

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2021-046

基于 CRISPR/Cas 工具的肿瘤基因线路构建及应用

宋斐^{1,2}, 刘宇辰^{1,2}, 蔡志明^{1,2}, 黄卫人^{1,2}

(¹深圳大学第一附属医院, 深圳市第二人民医院, 泌尿外科, 广东 深圳 518035; ²广东省泌尿生殖肿瘤系统生物学与合成生物学重点实验室, 广东 深圳 518035)

摘要: 以恶性肿瘤为代表的难治性疾病仍是困扰我国乃至全球的一个重大公共卫生问题。近年来, 合成生物学的蓬勃发展, 极大推动了疾病创新治疗策略, 并显示出巨大潜力。人工构建的基因线路可特异性地识别、区分疾病细胞和正常细胞, 并控制疾病细胞命运, 为精准治疗提供了新途径。然而构建基因线路用于疾病治疗的挑战之一是缺乏有效、可编程、安全和序列特异性的基因编辑工具。CRISPR/Cas 自从首次被用于哺乳动物基因编辑以来, 已被广泛应用于研究、工业和医学领域。除 Cas9 诱导的 indel 突变外, CRISPR/Cas 能够进行 DNA/RNA 的碱基编辑, 为基因线路设计提供了高效的工具, 极大提高了每个线路元件效率。因此, 基于 CRISPR 技术的智能化基因线路的应用, 可有效保证癌症等疾病治疗的安全性、高效性和特异性。本文介绍了 CRISPR/Cas 技术应用于医学合成生物学基因线路设计的研究进展和潜在挑战。评估了使用 CRISPR 系统元件的合成基因线路在肿瘤治疗中的效果, 尤其利用人工开关诱导的 Cas9 干预肿瘤细胞治疗的安全性和有效性; 介绍了 CRISPR/Cas9 介导的信号传感器设计, 其可同时识别多个蛋白质信号, 实现了多基因同步调控, 以及新一代体系小、特异性强、基因调控效率高的 CRISPR/Cas12a 系统及其遗传改造。基于无启动子表达 CRISPRReader 元件的精简基因线路设计, 其高效启动的特点极大提升了智能化基因线路在未来精准癌症治疗中的应用潜力。

关键词: 基因线路; 信号传感器; 恶性肿瘤; 成簇的规则间隔短回文重复; CRISPR 相关蛋白

中图分类号: Q812 **文献标志码:** A

Construction of tumor gene circuits using CRISPR/Cas tool and their applications

SONG Fei^{1,2}, LIU Yuchen^{1,2}, CAI Zhiming^{1,2}, HUANG Weiren^{1,2}

(¹Department of Urology, The first Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen Institute of Translational Medicine, Shenzhen 518035, Guangdong, China; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Systems Biology and Synthetic Biology for Urogenital Tumors, Shenzhen 518035, Guangdong, China)

Abstract: Refractory diseases such as malignant tumors are still a major challenge for public health in the world. In

