

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在脑科学中的应用策略

张骑鹏^{1,2}, 孙安阳^{1*}

1. 上海健康医学院脑退行性疾病重点实验室, 上海 201318;

2. 南京大学生命科学学院, 南京 210023

* 联系人, E-mail: sunay@sumhs.edu.cn

2017-06-15 收稿, 2017-08-14 修回, 2017-08-17 接受, 2017-09-14 网络版发表

摘要 基因编辑是对生物体基因组的目标基因进行精确切割、插入等操作. CRISPR/Cas9技术是基于向导RNA识别DNA靶序列, Cas9蛋白作为核酸酶切割DNA靶点来实现基因编辑. 该技术自2012年报道以来已被不断改进, 因具有普适、高效、简便等优点, 迅速成为现阶段应用最广的基因编辑技术. 在脑科学领域, CRISPR/Cas9技术不仅可应用于离体神经细胞, 也可以在受精卵期、胚胎期或成年期应用; 应用目的涉及脑基因与功能研究、基因敲除/敲入小鼠模型的构建、某些疾病的实验性治疗等. 尤其是在一些遗传性疾病如视网膜色素变性、亨廷顿病的动物模型上, CRISPR/Cas9方法已经初步展示了令人鼓舞的治疗效果. 未来, 该技术将会在精确编辑效率与可控性方面有进一步提升, 并可能在脑定向导入方法、脑神经环路解析等专业应用环节获得显著的发展.

关键词 CRISPR/Cas9, 基因编辑, 基因敲除, 基因敲入, 神经科学

20世纪80年代, 第一只转基因小鼠的诞生标志着人类在哺乳动物上进行基因修饰的开始. 初代转基因技术是采用原核注射或病毒感染等手段将外源性DNA导入细胞核, 再经随机插入的方式整合进受体的基因组. 随后又通过同源重组机制^[1]发展了基因打靶技术, 以提高基因修饰的精度. 迄今, 经由胚胎干细胞基因打靶方法已成功制备了上千种基因突变小鼠, 极大地推动现代生物学与医学的发展. 然而, 基因打靶技术操作费时费力, 制约了它成为一种普适、快捷的基因修饰技术常规应用.

基于识别DNA靶点的方法不同, 近十余年主要产生了3种位点特异性基因编辑技术: 锌指蛋白核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和成簇的规律间隔短回文重复序列/相关蛋白9 (CRISPR/Cas9)技术. ZFN和TALEN都是由经设计改造的DNA识别蛋白与FokI非特异性核酸酶结构

域连接而成, 后者要以二聚体的形式发挥酶切效应. ZFN的每个锌指蛋白识别并结合DNA链上一个特异的三联碱基, 因是一对三的方式, 在设计多个锌指蛋白串联排列时需要考虑上下文关联效应. TALEN技术的每个TALE蛋白结构单元可识别DNA链上一个碱基, 因是一对一的方式, 所以设计更加灵活, 可靶向较长序列. 然而, 大量高度保守的TALE蛋白模块组装涉及繁琐的分子克隆技术, 模块序列高度重复也可能妨碍后期的病毒包装. CRISPR/Cas9技术采用向导RNA识别DNA靶序列, 以Cas9蛋白作为核酸酶切割DNA靶点. 很显然, 这种依靠RNA识别DNA靶序列的技术比前两种以蛋白识别DNA靶序列的技术更为简便, 加上一些其他优点(表1), 使之迅速成为广泛应用的基因编辑技术^[2]. 新近, 国际上又有基因编辑技术改进的报道, 如CRISPR/CasX和CRISPR/CasY^[3], CRISPR/Cpf1^[4], 结构识别的核酸酶SGN^[5]等, 但这些改进型技术的编辑效率和可靠性尚待以

引用格式: 张骑鹏, 孙安阳. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在脑科学中的应用策略. 科学通报, 2017, 62: 3583–3593

Zhang Q P, Sun A Y. Strategy for applying CRISPR/Cas9 gene editing technology in neuroscience (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 3583–3593, doi: 10.1360/N972017-00670

表 1 常见基因编辑技术的特点比较

Table 1 Comparison of three major techniques for genome editing

	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
编辑效率	低	中	高
序列特异性	低, 有上下文 关联效应	高	高
多基因编辑	困难, 涉及全 套设计	困难, 涉及全 套设计	简便, 仅需一次应 用几个gRNA
成本	高	高	低

后更多的实验室去使用与验证. 本文就CRISPR/Cas9技术在神经科学中的应用及发展, 进行总结与分析.

1 CRISPR/Cas9系统的发现

1987年, 日本学者在克隆大肠杆菌碱性磷酸酶同工酶*iap*基因时, 意外发现该基因下游存在串联的29 nt重复序列, 被32 nt不重复序列间隔开来^[6], 但一直不清楚这种结构的生物学意义. 此后, 在不同的细菌和古细菌中发现了更多的这类成簇的规律间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)序列, 这类序列存在于大约40%的细菌和90%的古细菌中. 另外, 在CRISPR序列的上游又发现了与之相关联的Cas (CRISPR-associated)基因家族, 编码核酸酶和解旋酶等产物与CRISPR共同发挥作用. 细菌和古细菌中的CRISPR/Cas系统可分为3种类型, 目前应用最广泛的系统属于II型, 包含特征性的Cas9蛋白. II型系统仅存在于细菌中, 需要Cas9蛋白与crRNA (CRISPR-derived RNA)和tracrRNA (trans-activating RNA)两种RNA共同参与, 以完成对噬菌体病毒DNA的切割. 随后的研究表明, crRNA和tracrRNA可以融合在一条RNA单链上, 由这条RNA单链引导Cas9蛋白识别DNA靶点, 因此称之为向导RNA (guide RNA, gRNA)^[7]. 自2013年以来, II型Cas9系统被不断证明具有广泛的物种有效性, 从最初的宿主嗜热链球菌扩展到了其他种属, 并包括哺乳类细胞, 从而使CRISPR/Cas9技术的应用领域也迅速扩大^[8].

