DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201603002

· 述评 ·

CRISPR/Cas 靶向编辑技术在遗传性耳聋研究中的应用前景

刘学忠[1,2],牛志杰[1],冯　永[1]

(1. 中南大学湘雅医院 耳鼻咽喉头颈外科,湖南 长沙　410008; 2. 迈阿密大学米勒医学院 耳鼻咽喉科,美国 弗罗里达　33136)

专家简介　刘学忠,美籍华人,籍贯为重庆綦江,华西医科大学医学系本科,英国曼彻斯特大学医学遗传与听力学博士,英国牛津国家医学科学研究院(MRC)基因研究所及帝国理工大学博士后,美国迈阿密大学耳鼻咽喉及外科住院医师专训、国际著名的遗传与耳病专家。美国迈阿密大学终身教授和讲席教授(Miller Endowed Professor)、美国外科学院院士、迈阿密大学耳鼻咽喉头颈外科系科研主任和系副主任、迈阿密大学遗传性耳聋中心主任、美洲华人遗传协会(ACGA)会长(2013－15)、中国杰出海外青年基金获得者、湖南省"芙蓉学者计划"讲座教授及"百人计划"特聘教授。迈阿密大学校长学术奖获得者(Provost's Award for Scholarly Activity),并以第一作者及通信作者在 Nature Genetics、Lancet、Am J HumGenet、Hum Mol Genet、PNAS 等 20 种科学期刊发表了 200 余篇 SCI 科研论文。

摘　要　耳聋是一种常见的公共健康问题,对人类经济和社会造成极大的损失,60% 以上的感音神经性聋由遗传因素导致,遗传性耳聋研究一直是研究领域的热点,本文针对新型 CRISPR/Cas 靶向编辑技术的研究现状,阐述该技术对遗传性耳聋研究的价值,并探讨其未来的应用前景。

关　键　词:基因编辑;聋;遗传性疾病;CRISPR/Cas

中图分类号:R764.43　　**文献标识码**:C　　**文章编号**:1007－1520(2016)03－0179－04

The application of CRISPR-Cas system in studying hearing loss

LIU Xue-zhong, NIU Zhi-jie, FENG Yong

(*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410008, *China*)

Abstract　Hearing loss is one of the most common public-health issue that causes great damage to human economy and society. As estimated, up to 60 percent of prelingual hearing loss is attributable to genetic factors. Hereditary hearing loss is always a hot field of genetic disorders research. In this paper, we describe CRISPR/Cas system currently used for genome editing, and discuss issues pertaining to applications of CRISPR/Cas9 in auditory systems implicated in genetic hearing loss.

Key words: Genome editing; Deafness; Hereditary hearing loss; CRISPR/Cas

耳聋是最常见的感知障碍疾病,影响了全世界 3.6 亿人,约 1/500 的新生儿为耳聋患儿[1]。据估计,超过 2/3 的语前聋病例是由遗传因素引起[2-4]。目前国内外针对非综合征型与综合征型耳聋共定位 150 多个基因位点、克隆 80 多个耳聋基因[5-7]。CRISPR/Cas9 基因组编辑技术惊人的进步预示运用基因组编辑技术研究遗传性耳聋的新时代的开启,

基金项目:美国国立卫生研究院(NIH)重大课题(R01);国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2014CB541702)。
作者简介:刘学忠,男,博士,教授。
通信作者:刘学忠,Email:x. liu1@med. miami. edu;冯永(兼审校),Email:fengyong_hn@hotmail.com

甚至给未来耳聋患者临床治疗提供一种有效的基因治疗方案。

规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromicrepeats,CRISPR)/Cas系统是新一代的靶向基因组编辑技术系统,它是由原核动物RNA引导相关适应性免疫系统演化而来,其突出特征是Cas蛋白,可通过gRNA(guide RNA)的引导下对外源性的DNA进行靶向切割,根据降解外源性遗传物质的方法,CRISPR/Cas系统可分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型。Cas9具有核酸内切酶的功能,是类型Ⅱ CRISPR-Cas系统的一个重要特征,该类型因只需要一个Case9蛋白发挥切割DNA双链的作用,故常被改编为基因组编辑工具,其重复序列可以转录生成特异性CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(trans-acting crRNA)。tracrRNA参与crRNA的成熟过程,并与crRNA形成复合物后共同引导Cas9核酸酶结合并切割入侵的噬菌体和质粒的互补双链DNA序列,从而起到免疫保护作用[8-10]。

