

DOI: 10.13376/j.cblls/2015012

文章编号: 1004-0374(2015)01-0071-12



朱焕章, 博士, 教授, 复旦大学遗传工程国家重点实验室 PI, 主要从事艾滋病病毒 (HIV) 持续感染的分子机制及抗 HIV 感染的新型药物和生物治疗技术等研究。朱焕章教授及其团队首次提出了基因编辑技术靶向切除整合 HIV 前病毒的“斩草除根”的策略, 设计并获得了一对能特异靶向多数 HIV 亚型基因保守区的 ZFN, 并在体外获得了显著抗 HIV 感染的效果。近几年来, 发表 SCI 期刊论文 40 余篇, 获得授权中国专利 11 项。该研究室的主要研究方向包括: (1) HIV 潜伏的表观遗传学研究; (2) 干预 HIV 潜伏的药物筛选及其作用机制; (3) 抗 HIV 的细胞基因治疗。

基因编辑技术在基因治疗中的应用进展

季海艳, 朱焕章*

(复旦大学生命科学学院遗传学研究所, 上海 200438)

摘要: 基因治疗领域面临关键问题之一是缺乏理想的靶向基因修饰技术, 而基于锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活子样效应因子核酸酶 (transcription activator like effector nucleases, TALENs)、规律性重复短回文序列簇 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (Cas9), CRISPR/Cas9] 等基因编辑技术可以对基因组进行高效靶向修饰, 因而, 基因编辑技术将成为基因治疗领域研究的有用工具。现就基于基因编辑技术在基因治疗中的应用进展做一综述。

关键词: 基因编辑; 基因治疗; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas9

中图分类号: Q789; Q819

文献标志码: A

Progress of genome editing approaches towards gene therapy

Ji Hai-Yan, ZHU Huan-Zhang*

(Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: One of the key issues towards gene therapy is short of ideal targeted genetic modification technologies. However, gene editing techniques including zinc finger nucleases, transcription activator like effector nucleases and CRISPR/cas9 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated (Cas9)] achieve targeted gene modification efficiently, thus gene editing technologies will become a useful tool in the field of gene therapy. A brief overview of recent advances relating gene targeting methods in gene therapy is provided below.

Key words: gene editing; gene therapy; ZFNs; TALENs; CRISPR/Cas9

随着生命科学与技术的飞速发展, 以及人类对疾病认识的不断深入, 越来越多的证据表明, 许多疾病都与基因的结构或功能改变有关, 因而, 萌生了从基因水平治疗疾病的念头和梦想。基因治疗是指通过操作遗传物质 (无论是人类本身的或外源的) 来干预疾病的发生、发展和进程, 包括替代或纠正

人自身基因结构或功能上的错乱、杀灭病变的细胞或增强机体清除病变细胞的能力等。基因治疗能从根本上治愈一些现有的常规疗法所不能解决的疾

收稿日期: 2014-09-30

*通信作者: E-mail: hzzhu@fudan.edu.cn

病,不仅在疾病的治疗方面,而且在疾病的预防方面发挥重要作用。1990年,美国FDA批准了由French Anderson主持的世界上第一个“治疗基因”转移的正式临床试验方案,对一例因ADA(腺苷酸脱氨酶)基因缺陷导致严重免疫缺损的4岁女孩进行基因治疗,并获得初步成功,从而在全世界掀起了基因治疗的研究热潮。截至2013年底,全世界已批准的基因治疗临床试验方案达到了1800个。然而,批准上市的仅2个产品:一个是我国药品管理局SFDA于2004年1月批准的世界第一个基因治疗产品——“重组人p53腺病毒注射液”;另一个是2012年7月欧洲药品管理局EMA批准的荷兰uniQure公司研发的Glybera药物,用于治疗脂蛋白脂酶缺乏。基因治疗产品上市寥寥无几的现象说明了该领域面临许多问题,其关键问题之一是由于目前基因治疗方案大多采用逆转录病毒载体,其插入或整合到染色体的位置是随机的,有引起插入突变及细胞恶性转化的潜在危险。理想的基因治疗方案应该是在原位补充、置换或修复致病基因,或者将治疗基因插入到宿主细胞染色体上不致病的安全位置。传统的基因靶向修饰技术依赖于自然状态下的同源重组(homologous recombination, HR)途径实现对基因组内源性基因的定点敲除或者替换,但其效率非常低,约为 10^{-6} ,因而,大大限制了该技术的应用^[1]。为了提高基因组定向修饰效率,研究人员曾建立Flp/FRT、Cre/loxP和细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)载体等系统介导对靶基因的定点修饰。这些系统介导的基因组靶向修饰在多种高等真核生物细胞和模式生物中得以应用。虽然重组酶系统介导的基因靶向修饰相对传统的靶向修饰技术,其重组效率有所提高,但是在一定程度上还存在耗时、操作复杂、效率低和应用范围局限等不足^[2-6]。RNAi(RNA interference)技术具有快速、操作便捷、成本较低等优势,在基因功能及基因治疗研究中发挥着重要作用。该技术主要通过效应因子小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)来降低或者是沉默目的基因的表达。然而, RNAi介导的基因干扰持续较短,有时会受到实验条件的干扰,若想持久抑制或者敲除基因并非最佳选择^[7]。因此,在基因治疗领域亟需发展新的基因组靶向修饰系统用以对目的基因进行持久、特异编辑以达到治疗的目的。近年来,基因组编辑技术,如ZFNs、TALENs和最新的CRISPR/Cas9系统的相继出现给基因治疗领域面临的上述问题开辟了新

的途径。下面将基因编辑系统的作用原理及其在基因治疗领域中的应用、存在的问题及展望作一扼要综述。

1 基因编辑技术的结构和作用原理

ZFNs、TALENs和CRISPR/Cas9系统皆是通过在特定的靶向序列处引入双链断裂的(double strand break, DSB)缺口,继而通过细胞内两种DNA修复机制完成修复:NHEJ途径(non-homologous end joining, NHEJ)会使基因组DNA缺口处有碱基的插入或者缺失,造成移码突变,导致基因的敲除;HR途径在提供外源DNA模板的条件下会使基因组DNA得到精确的基因修复或靶向基因的添加(图1)。

1.1 ZFNs

每个锌指核酸酶单体是由位于C末端的非特异性切割结构域Fok I和位于N端的特异性识别DNA的锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)以及连接DNA结合结构域和内切酶的一段小肽组成^[8-9]。ZFN的特异性取决于锌指蛋白,获得高效、特异性的ZFN的前提便是筛选高质量的锌指蛋白^[10-13]。目前锌指蛋白的筛选方法主要有Sangamo Biosciences公司提供的专利技术(可由Sigma公司订购该服务)和锌指协会开发的资源免费共享平台(Oligomerized Pool Engineering, OPEN)^[14-16],研究人员可根据自己需要筛选特定锌指蛋白。ZFP通常由3~6个锌指组成,每个锌指识别基因组中连续的3个碱基,因此,两个ZFN共可以识别18~36个碱基。ZFP一旦与基因组中的特定序列结合,Fok I核酸内切酶便会在DNA双链中形成二聚体发挥内切酶活性,产生双链切口DSB,继而通过细胞内修复机制对断裂部位的基因进行修饰^[17-20](图1)。