2 CRISPR/Cas9系统的基因编辑机制

2.1 对靶基因的位点识别要求

基础的CRISPR/Cas9系统由长度约100个核苷酸(5'端20个核苷酸结合靶序列)的gRNA与Cas9核酸酶

组成, Cas9核酸酶切割靶基因的特异性由gRNA序列决定. DNA靶序列的下游方向(对应于gRNA的3'端)还需有紧邻着的PAM (protospacer-adjacent motif)基序, 可被Cas9酶识别. 对于广泛使用的化脓链球菌Cas9酶(SpCas9), PAM基序是NGG (N代表任意一种碱基). 需要指出的是, 不同种属的Cas9酶识别不同的PAM基序. 例如, 金黄色葡萄球菌的SaCas9酶识别的PAM基序为NGRRT或NGRRN (R代表A或G碱基). 通过定向进化方法, 寻找到几个Cas9变种, 可以识别新的PAM基序, 进而扩大了可识别靶序列的范围^[9].

2.2 Cas9核酸酶切割DNA的机制

Cas9核酸酶由识别叶REC和核酸酶叶NUC组成, 其中核酸酶叶又包含HNH和RuvC两个结构域, 酶活性状态由构象控制^[10,11]. gRNA的骨架区与Cas9表面带正电荷的沟槽相互作用形成一个核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物, Cas9转变为DNA结合构象, 可与基因组上的PAM基序结合. 在靶点识别过程中, gRNA靶序列的3'端“种子区”首先与一小段DNA靶序列配对结合, RNA链侵入促使DNA解链; 随着正确配对持续, gRNA沿3'端向5'端方向“拉链式”打开DNA靶序列的双链. 此配对与解链过程也触发Cas9的HNH结构域发生变构激活, 连接部位结构重排又促成RuvC酶活性. 两个核酸酶结构域在激活过程中各自靠向切割位点, HNH切割DNA双链中的gRNA互补链, RuvC则切割非互补链, 确保了协调切割DNA双链. 部分互补的非靶序列可以结合Cas9, 但不足以驱动HNH变构激活, 不产生DNA双链切割. 另一方面, HNH或RuvC结构域的关键氨基酸残基突变可使其内切酶活性丧失, 例如SpCas9的D10A突变导致RuvC失活, H840A突变导致HNH失活. 仅包含一个活性结构域的Cas9不产生DNA双链断裂, 只切割DNA单链, 形成一个切口, 又称为Cas9切口酶(Cas9 nickase, nCas9), 如常用的切口酶Cas9^{D10A}突变体仅HNH结构域有活性. 使用Cas9双切口酶, 配合一对预设计的gRNAs, 可产生DNA双链断裂.

2.3 DNA双链断裂的后续效应

CRISPR/Cas9系统的直接作用是在基因靶序列中位于PAM基序上游3~4 nt处产生DNA双链断裂. 20世纪90年代即发现, 细胞DNA双链断裂可以通过两

种方式进行修复：一种是非同源性末端接合(non-homologous end joining, NHEJ)修复, 另一种是同源重组修复(homology directed repair, HDR). NHEJ修复很活跃, 是体内主要的修复方式; 但NHEJ修复易产生小片段插入、缺失、倒位等多种突变, 可导致可读框移码或突变成终止密码子, 造成该基因不表达或表达异常. HDR修复活性通常很低, 但为精确修复, 在gRNA/Cas9体系中添加修复模板可将模板DNA精确地插入到靶基因的特定位点. 修复模板包含所需插入的基因片段以及断裂点上下游同源序列(也称为同源臂). HDR主要发生在分裂细胞的G2期和S期, 在非分裂细胞中HDR几无活性. 一些实验室尝试人为地调节NHEJ与HDR的相对活性^[12]或者结合细胞周期同步化处理, 以提高CRISPR/Cas9技术预期修复方式的编辑效率, 希望可应用于改进基因敲入小鼠的生产.

3 CRISPR/Cas9技术应用方式

3.1 受精卵期应用

采用CRISPR/Cas9技术构建基因工程模式生物

在理论上比较简便, 仅需向特定细胞导入Cas9, gRNA和供体DNA, 就可以引导Cas9介导的DNA编辑事件. 初始的常用方法是向单细胞期受精卵注射Cas9 mRNA和gRNA混合物. 但由于Cas9蛋白表达有一定的时间延后, 基因编辑实际上多发生于卵裂后胚胎发育的早期, 因而只有一部分细胞被编辑, 形成嵌合体(图1). 这种情况在卵裂较早的生物, 如斑马鱼等尤易发生. 为了有利于产生非嵌合体型胚胎, 目前应用于受精卵期的CRISPR/Cas9技术已做了一些改变: (i) 直接将预装配的Cas9活性蛋白与gRNA复合物导入受精卵, 由于Cas9-gRNA立即起效, 加之Cas9蛋白的细胞半衰期约为24 h, 可以最大程度地减少嵌合体的形成等后遗效应. 各组分的浓度可通过预实验优化. (ii) 许多研究给Cas9蛋白加上核定位信号, 用以提高基因编辑效率. (iii) 一些实验室用电穿孔方法代替显微注射, 以提高受精卵编辑通量, 避免注射所致损伤, 改善胚胎存活率^[13], 但缺点之一是Cas9-gRNA复合物用量偏高. 有报道使用nCas9双切口酶系统代替野生型Cas9制备基因敲入小鼠, 但效率可能不及使用野生型Cas9^[14]. 目前, 已有多