DNA双链断裂后可以通过两种内原性修复机制修复:非同源末端连接(NHEJ)和同源重组修复(HDR)[11]。NHEJ是一种易于出错的过程,在快速修复DNA双链断裂的过程中产生许多小的插入和缺失[12]。插入和缺失往往导致编码区的移码突变,最终导致基因敲除。HDR是一个精确的修复过程,需要一个同源的供体DNA作为模板[11]。由于HDR的精确性,可以在基因组水平实现碱基替换、插入[13-14]。另外,HDR也使得在基因组中插入新的目标基因成为可能[15],诱导DNA双链同时断裂可以导致染色体缺失、重复和倒置[16],而不同染色体上DNA双链断裂发生时则导致染色体易位[17]。

CRISPR/Cas9简易的可设计性使其应用上更具前景。首先,通过编码20个碱基对长度的gRNA序列,轻松诱导Cas9核酸酶识别并结合整个基因组上的特定序列,且gRNA还可通过质粒载体克隆扩增。然而,锌指核酸酶(zinc finger nucleases,ZFNs)和转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases,TALENs)两种基因编辑技术,对每个新的目标序列,都需要设计一个新的DNA长片段(500-1500碱基对)来合成相应目的蛋白。此外,由于非特异性核酸内切酶FokI形成二聚体才有内切酶活性,故ZFNs和TALENs都需要合成两个新的蛋白,这两种技术相对而言更为费时低效率。Cas9只需识别与目标序列附近的前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM),即可快速定位结合到目标序列,PAM序列在基因组普遍存在,PAM序列(NGG)平均每8个碱基对有一个,PAM序列(NGG和NAG)平均每4个碱基对有一个[9],这也提高了CRISPR/Cas9靶向修饰的范围。CRISPR/Cas9的另一个优势是通过传递多个gRNA实现多个基因同时编辑,这种方法已经成功应用于哺乳动物细胞、小鼠、斑马鱼以及猴子[18-20]。尽管理论上应用多个ZFNs或者TALEs能达到同样的目标,然而错配形成的二聚体,会增加脱靶效应的几率,限制了这两种技术在多基因编辑领域中的应用[21]。最后,CRISPR/Cas9可以避免的脱靶效应和较小的细胞毒性,拓展了其在基因组编辑中的应用[22]。人类干细胞全基因组分析显示,相对于ZFNs和TALENs,精心设计的gRNA能显著降低脱靶效应[23-24],并且这些脱靶效应都呈gRNA特异性,可通过多种策略进行降低,采用Cas9蛋白与gRNA复合物也可显著降低基因组编辑的脱靶效应[25]。

大多数遗传性耳聋是由单基因突变导致,众多耳聋基因具有不同的功能,包括转录因子、细胞外基质分子、细胞骨架成分、离子通道和转运蛋白[5]。耳聋患者的突变也有多种,如单核苷酸替换、碱基缺失、插入等。这些突变导致耳聋基因的错义和无义突变,从而引起遗传性耳聋(http://hereditaryhearingloss.org/)。这种通过选择性纠正这些变异,阻止听力下降和恢复听力是最理想的根治方法。

研究耳聋相关变异和理解疾病的相关机理,需要各种动物模型。传统的转基因动物模型方法存在时间长、费用大、造模失败率高等问题,一定程度上阻碍了遗传性耳聋的研究。ZFNs, TALENs, and CRISPR/Case基因组编辑技术均可跳过ES胚胎干细胞完成同源重组,其中CRISPR/Case系统尤为普及不仅仅因为它可以实现快速构建动物模型,而是它可以在不同组织中均可以达到很高的编辑效率。短短4年,CRISPR/Case9已经广泛被运用于多种物种,小鼠是研究人类遗传性耳聋的最佳动物模型,并且Harms DW(2015年)建立了基于CRISPR/Cas9构建小鼠模型的标准流程,CRISPR/Case9已经应用于数百种遗传性基因动物模型的构建,无论是组织特异基因变异纠正、敲入SNP的突变细胞系,小片段插入、缺失引起的框移突变等动物模型,而且传统技术不易实现的SNPs、碱基插入和缺失模型,CRISPR/Cas9系统亦可快速高效完成,大大加快了动物模型制备的进程,满足遗传性耳聋动物模型研究与应用日益深入和广泛的要求。