1.2 TALENs

基因编辑技术在靶向修饰方面飞速发展,2009年,研究人员发现植物病原体黄色单胞杆菌Xanthomonas编码的转录激活因子效应物TALE(transcription activator like effector)的氨基酸序列与基因组中的核酸序列有较恒定的对应关系。TALE由N-端转座结构域(translocation domain)、与DNA结合相关的中央区域(central region of tandem direct repeats)以及C-端转录激活结构域(transcription activation domain)组成。而中央DNA结合结构域包含15.5~19.5个单元模块,其中每个模块单元有34个氨基酸残基,除第12和13位氨基酸可变外,其他氨基酸都是保守的,因此,这两个氨基酸被称

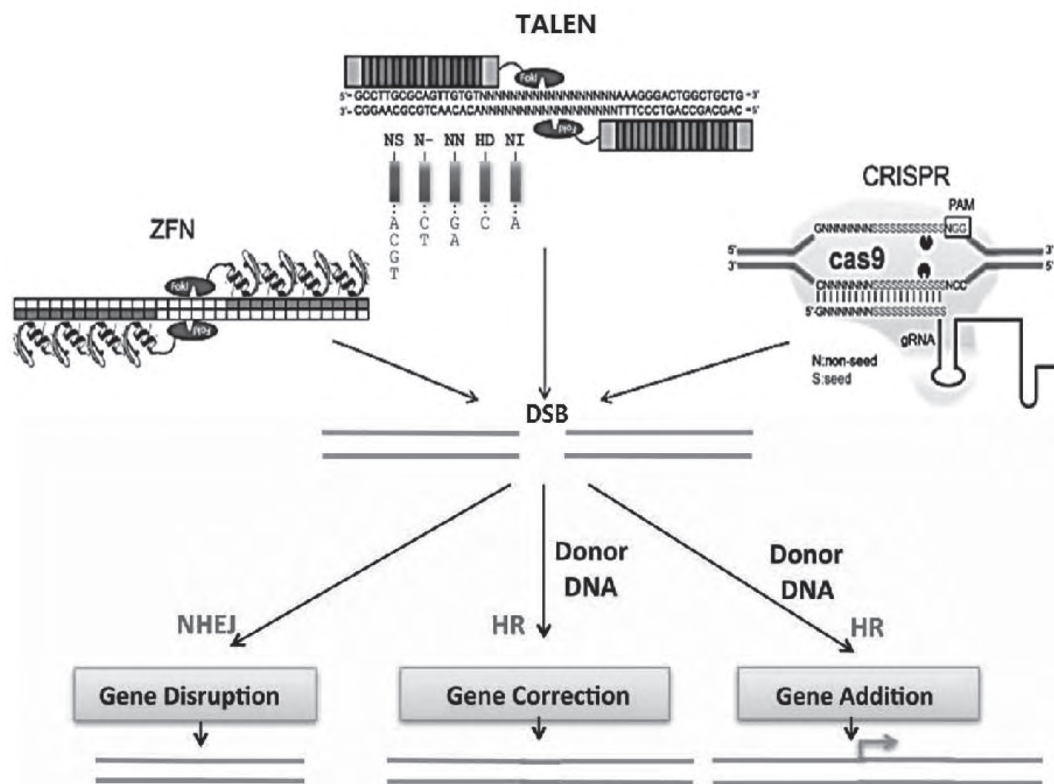


图1 基于基因编辑技术的基因靶向修饰

作重复可变的双氨基酸残基 (repeat variable di-residues, RVDs) 位点^[21]。TALEN 特异识别 DNA 的原理在于 RVD 可以与 DNA 中的 4 种碱基之一进行结合。目前发现 RVD 与 DNA 碱基的对应关系如下: 组氨酸 - 天冬氨酸特异识别碱基 C, 即 HD (His Asp)-C; 天冬酰胺 - 异亮氨酸识别碱基 A, 即 NI (Asn Ile)-A; 天冬酰胺 - 甘氨酸识别碱基 T, 即 NG (Asn Gly)-T; 天冬酰胺 - 天冬酰胺识别碱基 G 或 A, 即 NN (Asn Asn)-G 或 A; 天冬酰胺 - 赖氨酸识别碱基 G, 即 NK (Asn Lys)-G; 天冬酰胺 - 丝氨酸可以识别 A、T、G、C 中的任一种 NS (Asn Ser)-A、T、C、G^[22-23]。2010 年, 研究者利用 *Xanthomonas* 中 TALE 模块与 DNA 序列对应的关系, 将 Fok I 核酸内切酶与 TALE 模块相连, 构建靶向基因组中预设的 DNA 靶位点的重组核酸酶 TALENs, TALEN 的 DNA 结合结构域将每个模块单元固定在识别序列上, 异源 Fok I 形成二聚体切割 DNA 双链^[24-25](图 1)。

1.3 CRISPR/Cas9

伴随着对基因打靶技术深入的研究, Qi 等^[26]发现一种更加简便的基因编辑工具——CRISPR/Cas 系统。该系统主要根据细菌或是古细菌中对外源入侵分子防御系统改造而成, 可通过蛋白质和

RNA 的复合物对基因组中特定序列进行切割。应用比较广泛的是 II 型系统 *Streptococcus pyogenes*——SF370。其 5' 端为 tracrRNA (trans-activating crRNA) 基因, 中间为 Cas9 蛋白编码基因, 3' 端为 CRISPR 基因座。Cas9 蛋白的 N 端和中部有发挥切割活性的功能结构域; CRISPR 基因座包括前导序列 (leader)、间隔序列 (protospacers) 和重复序列 (direct repeats)。前导序列执行启动子的功能, 间隔序列捕获外源 DNA 分子的一小段并将其整合在两个重复序列之间, 以便与外源 DNA 配对^[27]。该系统在寻找候选靶点时一般遵循 5'-GN₁₉-NGG-3' 的原则。NGG 被称为 PAM (protospacer adjacent motif)。CRISPR 基因座转录成前体 RNA (pre-crRNA), 与其重复序列互补的 tracrRNA 也同时转录出来, 其 5' 端与经 Cas9、RNase III 核酸酶加工成熟的 crRNA 的 3' 端有约 13 bp 的配对。crRNA、tracrRNA 和 Cas9 组成复合体, 识别并结合于 crRNA 互补的 DNA 序列。在后续实验中研究人员将 tracrRNA 和成熟的 crRNA 表达为一条嵌合的向导 RNA (guide RNA, gRNA), 模拟天然 crRNA 和 tracrRNA 形成的茎环结构, 并在体外证明 gRNA 可以发挥各自的功能。Cas9 蛋白含有 RuvC 和 HNH 两个活性位点。HNH