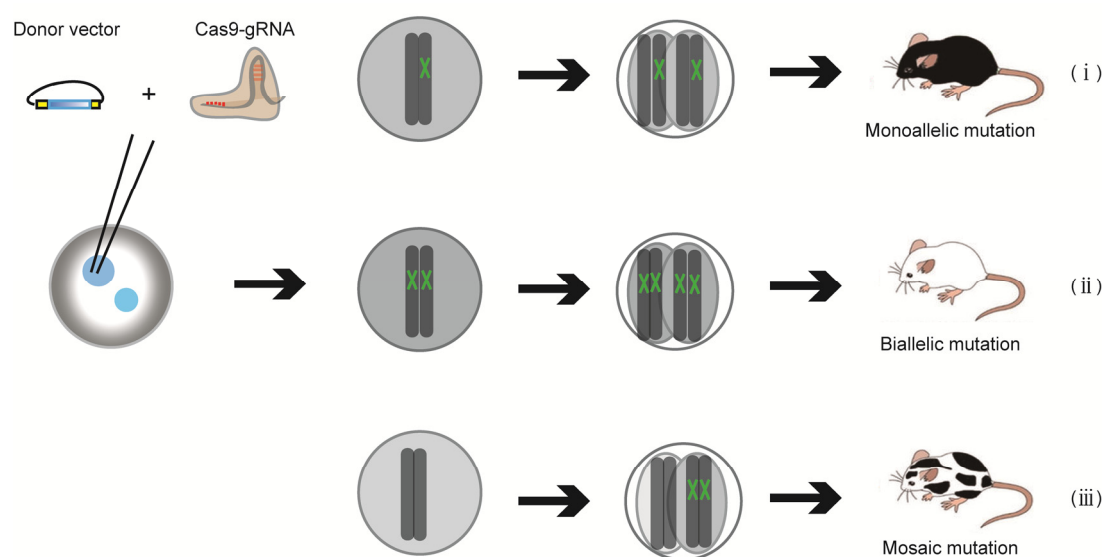


图1 受精卵期CRISPR/Cas9系统介导的基因编辑. 以基因敲入为例, 将Cas9, gRNA, 模板DNA注射至受精卵的雄原核后, 可能会产生3种情况: (i) 在单细胞期发生单等位基因突变(monoallelic mutation), 得到基因突变杂合子小鼠; (ii) 在单细胞期发生双等位基因突变(biallelic mutation), 得到两个等位基因都发生突变的小鼠; (iii) 在多细胞期发生基因突变, 得到基因突变嵌合体(mosaic mutation)小鼠

Figure 1 Phenotypes and complexity of allele mutations following zygote injection of CRISPR/Cas9 system in mice. CRISPR/Cas9 components (Cas9, gRNA and donor DNA) are injected into the pronuclei of mouse zygotes, which may generate three types of allele modification: (i) gene editing occurred in the one-cell stage and mutation appears in one allele (monoallelic mutation); (ii) gene editing occurred in the one-cell stage, but mutations appear in both alleles (biallelic mutation); (iii) gene editing occurred in two or multiple cell stages of embryos, and mutations are produced in a subset of cells (mosaic mutation)

家生物公司和学术机构常规使用CRISPR/Cas9技术制备基因修饰小鼠新品系, 将会不断产生新的技术改进。

3.2 胚胎期应用

胚胎期脑部应用CRISPR/Cas9技术的突出优点是: 此时神经前体细胞数量仍然庞大, HDR活性相对较高, 因而可获得较高的精准编辑效率。在胚胎期, 一般采用胎鼠子宫内电穿孔法实施CRISPR/Cas9技术, 通过调整胎鼠脑显微注射部位与电极夹持方向, 将gRNA-Cas9、模板DNA转送到胎鼠的目标脑区。在该方法中, gRNA与Cas9通常整合于单一质粒表达系统, 以降低转染的复杂性。目前较常用的载体为pX330质粒, 该质粒提供了两个BbsI酶切位点, 方便导入gRNA(图2), 用U6启动子驱动gRNA表达; 在gRNA

后是广谱的CBh启动子, 驱动人源化SpCas9核酸酶表达。胎小鼠子宫内电穿孔法可在胚胎10~17日龄(E10~E17)之间应用。在成功构建质粒后, 抽提高纯度的质粒DNA与固绿染料混合, 用玻璃微电极将1~2 μ L DNA混合物注射至胎鼠的单侧脑室, 按选定方向施加方波电脉冲。电脉冲参数一般为: 35~45 V, 30~50 ms, 4~5次, 间隔1 s, 在此范围内随胚胎日龄增加上调参数。可共转染pCAG-EGFP质粒用于了解转染效率。Shinmyo等人^[15]以E15.5胚胎为例, 详细介绍了这一技术的实验流程。子宫内电穿孔实验要避免误电击胎鼠心脏, 手术通常需在1 h内完成, 以提高电转胎鼠的成活率。