2013 ~2014 年 CRISPR/Cas 已经被运用于各种动物模型的构建,随着 Cas9 选择性编码和质粒载体定制技术的进步,CRISPR/Cas 被推广运用于插入或缺失突变模型、转录调控、全基因组筛查,过去两年,CRISPR/Cas 在基因组插入外源 DNA 的效率明显提高,截止 2016,CRISPR/Cas 是成为一种研究各类遗传性疾病强有力的技术工具,并有望成为一种基因治疗新策略,有些医药企业和公司已新药物研发平台投入研究 CRISPR/Cas 基因组编辑技术的应用。

大多数耳聋基因突变与听觉毛细胞的功能丧失相关。通过转运或表达相应的野生型蛋白来纠正听觉毛细胞中基因突变,或者通过转染表达沉默 RNAs 来敲除突变基因,以避免特定类型耳聋的发生和恶化,意味着耳蜗毛细胞是耳聋基因治疗干预的核心环节。腺病毒(adeno-associated virus,AAV)一直以来是遗传性耳聋基因治疗的常用载体[26],然而其插入片段需小于 4.7kb,这也制约了它的推广应用。体外转录合成 mRNA 转运技术的进步提供了一种颇具前景的新方法,但依然存在免疫原性和 RNA 稳定性的问题。利用病毒转运 Cas9:gRNA,运用 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术敲除显性突变和修复隐性突变可能是恢复听力的一种新型治疗方法[27]。研究人员已经证明通过特异设计的 PAM 寡核苷酸(PAMmers),Cas9 可被引导与特异 RNAs 结合,并不影响相应的 DNA 序列。

据报道,CRISPR/Cas9 已经被运用于纠正杜氏肌营养不良和肝病等遗传病[28-29]。这些研究是通过病毒包装转运 Cas9/gRNA 复合物来实现,结果导致 Cas9/gRNA 复合体永久存在转染细胞中。不过,考虑 CRISPR/Cas9 基因编辑的强大作用,Cas9/gRNA 复合物瞬时转运更为安全,这样既可获得相同基因编辑的效果,又可减少复合物持续存在引发多余基因编辑的相关风险。最新的研究启示,可以通过转运 Cas9/gRNA 类型的蛋白质/核苷酸复合物,启动 CRISPR/Cas9 介导的内耳基因组编辑,探索遗传性耳聋基因治疗。诸多研究提示对特异性细胞进行质粒转运的时间窗是是否成功的关键,CRISPR/Cas 是一种有前景的治疗技术。

Zuris 等[25]通过阳离子脂质体转运系统,将具有靶向基因修饰作用的 Cas9:sRNA 可以直接在注入活体小鼠耳蜗后(Zuris, 2015 年),在原高表达 GFP 的外毛细胞出现明显的 GFP 缺失,证实蛋白质-RNA 复合物可以在局部组织产生有效的基因组编辑效果,由于 Cas9 和 gRNAs 进入细胞而完成基因编辑后会被快速降解,所以既实现了基因水平纠正,又避免了复合物长期存在而带来的潜在风险。遵循此方法设计针对毛细胞的显性基因突变的特异 gRNAs,比如通过 NHEJ 敲除 Usher 1B 中的 Myo7a 基因显性突变,促使听力恢复的可能。目前为止该方法只能有效的针对外毛细胞,另外采用超级电荷蛋白来运载 Cas9/ gRNAs 等方法有可能定位更多的内耳细胞类型。除了通过 NHEJ 敲除显性突变外,一个主要的挑战是提高 HDR 的效率,并应用于隐性突变的纠正。目前活体动物模型中 HDR 的效果尚未可知,且 HDR 在活体动物中的效率很低(<1%),其内耳研究中的可行性仍需进一步的研究证实。

CRISPR/Cas9 在听力研究中应用的一个主要挑战是该技术对 PAM 序列的依赖,如果单核苷酸碱基替换突变序列周围没有 PAM 序列,此时基因编辑便可能受到限制。最常用的 Cas9(S. pyogenes)识别的靶序列要求是 5'-NGG PAM 序列,在人类基因组中平均每 8 个碱基对出现一个 NGG,这便一定程度限制基因靶向编辑的精准度[10]。可行的解决方案是利用其他细菌的 Cas9 来识别不同的 PAM 序列,从而扩展 CRISPR/Cas9 的识别范围,包括来自脑膜炎奈瑟氏菌属(5'-NNNNGATT)、嗜热链球菌属(5'-NNAGAAW)、以及齿垢密螺旋体(5'-NAAAAC)的 Cas9 蛋白[9, 30-31]。仅仅几年,CRISPR/Cas9 技术已经在转化生物医学研究和开发新的遗传疾病的治疗方法上显示出极大的潜力。