负责与 crRNA 互补链的切割, 切割位点多数在 PAM 上游第 3 个碱基外侧。RuvC 负责非互补链的切割, 切割位点在 PAM 上游的 3~8 碱基之间。若将 Cas9 两个活性位点之一 (D10A 或 H840A) 突变便只能切割单链^[28-31] (图 1)。

2 基因编辑技术在基因治疗中的应用

基因治疗是基于对细胞内基因修饰的策略来治疗各种疾病。单基因疾病是由于碱基突变引起, 可通过恢复基因的表达水平实现疾病的治疗。而多基因疾病的治疗相对来说比较困难。传统的基因治疗手段通过正常基因的导入弥补缺陷基因, 但是基因导入的效率又是一个难题。随着病毒载体发展和应用, 研究人员试图通过病毒载体介导基因导入用以对疾病的基因治疗。其中逆转录病毒介导的基因治疗首先进入临床。之后, 慢病毒 (lentiviruses)、腺病毒 (adenoviruses)、腺相关病毒 (adeno-associated viruses, AAVs) 等也在基因治疗临床中予以试验。例如, 逆转录病毒介导患有腺苷脱氨酶严重联合免疫缺陷症 [adenosine deaminase (ADA)-severe combined immunodeficiency, SCID] 和 X-连锁重度联合免疫缺陷症 (X-linked severe combined immunodeficiency, SCID-X1) 的 CD34⁺ 骨髓细胞的修饰^[32]、慢病毒介导患有地中海贫血症 (β -thalassemia) 的 CD34⁺ 骨髓细胞的纠正^[33]、尾静脉注射 AAV 载体治疗血友病 B (hemophilia B)^[34]。虽然, 诸如逆转录病毒一类的治疗载体可以将所需目的基因整合到基因组中, 持久表达用以代替缺陷基因, 但是, 逆转录病毒的整合具有随机性, 倘若引起原癌基因的激活引发癌症, 那么它的安全性将受到质疑。寻找特异、高效修复的打靶工具在基因治疗领域中备受关注。基因编辑技术的出现和应用为人类疾病的治疗提供有力的手段。主要途径是通过体外纠正致病基因并回输体内用于疾病治疗研究。近年来 ZFNs、TALENs 和 CRISPR/Cas9 系统在遗传性疾病、传染性疾病和癌症方面取得许多可喜的成绩, 并推动了基因治疗领域发展的步伐。

2.1 遗传病

2.1.1 杜氏肌营养不良 (duchenne muscular dystrophy, DMD)

DMD 这种单基因遗传病仅仅通过基因打靶工具对移码突变的表达框进行纠正即可, 不需要外源供体 DNA 模板的辅助。DMD 疾病是由于移码突变导致编码基因不能正确形成有功能活性的抗肌萎缩

蛋白 dystrophin。针对这一疾病机理, Ousterout 等^[35]针对性地设计靶向 *dystrophin* 基因 5 号外显子的 TALEN, 通过该技术介导基因修复实现该基因的正确翻译并形成有功能的抗肌营养不良蛋白。结果证实, 经 TALEN 纠正后的靶细胞 (骨骼肌成肌细胞、皮肤成纤维细胞) 可以正常表达 *dystrophin* 基因并形成相应的组织器官。此外, 该项技术介导的基因修饰对其靶细胞没有毒性效应。

2.1.2 帕金森疾病 (Parkinson's disease, PD)

α -突触核蛋白 (α -synuclein) 是在 PD 发病中发挥关键作用的蛋白质, 其基因的点突变可直接导致常染色体显性遗传的家族性、早发性 PD, 而异常聚集的 α -突触核蛋白是在散发性和家族性 PD 中常出现的特征性病理变化。来自怀特海德生物医学研究所的研究小组利用 ZFN 在不改变 hiPSC 细胞基因组中其他部分的前提下, 针对 α -突触核蛋白基因点突变致病位点插入或是删除单个碱基对, 从而成功对 PD 疾病进行基因治疗, 该项技术与 iPSC 技术结合使用在疾病基因治疗中显示出巨大的潜力^[36-37]。

2.1.3 大疱性表皮松解 (epidermolysis bullosa, EB)

大疱性表皮松解疾病是一种因皮肤和黏膜对机械损伤易感而形成大疱为特征的遗传性皮肤病。针对这一发病机制, Wang 等^[38]基于 ZFN 基因治疗技术在体外将引起皮肤起疱的缺陷性基因关闭, 使其失活。为了能够验证该方法的有效性, 研究人员首先利用基因工程手段将其皮肤干细胞改造成携带有绿色荧光蛋白的皮肤细胞, 随后用 ZFN 进行处理, 结果显示每 5 个处理的细胞就会有一个荧光蛋白不表达的细胞, 随着 ZFN 剂量的加大, 皮肤干细胞再生潜力依然保持。隐性营养障碍大疱性表皮松懈症 (recessive dystrophic epidermolysis bullosa, RDEB) 主要是由编码胶原蛋白 VII 的 *COL7A1* 基因缺陷所致。研究人员在原代纤维母细胞中通过 TALEN 介导的 HR 途径对突变基因 *COL7A1* 进行纠正, 结果显示纠正后的细胞可以正常表达胶原蛋白 VII, 同时基因组扫描测序显示 TALEN 导致的脱靶位点有 3 处, 该项结果证实 TALEN 介导的位点靶向修饰在基因治疗领域中显示了一定的安全性和特异性^[39]。

2.1.4 α 1-抗胰蛋白酶缺陷症

α 1-抗胰蛋白酶缺陷症 (α 1-antitrypsin, A1AT) 是因血中抗蛋白酶 α 1-AT 缺乏引起的一种先天性常染色体遗传代谢病。针对这一发病机制, 2011 年, 研究人员基于 ZFN 基因编辑技术以患者皮肤细胞来源的 iPSCs 中的缺陷 A1AT 基因为靶点进行纠正,

通过 HR 途径将利于阳性重组子筛选的正负标记基因插入到基因组中,最后再通过转座酶 (transpose) 将其外源插入片段从细胞中剔除,在靶位点处不存在 DNA 被破坏的痕迹,最终获得由 hiPSC 转化后的肝细胞。随后,研究人员在试管和小鼠实验中证实 ZFN 纠正后的肝细胞活力很好,从而证明基于 ZFN 技术可以实现对 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶基因缺陷引起的肝病的基因治疗^[40]。这一事例也用 TALEN 技术得到证实^[41]。