3.3 成年期应用

在成年期动物, 脑组织的基因导入主要通过注

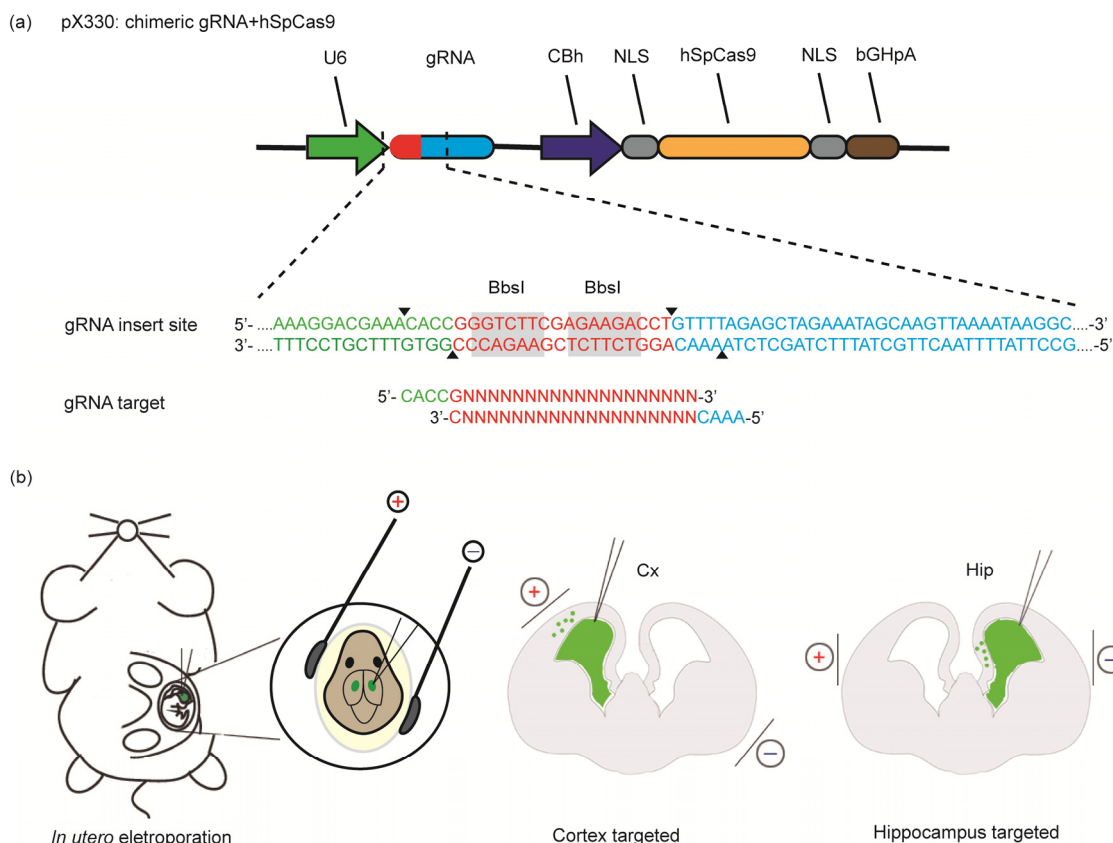


图 2 胚胎期小鼠应用于子宫内电穿孔法在脑部实施CRISPR/Cas9介导的基因编辑。(a) pX330质粒表达框示意图, 质粒序列来自Addgene网页。(b) 子宫内电穿孔技术示意图。利用胚胎期鼠脑的结构特点, 将质粒注射于脑室的不同侧并调整电极位置, 以获得相对的脑区靶向性, 如大脑皮层(Cx)或海马(Hip)

Figure 2 Delivery of CRISPR/Cas9 gene editing system into the mouse brain at the embryonic stage using *in utero* electroporation. (a) The pX330 plasmid widely used *in vivo*. The sequence for the construct is adapted from the Addgene web page. (b) Schematics of applying *in utero* electroporation technique in the brain of mouse embryo. The relative positions of the injection sites and electrode paddles can be adjusted to achieve the targeting of distinct brain regions, such as the cerebral cortex (Cx) or the hippocampus (Hip)

射病毒的方法来实现。腺相关病毒AAV作为一种低毒性、高效率、可定点整合的载体被广泛应用。Swiech等人^[16]详细介绍了如何应用AAV方法在成年小鼠脑实施CRISPR/Cas9基因编辑。以*Mecp2*基因为例,将AAV-SpCas9和AAV-gRNA病毒混合物注射至成年小鼠海马齿状回,2周后大约68%的被感染神经元基因组发生了*Mecp2*基因编辑,*MeCP2*总蛋白水平也下降了60%以上。他们还以*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*为例介绍了多基因编辑,将这3个基因的gRNA分别插于U6启动子之后,再串联起来用AAV包裹,注射后8周有大约35%的被感染神经元发生三基因同时编辑。成年期AAV病毒注射基因编辑方法的有效性随后被多个研究报告所证实^[17,18]。另一方面,如果用LSL (LoxP-Stop-LoxP)元件控制Cas9仅在Cre阳性的神经细胞中表达,可以实现条件性基因编辑。例如, CaMK II α -Cre小鼠脑内注射AAV-LSL-Cas9与AAV-gRNA病毒, Cas9蛋白仅在CaMK II α -Cre阳性神经元中表达,因而仅CaMK II α 启动子活性高的神经元发生了选择性基因编辑。

AAV病毒在体应用已展示高效低毒的优点,但装载容量相对小, Cas9与gRNA通常需要分开包装。有人尝试利用容量较大的整合酶缺陷慢病毒,试图将所有基因编辑元件包装进单一载体。脂质体由于受细胞毒性和效率方面的限制,以往多用于体外实验。近期, Wang等人^[19]采用生物可降解的脂质纳米颗粒包裹负电荷加强的Cas9-gRNA复合物,期望构建改进型脂质体投递系统。

4 神经科学的应用现状

CRISPR/Cas9技术在脑科学中应用已涉及脑基因功能分析、基因敲入小鼠构建以及神经系统疾病研究等多个方面。

4.1 神经科学基础研究

研究蛋白脑内分布的传统方法为免疫染色或者过表达带标签的内源性蛋白。这些传统方法通常会面临一些现实问题,如免疫染色有非特异性交叉反应,或者缺少特异性抗体;过表达则可能改变原蛋白分布。即使采用传统的基因敲入小鼠方法,也常常会因为标记的阳性细胞过密而缺乏亚细胞分辨率。Mikuni等人^[20]将内源性蛋白基因与标签蛋白基因融合,再通过子宫内电穿孔法将CRISPR/Cas9介导的基因敲

入,建立了一个高分辨率、高反差观察内源性蛋白分布的方法。这种技术可以观察定位于细胞核、胞浆、胞膜、细胞骨架、囊泡的各种蛋白质,可通过调整胚胎电穿孔的时机与脑区将技术升级至观察不同脑区、不同类型神经细胞,可与电子显微镜相结合获得纳米级的分辨率,还可利用CRISPR/Cas9技术可多基因编辑的特点同时观察多个蛋白。总之,这种基于CRISPR/Cas9技术的新方法,可以将内源性蛋白脑内分布的研究提升至一个前所未有的水准。CRISPR/Cas9技术如与光遗传学等技术结合,在神经系统实现可诱导的、时空特异性的基因编辑,可应用于脑神经环路的解析研究。

4.2 构建基因敲除/敲入小鼠

用传统技术制备各种基因工程小鼠模型一般费时较长,其中某些技术(如Cre/LoxP技术)在实际应用中十分繁琐。用CRISPR/Cas9技术实施基因敲除/敲入绕开了一些常见的限制,根据不同的研究目的,大致分为3类基因编辑方案,即基因敲除、基因敲入和条件性基因敲除(图3)。

在受精卵期,用CRISPR/Cas9技术产生基因敲除小鼠是以NHEJ机制为主。目前对于这种途径实现基因敲除的实际效果仍然存有一些不足,例如敲除效率低或差异巨大,突变种类复杂多样,仅一部分细胞发生突变等。受精卵单细胞期快速导入有活性的CRISPR/Cas9系统是一种改进措施,可减少嵌合体形成。在局部组织层面,用小鼠海马AAV病毒注射^[16]、胚胎脑电转染质粒^[21]实施CRISPR/Cas9介导的基因敲除通常可获得较高的敲除效率;在脑片组织上甚至实现了完全的双等位基因敲除^[22]。这些研究结果显示局部脑组织可达到较高的基因敲除效率,推测是因为gRNA/Cas9在分化后神经元中持久表达,对靶基因进行了充分的编辑。另需指出,不同实验室报道的基因敲除效果差异很大,可能与敲除系统、检测方法等个体因素有关。