CRISPR/Cas 系统成为了疾病机制研究的一种颠覆性遗传工具,并给探索疾病治疗提供了一种新的研究策略。根据该技术的高速发展形势,我们预期基于 CRISPR/Cas 技术的治疗手段将在近两年内投入临床研究。已有报道该技术被应用于培养的 iPSCs 细胞基因纠正,运用 CRISPR/Cas 技术进行基因治疗已在小鼠实验中取得成功,相信在临床应用上也将近期内取得突破[32]。

参考文献:

[1] Mehl AL, Thomson V. Newborn hearing screening: the great omission[J]. Pediatrics, 1998,101(1):E4.

[2] Liu XZ, Xu LR, Hu Y, et al. Epidemiological studies on hearing impairment with reference to genetic factors in Sichuan, China [J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2001,110(4):356 - 363.

[3] Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening--a silent revolution[J]. N Engl J Med, 2006,354(20):2151 - 2164.

[4] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: which ones should be analyzed in DNA diagnostics? [J]. Mutat Res, 2009,681(2-3):189-196.

[5] Yan D, Liu XZ. Cochlear molecules and hereditary deafness[J]. Front Biosci, 2008,13(28):4972-4983.

[6] Hilgert N, Smith RJ, Van Camp G. Function and expression pattern of nonsyndromic deafness genes[J]. Curr Mol Med, 2009,9(5):546-564.

[7] Angeli S, Lin X, Liu XZ. Genetics of hearing and deafness[J]. Anat Rec (Hoboken), 2012,295(11):1812-1829.

[8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science, 2012,337(6096):816-821.

[9] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013,339(6121):819-823.

[10] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013,339(6121):823-826.

[11] Rouet P, Smih F, Jasin M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994,91(13):6064-6068.

[12] Jeggo PA. DNA breakage and repair[J]. Adv Genet, 1998,38(2):185-218.

[13] Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases [J]. Mol Cell Biol, 2001,21(1):289-297.

[14] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases[J]. Nature, 2005,435(7042):646-651.

[15] Irion U, Krauss J, Nusslein-Volhard C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system[J]. Development, 2014,141(24):4827-4830.

[16] Cong L, Zhou R, Kuo YC, et al. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains[J]. Nat Commun, 2012,3(8):968.

[17] Cho SW, Kim S, Kim Y, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases [J]. Genome Res, 2014,24(1):132-141.

[18] Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013,110(34):13904-13909.

[19] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. Nat Biotechnol, 2013,31(8):681-683.

[20] Niu Y, Shen B, Cui Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos[J]. Cell, 2014,156(4):836-843.

[21] Sollu C, Pars K, Cornu TI, Thibodeau-Beganny S, Maeder ML, Joung JK, et al. Autonomous zinc-finger nuclease pairs for targeted chromosomal deletion [J]. Nucleic Acids Res, 2010,38(22):8269-8276.

[22] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity[J]. Nat Biotechnol, 2013,31(9):839-843.

[23] Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA, et al. Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1[J]. Cell Stem Cell, 2014,14(6):781-795.

[24] Smith C, Gore A, Yan W, et al. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs[J]. Cell Stem Cell, 2014,15(1):12-13.

[25] Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, et al. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo[J]. Nat Biotechnol, 2015,33(1):73-80.

[26] Akil O, Seal RP, Burke K, et al. Restoration of hearing in the VGLUT3 knockout mouse using virally mediated gene therapy[J]. Neuron, 2012,75(2):283-293.

[27] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, et al. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9 [J]. Nature, 2014,516(7530):263-266.

[28] Long C, McAnally JR, Shelton JM. Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA [J]. Science, 2014,345(6201):1184-1188.

[29] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype[J]. Nat Biotechnol, 2014,32(6):551-553.

[30] Hou Z, Zhang Y, Propson NE, et al. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from Neisseria meningitidis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013,110(39):15644-15649.

[31] Esvelt KM, Mali P, Braff JL, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing[J]. Nat Methods, 2013,10(11):1116-1121.

[32] Savic N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing[J]. Transl Res, 2016,168(1):15-21.

(收稿日期:2016-03-01)