2.1.5 X连锁的严重联合免疫缺陷

ZFN 在人干细胞中的优化和筛选为该技术介导的单基因遗传性疾病的治疗提供了有力的手段。目前对遗传病的治疗可以通过外源基因对疾病基因进行修饰,从而恢复正常基因的表达水平。该技术介导的遗传性疾病的治疗的实例较多,其中 ZFN 技术针对引起 X 连锁的严重联合免疫缺陷 (X-linked form of severe combined immunodeficiency, X-SCID) 的白介素 2 受体链 (interleukin 2 receptor gamma chain, IL2RG) 突变基因进行修饰为一个例子。Urnov 等^[42]通过 ZFN 介导的 HR 途径在慢性髓原白血病细胞 K-562 中对两条 X 染色体中第 5 号外显子突变的 IL2RG 基因进行纠正,约有 7% 的突变基因恢复到原有基因的表达水平。而在体内观察经 ZFN 纠正后的细胞相对原始突变的细胞具有一定选择的优势,因此,该技术介导突变基因 IL2RG 的纠正可为该疾病的基因治疗提供新的前景。2014 年,Genovese 等^[43]首先通过细胞因子对 HSCs 细胞进行 48 h 的预刺激,目的有两个:一是降低预处理的细胞对核酸酶的进入引起的毒性效应的敏感性;二是促使细胞进入到细胞周期介导同源重组。随即在第二天利用非整合型慢病毒载体将用于对突变基因 IL2RG 纠正的 DNA 模板导入细胞中,随后通过电击方法对细胞进行锌指核酸酶基因转染。此外,为了保持干细胞状态,避免其过早分化,该课题组成员用两种芳(香)烃受体蛋白抑制剂 dmPGE2 和 SR1 处理了细胞,这一实验方案使得研究人员在 HSCs 细胞中实现位点特异性基因组编辑,并在免疫缺陷小鼠模型体内证实,经 ZFN 修饰的 HSCs 可以维持正常的造血功能并生成有功能的淋巴细胞。这一可喜成果为治疗 SCID-X1 和其他基因缺陷疾病开辟了一条新途径,解决了 HSC 这些静息细胞编辑效率低下的局限。Matsubara 等^[44]利用 TALEN 技术在 IL2RG 基因缺陷的细胞模型中也成功实现了基因的纠正。

2.1.6 镰刀型细胞贫血症(sickle cell anemia, SCD)

血红蛋白疾病是由血红蛋白分子突变致使结构或合成异常引起的一类疾病,包括血红蛋白病和地中海贫血两大类。前者表现为镰刀状贫血症,其血红蛋白分子的珠蛋白肽链结构异常,主要是由人 β 球蛋白基因 (human β -globin) 点突变引起的遗传性疾病。研究人员基于 ZFN 技术针对致病基因 HBB 进行修饰^[45-46],试图从基因修复这一角度验证该项技术是否可以对突变基因进行替换,结果显示该项技术介导突变基因 HBB 的纠正效率达到 40%,同时,未检测到明显的脱靶现象,而且纠正后的细胞的分化潜能依然存在。最近, Suzuki 等^[47]基于 TALEN 技术以患者皮肤细胞来源的 iPSCs 中的突变 HBB 基因为靶点进行纠正,通过 HR 途径在识别靶位点处插入外源片段利于重组子的筛选,为了不在基因组中留有异常序列 (ectopic sequences),通过转座酶将其从基因组中再剔除。经 TALEN 纠正后的 hiPSCs 可以保持完整的分化潜能和正常的核型。最新结果显示,分别使用第三代腺病毒载体 (helper-dependent adenovirus vector, HDAdV)、TALEN 和 CRISPR/Cas9 三种不同工具,对 SCD 患者的 hiPSC 中的突变基因 HBB 进行纠正,这 3 种基因纠正方法介导的打靶效率相近。此外,全基因组深度测序结果显示,TALEN 和 HDAdV 在对突变基因纠正过程中显示的脱靶效应较低。为了能够提高基因靶向修饰效率,研究人员将 TALEN 和 HDAdV 整合在一起,构建一种兼有特异切割基因组 TALEN 和高效导入途径的 HDAdV 整合载体。实验结果表明,重组打靶载体介导的基因纠正效率要比单独使用 TALEN、CRISPR 高很多,相信该项技术的不断优化,会在不同种类的血红蛋白疾病的基因修复过程中得到广泛应用。

2.1.7 X连锁慢性肉芽肿病

慢性肉芽肿 (chronic granulomatous disease, CGD) 为少见的一种遗传性疾病,分为 X 连锁 CGD (X-CGD) 和常染色体隐性遗传 CGD 两种。X-CGD 为最常见的一种类型,其致病基因为编码还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADPH 亚单位 gp91-phox 蛋白的 CYBB 基因。研究人员通过 ZFN 对 X-CGD 症来源的 hiPSCs 中的致病基因进行修饰,结果显示纠正后的细胞分化形成的中性粒细胞表型与正常的很相似,具有抵抗外界菌源的作用^[48]。

2.1.8 血友病

血友病为一组遗传性凝血功能障碍的出血性疾病

病,其共同的特征是活性凝血活酶生成障碍、凝血时间延长、终身具有轻微创伤后出血倾向,重症患者没有明显外伤也可发生“自发性”出血,分为血友病 A、血友病 B 和血友病 C 3 种。血友病 B 是一种肝脏缺乏凝血因子 IX 的 X-连锁的遗传出血性疾病,主要特征为凝血因子 IX 表达水平极低,不足正常水平的 1%。多种基因治疗手段在该疾病前显得束手无策。ZFN 的出现为突变型凝血因子 IX 表达水平的修复提供了希望。Li 等^[49]通过 AAVS 病毒载体将靶向凝血因子 IX 的 ZFN 导入其缺陷的人源小鼠模型中,通过 ZFN 介导 HR 途径对突变基因凝血因子 IX 基因 F9 进行替换,并以血浆中的凝血因子 IX 表达水平是否升高为最终纠正指标。结果显示,经 ZFN 介导修饰的小鼠的血液在近乎正常的时间内凝结,这些小鼠中的凝血因子表达水平约为正常水平的 6%~7%,足以维持正常的凝血功能。而未经 ZFN 介导修饰的小鼠维持正常凝血功能的时间仅六周。Park 等^[50]基于 TALEN 技术在 hiPSC 细胞将含有 F8 基因的 140 kb 染色体片段倒置,旨在建立人源化的小鼠血友病 A 模型。此外,为了能够更好地验证 TALEN 技术可以纠正该疾病致病基因,研究人员再次通过 TALEN 基因编辑工具将其之前倒置的 140-kb 的染色体片段再重新恢复到正常,结果显示经 TALEN 纠正修饰的疾病细胞可以检测到 F8 基因的 mRNA,而未经 TALEN 介导修饰的细胞却未检测到 F8 基因的 mRNA。该项结果提示,TALEN 基因编辑工具既可以建立疾病模型,又可以介导疾病的再次纠正。

