K, Liu JX, Xi JJ, Qiu JL, Gao CX. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 686-688.
- [28] Ren X, Sun J, Housden BE, Hu Y, Roesel C, Lin S, Liu LP, Yang Z, Mao D, Sun L, Wu Q, Ji JY, Xi J, Mohr SE, Xu J, Perrimon N, Ni JQ. Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(47): 19012-19017.