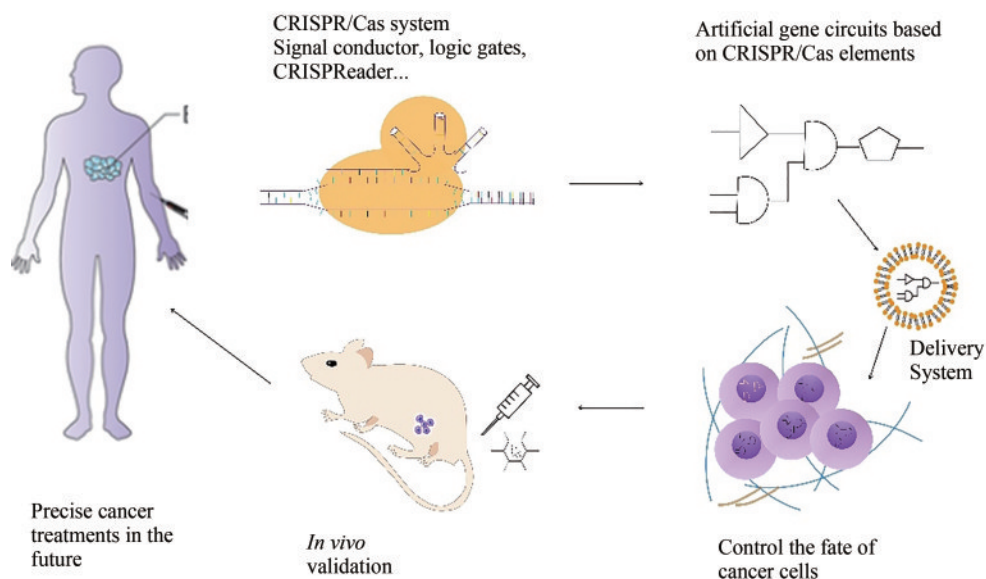
收稿日期: 2021-04-15 修回日期: 2021-11-24

基金项目: 国家重点研发项目 (2019YFA0906000); 广东省自然科学基金 (2021A1515012488)

引用本文: 宋斐, 刘宇辰, 蔡志明, 黄卫人. 基于 CRISPR/Cas 工具的肿瘤基因线路构建及应用[J]. 合成生物学, 2022, 3(1): 53-65

Citation: SONG Fei, LIU Yuchen, CAI Zhiming, HUANG Weiren. Construction of tumor gene circuits using CRISPR/Cas tool and their applications[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(1): 53-65

recent years, the fast development of synthetic biology has greatly promoted novel treatment strategies for diseases with great potentials for effective treatment. The artificially constructed gene circuits can specifically identify and distinguish diseased cells from normal cells, and control their fate to provide a new way for precise treatment. However, the ultimate challenge in constructing gene circuits is the lack of effective, programmable, safe, and sequence-specific gene editing tools. The clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) system and CRISPR-associated RNA-guided endonuclease Cas9-targeted (CRISPR-associated protein 9) genome editing tool have recently been applied in engineering gene circuits for its unique properties: manipulability, high efficiency and programmability. In addition to indel mutations induced by Cas9, CRISPR/Cas can perform DNA/RNA base editing, providing efficient tools for gene circuit design, and greatly improve efficiency for designing circuit elements. The traditional single-targeted treatment cannot effectively distinguish tumor cells from normal cells, and gene therapy has poor anti-tumor effects, which severely limits its application. Currently, the design of gene circuits using tumor-specific targets based on CRISPR/Cas systems provides a new strategy for precision cancer therapy. Scientists have developed a series of efficient and targeted transcription factor components based on CRISPR technology to maximize the performance of gene circuits. These novel designs extend the toolbox for gene editing, and enable the construction of intelligent gene circuits such as logic gates, signal conductors, analogue computing circuits, counters and memory devices. Therefore, the application of intelligent gene circuits based on CRISPR technology can effectively ensure safety, efficiency and specificity for cancer treatment. This article introduces the updated progress, prospects and potential challenges of CRISPR/Cas technology for the design and construction of gene circuits in biomedical field. Firstly, the efficacy of synthetic gene circuits using CRISPR system components in tumor treatment is evaluated, especially the safety and effectiveness of using Cas9 induced by artificial switch to intervene tumor growth. Secondly, the design of CRISPR/Cas9-mediated signal conductors is introduced, which can recognize multiple protein signals simultaneously and realize the simultaneous regulation of multiple genes. In addition, the CRISPR/Cas12a system with smaller size, strong specificity and high gene regulation efficiency is a new generation alternative. Finally, the simplified gene circuit design based on the promoter-free CRISPRReader expression elements is addressed, and its high-efficiency startup feature will greatly enhance the potential application of intelligent gene circuits in precise cancer treatments in the future.