应用CRISPR/Cas9系统制备基因敲入小鼠是基于HDR机制,有方便、快捷的优点,构建时间从常规方法的1~2年大大缩短至3~6月。另外,利用Cas9酶可以结合不同gRNA的特性,可以设计同时敲入多个基因^[23]。CRISPR/Cas9技术也可与其他技术手段结合起来,实现可诱导性(如四环素或他莫昔芬)或组织特异性(如Cre依赖性)基因敲除/敲入。剑桥大学

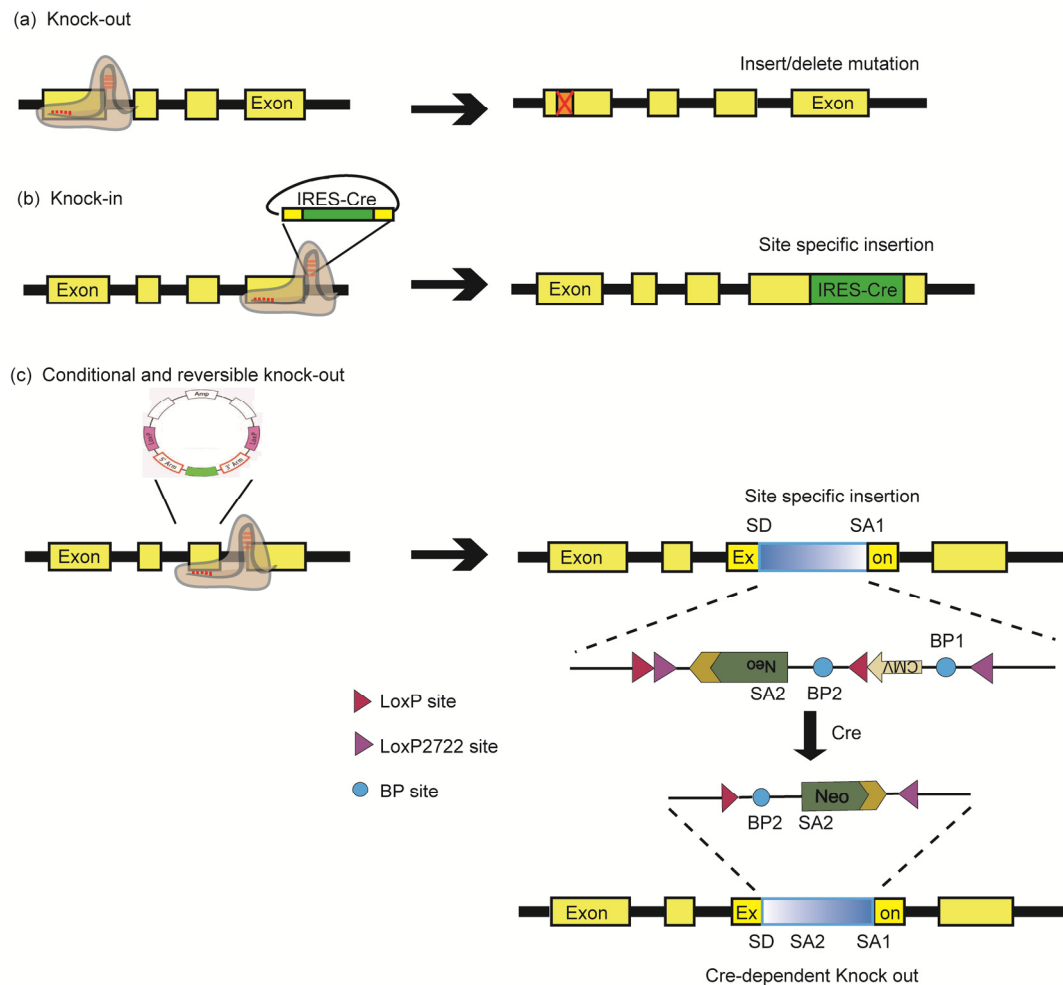


图 3 CRISPR/Cas9 技术用于制备基因敲除/敲入小鼠的 3 种常见方案. (a) 基因敲除. 该方案通过将 Cas9 蛋白, gRNA 二者同时导入受精卵, Cas9 在 gRNA 识别的基因靶点切割 DNA 双链, 细胞主要通过非同源性末端接合机制修复双链断裂, 但易产生插入、缺失、倒位等复杂突变, 干扰靶基因的正常表达. (b) 基因敲入. 该方案在系统中引入了含同源臂的供体模板, 细胞主要通过同源重组机制修复 DNA 双链断裂, 可将目的基因(以 Cre 为例)精确地插入到设计位点. (c) 条件性基因敲除: 该方案利用基因表达调控中的内含子剪切机制, 将筛选基因反向插入到目的基因中, 由于采用内含子方式, 不影响目的基因表达. 内含子中有双 LoxP 位点包裹的抗性或者荧光报告基因表达框, 在引入 Cre 重组酶(注射或 Cre 小鼠)后, LoxP 位点之间的筛选基因表达框翻转, 破坏了目的基因的表达, 实现条件性敲除. 该系统可以升级为条件性基因敲入. IRES, 内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site); SD, 剪接供体(splicing donor); SA1 和 SA2, 剪接受体(splicing acceptor); BP1 和 BP2, 分支点(branching point)

Figure 3 General approaches by using the CRISPR/Cas9 system to generate genetically modified mice. (a) Knock-out: by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygotes, the cells repair the DNA double-strand breaks mainly through non-homologous end joining mechanism which probably cause frame-shift insertion and deletion (indel) mutations. (b) Knock-in: this approach introduces a donor template with two homologous arms. In this case, the double-strand breaks are mainly repaired by homology directed repair mechanism and the template sequence is precisely inserted into the targeted site. (c) Inducible and conditional knock-out: this approach uses the gene expression regulation of the intron cleavage mechanism. The reporter gene is inserted into the target gene as an intron, therefore, this insertion does not affect the target gene expression. When introducing Cre recombinase (by injection or breeding with Cre mice), the double LoxP sites will reverse the screening gene and simultaneously destroy the expression of the target gene, to achieve conditional knock-out. IRES, internal ribosome entry site; SD, splicing donor; SA1 and SA2, splicing acceptor; BP1 and BP2, branching point

Andersson-Rolf 等人^[24]将 CRISPR/Cas9 技术与可翻转的打靶载体 FLIP 相结合, 通过共同导入 CRISPR/Cas9 系统与普适的条件性内含子盒, 建立了 CRISPR-FLIP 一步法, 用于细胞层面可诱导性基因敲除实验,

并可升级至制备条件性基因敲除/敲入小鼠.