2.1.9 β -地中海贫血症

β -地中海贫血症(β -Thalassemia, β -Thal)是由于编码 β 珠蛋白的基因突变或是碱基缺失造成的一种血液病。全球约有 4.5% 的人群携带有这种突变基因,对全球卫生健康构成一定的威胁。纠正疾病基因将是此疾病治疗的一个理想靶点。Ma 等^[51]以患者来源的 hiPSCs 为靶细胞,通过 TALEN 技术对疾病基因 *HBB* 进行纠正,用以完成对疾病基因的治疗。结果显示,该项技术介导修饰的 hiPSCs 中的突变基因得到修复,同时,这些细胞保持着分化成造血干细胞的潜能,进一步形成能够正常表达 β 珠蛋白的成红细胞。

2.1.10 遗传酪氨酸血症

遗传酪氨酸血症(hereditary tyrosinemia),又称先天性酪氨酸血症(症),是一种因富马酰乙酐乙酸盐水解酶(fumarylacetoacetate hydroxylase, FAH)缺乏

引起的酪氨酸代谢异常、肝严重损伤及肾小管缺陷的常染色体隐性遗传性临床综合征。急性患者有肝大、肝细胞脂肪浸润或坏死症状;慢性患者可有肝纤维化、肝硬化,甚至发生肝癌。Yin 等^[52]利用 CRISPR/Cas9 技术对携带突变 FAH 酶的成年小鼠模型中的肝细胞中的突变基因 *FAH* 进行纠正修复,通过高压注射方法(hydrodynamic injection)快速将这些纠正后的细胞释放到静脉中,最后回流肝细胞中用以纠正疾病。该项研究结果显示,纠正后的正确基因插入到了 1/250 的肝细胞中,在后续的 30 天中,正常 *FAH* 基因的细胞正常增殖,取代病变的细胞,最终占据约 1/3 的肝细胞,使小鼠能够在脱离 NCTB 药物后生存下来。

2.1.11 白内障遗传疾病

老化、遗传等因素会引起晶状体囊膜损伤使其渗透性增加,丧失屏障作用或导致晶状体代谢紊乱,使晶状体蛋白发生变性,形成混浊而导致白内障。中科院上海生化与细胞所李劲松课题组选择小鼠白内障遗传疾病模型进行研究。该模型小鼠携带显性突变的 *Crygc* 基因,随后因产生变性的晶状体蛋白而发生晶状体混浊,携带一个突变位点的新生小鼠即表现出症状。研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术设计针对突变基因的单导向 RNA,将它与 Cas9 核酸酶直接注入受精卵,发现 1/3 新生小鼠的白内障症状得到治愈。白内障小鼠治愈后,也能通过生殖细胞将修复的基因传递给下一代,证明白内障遗传疾病可被根治^[53]。

2.2 传染性疾病

2.2.1 艾滋病

艾滋病病毒(HIV)感染细胞需要首先与主受体外的辅助受体 CCR5/CXCR4 结合。“柏林”患者的成功治愈提示了通过 CCR5/CXCR4 敲除产生修饰细胞对 HIV 耐受的基因治疗的可能性。

2.2.1.1 CCR5 靶点

对于 HIV-1 基因治疗而言,敲除 CD4⁺T 细胞和 CD34⁺HSCs 细胞表面的 CCR5 分子是一个理想的出发点。Perez 等^[54]通过 ZFN 介导 50% 的原代 CD4⁺T 细胞表面的 CCR5 分子敲除,脱靶效率 <5%。经体外扩大培养修饰的 CD4⁺T 细胞回输到免疫缺陷 NOG 小鼠后,表现出明显的抗病毒能力。Holt 等^[55]通过核转将 ZFN 导入 CD34⁺HSCs 细胞对 CCR5 基因进行定点修饰,并将修饰后的 HSCs 回输到免疫缺陷的 NSG 小鼠中,发现小鼠体内免疫细胞被激活、数量增多,表现出良好的抗病毒效

果。ZFN 介导的 *CCR5* 基因修饰已经在人类造血干细胞中取得成功。Yao 等^[56] 相继证实 ZFN 也可以在 ESCs 和 iPSCs 中对 *CCR5* 基因进行定点修饰。此外, Lambardo 等^[57] 利用非整合型慢病毒 (integrase-defective lentiviral vector, IDLV) 载体介导 ZFN 靶向修饰 HSCs 细胞中的 *CCR5* 基因, 纠正效率约为 5%。在后续报道中, 该课题组利用 Ad5/35 嵌合型腺病毒载体介导 ZFN 对原代 T 细胞 (primary T cells)、人类神经干细胞 (human neural stem cells, hNSCs) 和 iPSCs 中的 *CCR5* 基因进行纠正。Li 等^[58] 在体外通过腺病毒介导 ZFN 靶向修饰经蛋白激酶 C 刺激的成人造血干细胞 (adult hematopoietic stem cells, adult HSCs) 表面的 *CCR5*, 敲除效率 >25%, 回输到 NSG 小鼠模型后表现出抗 HIV/AIDS 的能力。最近, 由宾夕法尼亚大学医学院 Pablo Tebas 研究小组^[59] 采用 Sangamo BioSciences 公司开发的靶向 *CCR5* 基因的 ZFN (SB-728-T) 对从 12 名 HIV 感染者体内提取的未被感染的 T 细胞进行修饰, 并回输到患者体内用以检测抗感染效果。研究人员将这 12 名感染者分为两组, 每组 6 人, 每人一次性输入 100 亿个 T 细胞, 其中一组 4 周后停止服用抗逆转录病毒药物 12 周。结果表明在停药的 6 名感染者中, 4 人体内的 HIV 病毒数量变少, 1 人由于先天存在 *CCR5* 突变基因使得病毒检测结果显示阴性, 提示基因编辑技术治疗艾滋病的有效性及其可行性。

Ye 等^[60] 利用 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术以人源 *CCR5* 基因为靶点, 在 hiPSC 中形成 *CCR5* 天然缺失的突变细胞, 并将其诱导成单核巨噬细胞。结果显示, CRISPR/Cas9 和 TALEN 对单等位基因敲除效率为 100%, 而对双等位基因的敲除效率分别为 14% 和 33%, 均获得了抗 HIV-1 的单核巨噬细胞。相对之前的 HIV-1 基因治疗而言, 这种方法克服了 HSC 细胞分离困难的局限, 可以利用正常健康的 hiPSC 细胞诱导分化成 *CCR5*Δ32 缺失的抗 HIV-1 细胞, 并剔除了 *CCR5* 敲除位点整合的外源基因, 保留了 *CCR5* 天然缺失的基因组痕迹。

2.2.1.2 CXCR4靶点

随着对病毒感染过程的研究深入, 研究人员发现 *CCR5* 分子并不是 HIV-1 病毒感染所需的唯一辅助受体, CXCR4 为病毒后期感染靶细胞的重要分子。因此, 单纯以 *CCR5* 分子为靶点阻断病毒感染是行不通的, 需要寻找阻断 CXCR4- 病毒感染的方法。Doms 课题组首次利用 Ad5/35 型嵌合型病毒载体介导 ZFN 靶向修饰 CD4⁺T 细胞表面的 CXCR4