4.3 神经系统疾病研究

由于 CRISPR/Cas9 技术有高效、普适的特点, 已

被尝试用于编辑某些遗传性或病毒性疾病的致病基因。脆性X综合征是由于X染色体上*FMR1*基因突变所致的遗传性疾病,表现为智力低下等症状。*FMR1*基因的典型突变为5'-UTR区的CGG序列重复次数过多(如200次以上),最终使*FMR1*基因启动子上游序列异常甲基化,*FMR1*基因失活。Park等人^[25]用CGG重复区上游-17~-15位GGG序列作为PAM设计了gRNA,并将此gRNA/Cas9质粒转染至脆性X综合征患者来源的iPS细胞,虽然只获得2%~3%的编辑效率,但阳性克隆完全删除了*FMR1*基因的CGG重复序列,伴随该基因启动子上游CpG岛显著的脱甲基化,*FMR1*基因转录功能恢复。跟踪研究还发现,被Cas9编辑校正的iPS细胞在诱导为成熟神经元之后,*FMR1*基因依然持续表达。这项实验提示了CRISPR/Cas9技术在治疗某些单基因遗传性疾病中有较大潜力。与之类似,亨廷顿病(HD)的致病相关基因*HTT*位于4号常染色体的短臂,其编码区CAG串联重复序列异常扩展至40个以上将导致疾病。有细胞水平的研究报道,在CAG重复区内由ZFN或CRISPR/Cas9产生DNA双链断裂都引起CAG重复数量继发增减双向变化;nCas9切口酶主要减缩CAG重复数量,但此效应依赖于DNA损伤反应激酶,而与单链断裂修补机制无关^[26]。

CRISPR/Cas9技术已用于在体水平的治疗尝试。美国加利福尼亚州Cedars-Sinai医学中心王少梅实验室^[27]在视网膜色素变性模型S334ter-3大鼠上试验了CRISPR/Cas9介导的在体基因编辑疗效。S334ter转基因大鼠携带了视紫红质基因的一种显性突变S334ter(*Rho*^{S334}),包括334位丝氨酸密码被一个终止密码子替代和羧基端15个氨基酸密码的缺失,模型鼠表现为出生后视网膜外核层感光受体进行性丧失,视觉功能严重下降。在模型大鼠出生当天,一次性向单侧视网膜下区注射靶向*Rho*^{S334}的gRNA-Cas9质粒加电转染,便可成功失活*Rho*^{S334}突变基因,阻遏后期的视网膜退化,改善视觉灵敏度。美国Emory大学李晓江实验室^[28]在亨廷顿病小鼠模型上试验了CRISPR/Cas9基因编辑对该病的疗效。HD140Q基因敲入小鼠在对应的第一个外显子中插入了含140个CAG重复的人*HTT*基因,纹状体神经元核内mHTT突变蛋白在4~6月龄时开始上升,9~10月龄时形成明显的聚集。此研究设计了两个串联的gRNA分别靶向CAG重复的两端侧翼区,与Cas9分别包装在两个AAV病毒载

体中,病毒混合物注射到3或9月龄的纯合子模型小鼠单侧纹状体。结果显示,用CRISPR/Cas9方法治疗可以持久抑制纹状体神经元mHTT突变蛋白表达,排空突变蛋白聚集,减轻早期神经病理表现,改善模型小鼠的运动功能。实际上,蛋白异常聚集是多种神经退行性疾病的一类共同病理特征,例如在帕金森病和Lewy痴呆患者脑中 α -synuclein蛋白聚集,阿尔茨海默病和额颞叶痴呆患者脑中tau蛋白聚集。采用CRISPR/Cas9技术去除此类异常蛋白的表达,能否延缓相关神经退行性疾病的进展,将是未来的研究焦点之一。

5 CRISPR/Cas9技术的发展方向

虽然CRISPR/Cas9技术在编辑基因组上比传统技术更为简便、高效,但在多个方面仍然存在不足或发展潜力,需要继续改进与提升。

5.1 提高非分裂细胞的精确编辑效率

同源重组HDR主要发生在分裂细胞,即使添加了同源臂,重组效率依然不高。在分化后的非分裂细胞如成熟神经元,如何提高CRISPR/Cas9系统对基因组的精确编辑效率是十分重要的现实问题。近期,Salk研究所Belmonte实验室^[29]改进了之前以NHEJ为基础的编辑方法,建立了一个称为同源非依赖性靶向嵌入(homology-independent targeted integration, HITI)方法。HITI方法主要做了如下优化:供体载体中去除细菌性骨架和polyA序列减少敲入基因沉默,供体载体缩小甚至成微环状又提高了目的基因插入效率;供体DNA两端正向包绕gRNA/Cas9靶序列作为切割位点,保证供体DNA以正确方向插入基因组。Cas9融合了核定位信号BPNLS或SV40NLS二分裂体。HITI方法的编辑效率比同源重组方法高,又保持了编辑的精确性,适用于非分裂细胞的基因编辑。将HITI-AAVs混合物注射至10周龄小鼠视皮层,2周后相对编辑效率(占感染细胞数)为10.6%,绝对编辑效率(占细胞总数)为3.5%。该研究小组还在视网膜色素变性的自发模型RCS(皇家外科学院)大鼠中测试了这一技术的有效性。RCS大鼠的视网膜变性是由*Mertk*基因1.9 kb纯合子缺失突变所致。将含*Mertk*基因缺失片段的HITI-AAVs混合物注射到3周龄模型大鼠的视网膜下区,7~8周龄时观察到*Mertk*基因表达水平和视网膜外核层厚度均部分恢复,视网膜电图光反应

也有小幅改善. 中国科学院神经科学研究所杨辉实验室则从优化HDR方向改进, 在800bp同源臂的两端添加gRNA/Cas9切割位点, 这一方法改变虽然在小鼠胚胎干细胞上对基因编辑效率影响不大, 但在星型胶质细胞和原代神经元上基因编辑效率有显著提高^[30]. 作者已将这个改进方法应用于猴胚胎和成年小鼠脑的基因编辑. 微同源介导的末端接合(microhomology-mediated end joining, MMEJ)采用5~25 bp的短同源臂, 但在培养细胞上显示低编辑效率^[31]. 最近, Quadros等^[32]将同源臂改为90nt左右的单链, 在小鼠受精卵期导入展示了较高的编辑效率. 这方面的不断改进将可能产生更加高效、精确的基因编辑方法.