分子, 体外检测发现 CXCR4 分子表达量减少, CD4⁺T 细胞功能正常且对 CXCR4- 病毒株表现出抗病毒能力, 将此纠正后的 CD4⁺T 细胞回输到 NSG 小鼠后检测到具有一定的抗病毒能力^[61]。Yuan 等^[62] 相继将 shRNA 干扰和 ZFN 介导修饰的 HSCs 回输到小鼠体内, 比较抗病毒效果。结果表明, 前者在一定程度上可以降低 CXCR4 分子的表达量, 但是并未敲除, 所以病毒还有继续感染的机率; 后者可以对 CXCR4 分子进行敲除, 从而阻断病毒感染, 抗病毒效果显著。

上述策略是基于 ZFN 介导 *CCR5* 或 CXCR4 基因突变的细胞回输到体内对病毒产生抵抗能力。目前, 利用该技术介导 *CCR5* 基因敲除的研究已进入临床 I 期试验 (NCT00842634、NCT01252641、NCT01044654)。而最新研究成果揭示, 艾滋病病毒感染者自体 CD4 T 细胞 *CCR5* 基因经过编辑后可以再次回输到感染者体内, 即使在不服用药物的情况下也能将该病毒拒之门外。改造 T 细胞可以免于使用抗逆转录病毒药物并向“功能性治愈”艾滋病方向迈进。但是, 这一令人振奋的消息之后仍存在一定的不足: (1) ZFN(SB-728-T) 介导 *CCR5* 基因纠正的细胞需经过体内回输, 在一定程度上也比较耗时; (2) 该项技术是对艾滋病病毒感染者自体 CD4 T 细胞 *CCR5* 基因进行编辑, 产生抗病毒能力, 但是对 CXCR4- 病毒株却没有抵抗作用, 而敲除 CXCR4 分子并非最佳的选择, 因其参与体内多种生理机制, 如 T 细胞归巢、造血功能, 胚胎发育等; (3) ZFN 技术介导修饰后的靶细胞是耐受性细胞, 可以将病毒拒之门外, 但是, 已整合在宿主细胞基因组中的 HIV-1 前病毒却难以根除。残余存在的病毒势必会再次出现反弹, 而根除这些感染或者潜伏在宿主基因组中的残余 HIV-1 病毒又是抗 HIV/AIDS 治疗的关键。

2.2.1.3 HIV前病毒

高效抗逆转录病毒治疗 (HAART) 能显著改善 HIV 感染者的生存率, 但该疗法并不能完全治愈患者, 其重要原因是目前抗病毒药物仅能抑制 HIV-1 病毒的复制, 并不能对感染的免疫细胞基因组中已整合的 HIV 前病毒 DNA 起作用。而整合的 HIV 前病毒 DNA, 不仅在感染细胞中被作为病毒基因转录的模板, 而且在潜伏感染细胞中也是病毒长期潜伏的基础以及患者停药后病毒再次反弹的根源。因此, 如何靶向清除整合在宿主靶细胞染色体上的 HIV 前病毒是目前 HIV/AIDS 治疗研究领域最富有

挑战性的科学问题。倘若能使整合的 HIV 前病毒从宿主靶细胞基因组上缺失,那么,则可从根本上解决 HIV/AIDS 不能治愈的问题,实现“斩草除根”的梦想。2013 年,复旦大学朱焕章教授课题组设计并获得了一对能特异靶向多数 HIV 亚型基因保守区 LTR (long terminal repeat) 的 ZFN, 在多个 HIV 感染及潜伏细胞系上证实了 ZFN 能特异靶向 HIV-1 前病毒 LTR, 并介导整合的全长 HIV-1 前病毒的高效切除, 获得了显著抗 HIV 感染的效果, 提示该方法将可能为一个可选择根除 HIV 的治疗手段^[63]。潜伏在基因组中的 HIV-1 前病毒是病毒再次攻击免疫细胞的杀手, 为了能够将潜伏的 HIV-1 前病毒靶向性激活, 朱焕章教授课题组利用转录激活结构域 VP64 和特异结合 HIV-1 LTR 的锌指蛋白相融合, 在多种 HIV-1 前病毒潜伏感染的细胞模型中激活隐藏的前病毒, 同时证实锌指蛋白对细胞增殖、细胞周期没有影响^[64]。该方法将可以和抑制病毒复制的药物联合使用为抗 HIV/AIDS 治疗提供一条新的路径。

Elbina 等^[65]利用 CRISPR/Cas9 技术以 HIV-1 病毒的 LTR 靶点, 在病毒潜伏感染的细胞模型中验证 CRISPR/Cas9 介导 HIV-1 前病毒基因组的敲除效率可达 20%。2014 年, Hu 等^[66]利用 CRISPR/Cas9 技术以 HIV-1 病毒基因组的 LTR 为靶点, 在潜伏感染的小神经胶质细胞、前体单核细胞和 T 细胞中证实 CRISPR/Cas9 技术介导潜伏在宿主细胞中的 HIV-1 前病毒基因组的根除, 同时又证实该项技术介导病毒基因组的敲除对宿主细胞没有产生毒性。

2.2.2 乙型肝炎

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染所引起的传染疾病, 目前仍缺乏有效治疗手段。Cradick 等^[67]设计针对 HBV 特异性的 ZFN 在基因组特异位点进行切割, 导致至少 36% 的病毒基因组失活和 30% 的前病毒基因组 RNA 表达下调。该项结果提示, 在今后的 HBV 基因治疗中可以应用病毒载体高效导入 ZFN 用以提高切除病毒基因组的效率。Bloom 等^[68]利用 TALEN 技术靶向 HBV 基因组中的特异位点, 实现约 35% 的共价闭合 DNA 的突变, 在后续的小鼠模型实验中进一步验证 HBV 病毒的复制受到抑制; 此外, 他们也对 TALEN 介导修饰的细胞做了安全评价, 结果显示在人类基因组中可能脱靶位点处并未检测到突变。随后, 复旦大学袁正宏教授课题组利用最新的 TALEN 技术, 设计具有靶向不同基因型 HBV 保守区序列的 TALEN,

在体外细胞和小鼠模型验证 TALEN 可以特异结合靶序列并切割 HBV 基因组; 此外, 该课题组还发现 TALEN 基因靶向敲除技术和干扰素的结合应用可以增强对病毒复制的抑制效果^[69]。这项成果不仅为 HBV 治疗领域提供新的思路, 也会为其他病毒引起的疾病的治疗研究提供更广泛的平台。