5.2 原位修复单碱基突变

一些遗传性疾病是由碱基点突变引起, 但以往的点突变编辑方法效率较低. 近年来又报道了几种新的“碱基编辑器(base editor)”, 其基本思路是将胞嘧啶脱氨酶与DNA识别蛋白融合. 例如, 选用nCas9切口酶或无活性的dCas9作为DNA识别蛋白, 两者仍通过gRNA识别和结合基因靶点, 但不产生DNA双链切割, 而是由胞嘧啶脱氨酶催化胞嘧啶转化为尿嘧啶^[33]. Kim等人^[34]在全基因组范围检查了一种碱基编辑器(rAPOBEC1-nCas9-UGI, 脱氨酶-Cas9切口酶-尿嘧啶DNA糖基化酶抑制蛋白)的靶点特异性, 发现单个gRNA在人类全基因组仅产生少量的碱基转换位点, 提示碱基编辑特异性良好. 另外还发现, nCas9编辑器的碱基编辑效率高于dCas9编辑器, 但同一gRNA诱导的碱基编辑活性与它诱导的Cas9核酸酶活性之间并不平行, 两个系统的gRNA错配耐受也不相同.

5.3 删除DNA片段的长度限制

基因的大片段缺失突变也被鉴定为某些人类疾病的可能病因. 为了模拟这种大片段缺失的情况, 需要构建长度达几个Mb(百万碱基对)的缺失突变小鼠作为研究模型. 以往, 用受精卵显微注射CRISPR/Cas9系统常规方法所获得的基因缺失突变小鼠, 报道最长的缺失片段为1.2 Mb. 日本学者Kato等人^[35]试验了将两条gRNA(靶向基因大片段的两端)与Cas9蛋白共同注射至小鼠受精卵原核. 这种方法可以产生长达5 Mb的缺失突变胚胎, 但突变效率不高或不稳定, 阳性胚胎的双等位基因缺失突变仅出现于一部分细胞.

5.4 “脱靶”效应受关注

脱靶效应是由于gRNA与DNA靶序列之间允许有个别碱基错配. 目前, gRNA序列的脱靶概率可以通过生物信息学手段加以预测. 例如, 麻省理工学院张峰实验室的网站可帮助用户设计目标基因的gRNA, 在给出推荐gRNA序列的同时, 也预测了脱靶的可能序列. 通过优化gRNA的设计与应用条件, 包括开发高保真的核酸酶, 可以显著提高CRISPR/Cas9系统的特异性. CRISPR/Cas9技术存在潜在“脱靶”效应的程度一直有争议, 但近期的多项研究显示, 在体应用CRISPR/Cas9基因编辑技术诱发脱靶效应的概率并不高^[36,37]. 然而, CRISPR/Cas9技术已开始用于人体临床试验, 安全问题需极其慎重. CRISPR/Cas9系统的“脱靶”程度以及对于基因组稳定性的潜在影响, 未来仍需通过大样本、多中心、严谨深入的基础和临床研究来澄清.

5.5 定向导入神经系统的问题

成年动物在体导入CRISPR/Cas9系统有病毒方式与非病毒方式, 可采取局部注射或全身注射^[38]. 脑科学应用CRISPR/Cas9技术首先需要实现脑靶向, 然后再进一步靶向特定的神经细胞类型或细胞群. 美国加州理工学院的Deverman等人^[39]用一种基于Cre重组的AAV病毒衣壳定向进化方法, 筛选出一个AAV变种AAV-PHP.B, 具有更好的脑靶向特性, 成年小鼠静脉注射后向脑内传送目的基因的能力比以往的AAV9提高40倍以上. 结合已有的可诱导性基因操作系统, 选择性调控细胞内Cas9核酸酶表达, 有可能实现神经细胞类型特异性基因编辑, 但这方面的研究目前还很少. 实际上, 已公布的CRISPR/Cas9临床治疗实验基本上是采用活体细胞体外编辑后再回输的方式(*ex vivo*). 未来, 如何实现高效、安全的CRISPR/Cas9体内递送(*in vivo*), 仍然是一个具有挑战性的难题. 目前研发中的AAV递送系统, 尚待严谨的临床试验来鉴定成效.

6 结束语

目前的CRISPR/Cas9基因编辑技术较报道初期在多个方面已有了显著的改进和扩展, 在神经科学领域也得到了一些初步应用. 未来, 将CRISPR/Cas9技术与光遗传学、药物遗传学、多光子成像、在体神

经活动记录等先进技术相结合,会进一步提升神经科学工作者研究复杂脑环路与脑疾病的能力。随着逐步建立高效可控的脑靶向输送系统,CRISPR/Cas9技术尚有应用于某些神经系统疾病治疗的良好潜力。

参考文献

- 1 Capecci M R. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244: 1288–1292
- 2 Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278
- 3 Burstein D, Harrington L B, Strutt S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 2017, 542: 237–241
- 4 Gao L, Cox D B T, Yan W X, et al. Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 789–792
- 5 Xu S, Cao S, Zou B, et al. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: The structure-guided nuclease. *Genome Biol*, 2016, 17: 186
- 6 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429–5433
- 7 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 8 Salsman J, Dellaire G. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95: 187–201
- 9 Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, 523: 481–485
- 10 Jinek M, Jiang F, Taylor D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, 343: 1247997
- 11 Sternberg S H, LaFrance B, Kaplan M, et al. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 2015, 527: 110–113
- 12 Maruyama T, Dougan S K, Truttmann M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 538–542
- 13 Chen S, Lee B, Lee A Y, et al. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *J Biol Chem*, 2016, 291: 14457–14467
- 14 Raveux A, Vandormael-Pournin S, Cohen-Tannoudji M. Optimization of the production of knock-in alleles by CRISPR/Cas9 microinjection into the mouse zygote. *Sci Rep*, 2017, 7: 42661
- 15 Shinmyo Y, Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. *Curr Protoc Neurosci*, 2017, 79: 3.32.1–3.32.11
- 16 Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, et al. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 102–106
- 17 de Solis C A, Ho A, Holehonnur R, et al. The development of a viral mediated CRISPR/Cas9 system with doxycycline dependent gRNA expression for inducible *in vitro* and *in vivo* genome editing. *Front Mol Neurosci*, 2016, 9: 70
- 18 Murlidharan G, Sakamoto K, Rao L, et al. CNS-restricted transduction and CRISPR/Cas9-mediated gene deletion with an engineered AAV vector. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5: e338
- 19 Wang M, Zuris J A, Meng F, et al. Efficient delivery of genome-editing proteins using bio-reducible lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2868–2873
- 20 Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, et al. High-throughput, high-resolution mapping of protein localization in mammalian brain by *in vivo* genome editing. *Cell*, 2016, 165: 1803–1817
- 21 Straub C, Granger A J, Saulnier J L, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knock-down in post-mitotic neurons. *PLoS One*, 2014, 9: e105584
- 22 Incontro S, Asensio C S, Edwards R H, et al. Efficient, complete deletion of synaptic proteins using CRISPR. *Neuron*, 2014, 83: 1051–1057
- 23 Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc*, 2014, 9: 1956–1968
- 24 Andersson-Rolf A, Mustata R C, Merenda A, et al. One-step generation of conditional and reversible gene knockouts. *Nat Methods*, 2017, 14: 287–289
- 25 Park C Y, Halevy T, Lee D R, et al. Reversion of FMR1 methylation and silencing by editing the triplet repeats in fragile X iPSC-derived neurons. *Cell Rep*, 2015, 13: 234–241