3 癌症

癌基因以及它们的作用机制在过去的几十年里已被确定。癌基因和突变型的肿瘤抑制因子将成为 ZFN 对癌细胞修饰的靶点。ZFN 已成功对特异性的肿瘤生长因子表达水平进行下调或是对突变型 TP53 基因的替换。在经长春花碱处理和未处理的 K-562 细胞中分别转入 OPEN 技术平台筛选针对肿瘤血管内皮生长因子 (tumor angiogenic factor vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 的 ZFN, 结果显示, 处理细胞组中 ZFN 介导修饰效率为 7.7%, 而未处理细胞组为 54%^[70]。此外, 通过 ZFN 技术在肿瘤细胞模型对突变型 TP53 基因的纠正效率约为 0.1%。以上结果显示, HR 途径在肿瘤细胞中的纠正效率不是很理想, 但是对肿瘤细胞的基因治疗还是提供了路径^[71]。为了能够提高 ZFN 在癌细胞中的纠正效率, 需要寻求一种高效导入工具和生物活性高的候选 ZFN, 相信在不久的将来, 肿瘤基因的治疗将会有很大程度的进步。

上述是以癌细胞生长相关的基因为靶点, 除此之外还可以以 T 细胞表面受体为靶点间接杀伤肿瘤细胞。肾上腺糖皮质激素受体在各种细胞表面广泛分布, 而肾上腺糖皮质激素受体与配体结合后会在不同的细胞表面引发不同的细胞反应。肾上腺糖皮质激素与 T 淋巴细胞表面受体结合会影响 T 淋巴细胞的免疫活力。Reik 等^[72]利用 ZFN 将 CD8 阳性的毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 表面的肾上腺糖皮质激素受体突变, 使其活性失活而不能与其受体结合, 最终得到有免疫活力的 CD8 阳性毒性 T 淋巴细胞, 应用于恶性脑胶质瘤的免疫治疗, 该成果已经进入 1 期临床试验阶段 (NCT01082926)。

HPV (human papillomavirus) 感染和人子宫颈癌的发生密切相关, HPV 致癌作用的主要基因为 E6、E7。癌蛋白 E6 和 E7 通过与 P53 和 Rb 蛋白作用使后者失活, 导致细胞周期调节紊乱。以 E6、E7 为靶点将是 HPV 基因治疗研究领域中的理想靶点。Zhen 等^[73]利用 CRISPR/Cas9 技术介导 E6/E7 基因的启动子区域和编码基因的敲除, 在建立的肿瘤小

鼠模型中证实,经 CRISPR/Cas9 技术介导纠正的宫颈癌细胞生长受到抑制。该项成果为 HPV 诱发的宫颈癌或是 HPV 相关的癌症治疗提供了应对策略。

4 存在的问题和展望

与传统的同源重组技术相比,基因编辑技术提高了基因靶向修饰的效率,为疾病的基因治疗提供了有力的手段。倘若要应用到临床试验中,仍需要解决譬如脱靶切割、基因导入等问题。

4.1 脱靶效应

ZFN 脱靶效应部分是由于锌指结构域的非特异性结合,部分是由于 *Fok I* 核酸酶导致的。*Fok I* 在基因组中需形成二聚体才能发挥切割活性。同源二聚体对细胞产生的毒性很大,人们设计出改造过的 *Fok I* 二聚体界面以便尽量产生异源二聚体,可以降低但是不能完全消除脱靶切割。此外,研究人员试图通过体外筛选得到特异性较高的 ZFP,增强 ZFN 对目标序列识别的特异性。还可以通过调控型或特异性启动子调控 ZFN 的表达水平,减少脱靶切割造成的毒性。TALEN 实现了能够识别基因组中任意序列的目的,不需筛选,但是由于模块组装长度的影响,造成分子生物学操作困难。倘若将 TALEN 骨架中的非必要结构去除或者缩短,一定程度上能减小其相对分子质量,但是对识别序列的特异性是否造成影响仍不清楚,是否因此会降低或增加脱靶切割造成的细胞毒性效应也未知。对 TALEN 的脱靶效应尚没有进行仔细分析。奇特的是,当 TALE 与野生型 *Fok I* 融合产生 TALEN 时,毒性相对较小。CRISPR/Cas9 系统虽然能够高效靶向修饰基因,但其较高的脱靶效应妨碍其进一步应用,特别是在临床基因治疗上应用。通过改进 CRISPR/Cas9 系统,利用 Cas9 单切口酶和成对 sgRNA,在不降低基因突变效率的前提下,可有效降低 CRISPR/Cas9 系统在基因组上的脱靶效应。成对 sgRNA 的选择比较关键,两条 sgRNA 结合不同的 DNA 链,其 PAM 序列要以尾对尾 (tail to tail) 出现,并且两个 sgRNA 结合的位点不能相隔太远,Cas9 切口酶会在每个 sgRNA 结合的地方造成小小的单链切口 (single strand break, SSB)。而在潜在脱靶区域,单个 sgRNA 造成的 SSB 会通过碱基切除修复方式精确修复该区域,不会引入突变。

4.2 基因导入系统

基因导入方法的不同依据特定的靶细胞或是组织而言。细胞模型所需的转染方法多为脂质体、电

转两种;体内导入途径多倾向于病毒载体的借助。目前,遗传性疾病的基因治疗方案大多借助逆转录病毒载体,但其随机插入整合存在潜在的安全性风险。非整合型慢病毒载体、腺病毒和腺相关病毒载体的出现可以在一定程度上避免随机插入导致的危险,降低细胞毒性。ZFN 在诸多病毒载体借助下可成功导入靶细胞,而 TALEN 和 CRISPR/Cas9 受到重复单元和片段大小的影响,病毒包装方面可能相对局限。此外,病毒载体导入体内做到真正靶向性还是比较困难,如腺病毒颗粒在体内会被一些组织吞噬,真正到达肿瘤组织的量却很少。因此,在基因治疗领域改善和优化基因导入系统的靶向性和效率、构建新的基因定点整合载体、提高原位纠错效率是关键。

总之,上述 3 种基因编辑技术在细胞中应用时大多数是通过 DNA 修复途径中的非同源末端连接实现靶基因的修饰,而利用同源重组介导对目的基因的替换、删除的方案较少。在今后的基因编辑技术发展中,倘若能够通过提高同源重组的效率,则可实现高效的基因定向修饰;此外,针对这些基因编辑工具引起的免疫反应和脱靶效应若能建立安全、有效的检测手段,则会减弱对细胞造成的毒性;最后,若能建立高效、安全的基因导入系统,在一定程度上会大大提高基因靶向修饰效率,有望在基因治疗领域中得到广泛的应用同时为人类疾病的治疗带来更多的福音。

[参 考 文 献]

- [1] Cathomen T, Joung JK. Zinc-finger nucleases: The next generation emerges. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1200-7
- [2] Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, et al. The DrosDel deletion collection: A *Drosophila* genome-wide chromosomal deficiency resource. *Genetics*, 2007, 177(1): 615-29
- [3] Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature*, 1995, 378(6558): 720-4
- [4] Valenzuela DM, Murphy AJ, Frendewey D, et al. High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(6): 652-9
- [5] Ray A, Langer M. Homologous recombination: Ends as the means. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(10): 435-40
- [6] Gomez-Rodriguez J, Washington V, Cheng J, et al. Advantages of q-PCR as a method of screening for gene targeting in mammalian cells using conventional and whole BAC-based constructs. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(18): e117
- [7] McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by

- small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737-47
- [8] Bibikova M, Carroll D, Segal D, et al. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(1): 289-97
- [9] Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(17): 3361-9
- [10] Terada R, Johzuka-Hisatomi Y, Saitoh M, et al. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. *Plant Physiol*, 2007, 144(2): 846-56
- [11] Yamauchi T, Johzuka-Hisatomi Y, Fukada-Tanaka S, et al. Homologous recombination-mediated knock-in targeting of the MET1a gene for a maintenance DNA methyltransferase reproducibly reveals dosage-dependent spatiotemporal gene expression in rice. *Plant J*, 2009, 60(2): 386-96
- [12] Zhang F, Maeder ML, Unger-Wallace E, et al. High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(26): 12028-33
- [13] Wright DA, Townsend JA, Winfrey RJ, et al. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 2005, 44(4): 693-705
- [14] Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature*, 2009, 459(7245): 437-41
- [15] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiaik A, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294-301
- [16] Sander JD, Maeder ML, Reyon D, et al. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 Suppl: W462-8
- [17] Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, et al. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair*: Amst, 2006, 5(9-10): 1021-9
- [18] Rémy S, Tesson L, Ménoret S, et al. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res*, 2010, 19(3): 363-71
- [19] Liu Q, Segal DJ, Ghiara JB, et al. Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(11): 5525-30
- [20] 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*, 1995, (25): 14628-33
- [21] Mussolino C, Cathomen T. TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(5): 644-50
- [22] Mahfouz MM, Li L, Fang X, et al. *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(6): 2623-8
- [23] Deng D, Yan C, Pan X, et al. Structural basis for sequence specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 2012, 335(6069): 720-3
- [24] Boch J, Scholze H, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-12
- [25] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 731-4
- [26] Qi L, Haurwitz RE, Shao W, et al. RNA processing enables predictable programming of gene expression. *Nat Biotechnol*, 2012, 30(10): 1002-6
- [27] Sinkunas T, Gasiunas G, Fremaux C, et al. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J*, 2011, 30(7): 1335-42
- [28] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 2010, 329(5997): 1355-8
- [29] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-26
- [30] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): 2579-86
- [31] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-72
- [32] Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med*, 2009, 360(5): 447-45
- [33] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 2010, 467(7313): 318-22
- [34] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 2011, 365(25): 2357-65
- [35] Ousterout DG, Perez-Pinera P, Thakore PI, et al. Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients. *Mol Ther*, 2013, 21(9): 1718-26
- [36] Soldner F, Laganier J, Cheng AW, et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*, 2011, 146(2): 318-31
- [37] Ding Q, Lee YK, Schaefer EA, et al. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(2): 238-51
- [38] Wang Y, Zhang WY, Hu S, et al. Genome editing of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with zinc finger nucleases for cellular imaging. *Circ Res*, 2012, 111(12): 1494-503
- [39] Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther*, 2013, 21(6): 1151-9

- [40] Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, et al. Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 478(7369): 391-4
- [41] Choi SM, Kim Y, Shim JS, et al. Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology*, 2013, 57(6): 2458-68
- [42] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435(7042): 646-51
- [43] Genovese P, Schirotti G, Escobar G, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014, 510(7504): 235-40
- [44] Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, et al. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus. *Sci Rep*, 2014, 23: 4: 5043
- [45] Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells*, 2011, 29(11): 1717-26
- [46] Zou J, Mali P, Huang X, et al. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*, 2011, 118(17): 4599-608
- [47] Suzuki K, Yu C, Qu J, et al. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(1): 31-6
- [48] Zou J, Sweeney CL, Chou BK, et al. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: Functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*, 2011, 117(21): 5561-72
- [49] Li H, Haurigot V, Doyon Y, et al. *In vivo* genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*, 2011, 475(7355): 217-21
- [50] Park CY, Kim J, Kweon J, et al. Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(25): 9253-8
- [51] Ma N, Liao B, Zhang H, et al. Thalassemia induced pluripotent stem correction in integration-free nuclease (TALEN)-mediated gene transcription activator-like effector. *J Biol Chem*, 2013, 288(48): 34671-9
- [52] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 551-3
- [53] 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(6): 659-62
- [54] Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(7): 808-16
- [55] Holt N, Wang J, Kim K, et al. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839-47
- [56] Yao Y, Nashun B, Zhou T, et al. Generation of CD34⁺ cells from CCR5-disrupted human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(2): 238-42
- [57] Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, et al. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(11): 1298-306
- [58] Li L, Krymskaya L, Wang J, et al. Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases. *Mol Ther*, 2013, 21(6): 1259-69
- [59] 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(10): 901-10
- [60] Ye L, Wang J, Beyer AI, et al. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5 Δ 32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(26): 9591-6
- [61] Wilen CB, Wang J, Tilton JC, et al. Engineering HIV-resistant human CD4⁺ T cells with CXCR4-specific zinc-finger nucleases. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002020
- [62] Yuan J, Wang J, Crain K, et al. Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4⁺ T cell resistance and enrichment. *Mol Ther*, 2012, 20(4): 849-59
- [63] Qu X, Wang P, Ding et al. Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(16): 7771-82
- [64] Wang P, Qu X, Wang X, et al. Specific reactivation of latent HIV-1 with designer zinc-finger. *Gene Ther*, 2014, 21(5): 490-5
- [65] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013, 3: 2510
- [66] Hu W, Kaminski R, Yang F, et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461-6
- [67] Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, et al. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther*, 2010, 18(5): 947-54
- [68] Bloom K, Ely A, Mussolino C, et al. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and *in vivo* with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther*, 2013, 21(10): 1889-97
- [69] Chen J, Zhang W, Lin J, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther*, 2014, 22(2): 303-11
- [70] Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, et al. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 294-301
- [71] Herrmann F, Garriga-Canut M, Baumstark R, et al. p53 gene repair with zinc finger nucleases optimised by yeast 1-hybrid and validated by Solexa sequencing. *PLoS One*,

- 2011, 6(6): e20913
- [72] Reik A, Zhou Y, Hamlett A, et al. Zinc finger nucleases targeting the glucocorticoid receptor allow IL-13 zetakine transgenic CTLs to kill glioblastoma cells *in vivo* in the presence of immunosuppressing glucocorticoids. 11th Annu Meet Am Soc Gene Ther, 2008, Abst34
- [73] Zhen S, Hua L, Takahashi Y, et al. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(4): 1422-6