- 26 Cinesi C, Aeschbach L, Yang B, et al. Contracting CAG/CTG repeats using the CRISPR-Cas9 nickase. *Nat Commun*, 2016, 7: 13272
- 27 Bakondi B, Lv W, Lu B, et al. *In vivo* CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 2016, 24: 556–563
- 28 Yang S, Chang R, Yang H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates neurotoxicity in mouse model of Huntington's disease. *J Clin Invest*, 2017, 127: 2719–2724
- 29 Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, 540: 144–149
- 30 Yao X, Wang X, Hu X, et al. Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res*, 2017, 27: 801–814
- 31 Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun*, 2014, 5: 5560
- 32 Quadros R M, Miura H, Harms D W, et al. Easi-CRISPR: A robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biol*, 2017, 18: 92
- 33 Komor A C, Kim Y B, Packer M S, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420–424
- 34 Kim D, Lim K, Kim S T, et al. Genome-wide target specificities of CRISPR RNA-guided programmable deaminases. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 475–480
- 35 Kato T, Hara S, Goto Y, et al. Creation of mutant mice with megabase-sized deletions containing custom-designed breakpoints by means of the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2017, 7: 59
- 36 Hay E A, Khalaf A R, Marini P, et al. An analysis of possible off target effects following CAS9/CRISPR targeted deletions of neuropeptide gene enhancers from the mouse genome. *Neuropeptides*, 2017, 64: 101–107
- 37 Midic U, Hung P H, Vincent K A, et al. Quantitative assessment of timing, efficiency, specificity, and genetic mosaicism of CRISPR/Cas9 mediated gene editing of hemoglobin beta gene in rhesus monkey embryos. *Hum Mol Genet*, 2017, 26: 2678–2689
- 38 Mout R, Ray M, Lee Y W, et al. *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjug Chem*, 2017, 28: 880–884
- 39 Deverman B E, Pravdo P L, Simpson B P, et al. Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 204–209

Summary for “CRISPR/Cas9 基因编辑技术在脑科学中的应用策略”

Strategy for applying CRISPR/Cas9 gene editing technology in neuroscience

ZHANG QiPeng^{1,2} & SUN AnYang^{1*}

¹ Laboratory of Neurodegenerative Diseases & Molecular Imaging, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China;

² School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

* Corresponding author, E-mail: sunay@sumhs.edu.cn

The gene editing technology enables cutting or/and inserting the target gene precisely. The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9) system relies on two major elements, a guide RNA (gRNA) that recognizes a specific DNA sequence, and a nuclease Cas9 that cuts the target DNA and creates double-strand breaks (DSBs). Among a few gene-editing technologies available, CRISPR/Cas9 system has showed tremendous advantages over the others, mainly due to high efficiency of Cas9 and simple design of gRNA. As a versatile and powerful tool for genome engineering, the CRISPR/Cas9 technology has been used to generate genetically modified mice with unprecedented simplicity and speed, simply by timed delivery of Cas9/gRNA ribonucleoproteins (RNPs) into pronuclear-stage zygotes. The modified protocol introduces Cas9 protein instead of Cas9 mRNA by rapid electroporation, which enables the gene editing occurring before the first replication of the mouse genome, thus generating non-mosaic mutant embryos. Furthermore, it could be used to produce multiple gene mutations in a single mouse by co-delivering several gRNAs targeted to different genes. Herein, we summarize current applications of CRISPR/Cas9 technology in the field of neuroscience, and aim to provide concise information and perspectives for better utilizing this technology. In brain research, the CRISPR/Cas9 system can be applied either at the one-cell stage of the fertilized eggs in the form of Cas9/gRNA ribonucleoproteins, or at the stage of embryos or adults in the form of plasmid DNA or the viral vectors (commonly AAV variants) respectively. To deliver the system specifically into the developmental or adult brain, *in utero* electroporation, or stereotaxic injection is commonly employed. Several reports show that AAV-assisted Cas9/gRNA system could achieve a satisfied efficiency for genome editing in the adult mouse brain, but results vary depending on Cas9 activity, gRNA design, detection methods, and the condition of endogenous DNA repair mechanisms. Remarkable efforts have also been made to enhance the incidence of homology-directed repair for precise gene modifications. Regarding therapeutic genome editing, a couple of recent *in vivo* studies demonstrate that CRISPR/Cas9 system could contract or remove disease-causing alleles in animal models of certain hereditary diseases such as retinitis pigmentosa and Huntington's disease, raising hope for translating therapeutic genome editing to clinical patients. In addition, we discuss major challenges and critical improvements for this technology, including a few modifications for promoting precise editing in non-dividing cells in the case of adult brain. In the future, application of CRISPR/Cas9 technology would be enhanced greatly in neuroscience by developing cell type-specific, timed delivery system *in vivo* and by combining with other powerful techniques for dissecting brain neural circuits in health and disease.

CRISPR/Cas9, gene editing, knock-out, knock-in, neuroscience

doi: 10.1360/N972017-00670