Keywords: gene circuits; signal conductor; malignant tumors; clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR); CRISPR-associated protein

癌症的发生和发展是多因素协同的结果,涉及复杂的信息网络与许多信号分子的相互作用^[1]。随着对人类基因组研究的不断深入,发现基因表达调控并非孤立、单一事件,而是存在相互制约和影响^[2]。因此,细胞信号通路的调控和干预通常复杂而困难,涉及动态感知和多层次调控。近年来,基于多组学研究对肿瘤发展机制的解析以及肿瘤微环境的认识,在针对性治疗药物的开发及其临床应用上取得了巨大进展。如,靶向PD1/PDL1免疫检查点药物和CAR-T细胞免疫治疗技术(2018年获FDA批准),靶向肿瘤新生抗原的T细胞回输等,为恶性肿瘤的治疗提供了全新策略。然而,现有治疗策略通常靶点单一,若要进一步提升治疗效果,解决现有药物总体响应率不佳和耐药等问题,需开发出系统性干预的全新技术手段和策略,突破现有治疗瓶颈。

基因线路是指经过人工设计的、由不同功能的生物分子和基因元件组成的集合,它可使单个细胞根据预设的逻辑执行相应功能,在导入活细胞后,感受、整合、处理分子信号,行使特定生物功能。合成生物学利用工程化原理,设计人工基因线路感知细胞内外多重信号,进而做出逻辑判断并通过调控细胞信号网络或释放治疗性药物,系统性影响细胞行为以实现疾病治疗之目的,是有望解决现有治疗瓶颈的有力工具。迄今,合成生物学在医学领域的发展已崭露头角,例如,Lim等^[3]设计了双受体AND-gate T细胞,用以特异高效地清除肿瘤细胞;Lu等^[4]构建了基于RNA的免疫调节基因线路,实现免疫刺激剂在肿瘤细胞中表达与释放,激活T细胞介导的肿瘤杀伤;Fussenegger等^[5]开发出“胰岛素”基因线路,可自动感应小鼠血液胰岛素浓度变化,维持血糖稳定,缓减胰岛素抵抗的症状。

CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, 成簇的规则间隔回文重复序列)/Cas9 (CRISPR-associated protein 9, CRISPR相关蛋白9)最初是用于定点突变和基因功能鉴定的便捷工具,如今已成为合成生物学中最为熟知且广为应用的工具。Cas9是Cas核酸内切酶家族的一员。在这些核酸内切酶中,最著名且研究最多的是

Cas9、Cas12a (也称为Cpf1)、Cas13a和Cas13b^[6],其中Cas9和Cas12a靶向DNA,而Cas13a和Cas13b则针对RNA。与Cas9相比,Cas12a识别富含G的protospacer相邻基序(protospacer adjacent motif, PAM),而Cas9识别富含T的PAM,与Cas9系统互补,扩大了识别范围。此外,Cas12a由长度比Cas9短的CRISPR RNA引导,有利于多重基因操作和包装成病毒载体^[7]。尽管如此,由于Cas12a与Cas9三维空间结构的差异,两者在PAM识别机制上不同,与Cas9蛋白相比,Cas12a蛋白需要crRNA和目标DNA之间更多的匹配碱基才能稳定结合进而形成R-loop完成切割,且Cas12a对PAM远端错配的耐受性远低于Cas9,因而CRISPR/Cas9的使用范围更为广泛^[8]。目前,已有一些研究改进了CRISPR/Cas12a系统,例如,经优化的CRISPR/Cas12a实现了无缝DNA编辑^[9],使用一对拆分的Cas12a和缺陷/死亡Cas12a (dead Cas12a, dCas12a)片段,在雷帕霉素诱导的、可光激活的基因组编辑和内源性基因激活中均显示出较高效率^[10]。最近,进一步优化了的Cas13系统则实现了更精确地切割病毒RNA^[11]和动态跟踪RNA^[12]。本文将着重介绍CRISPR/Cas系统应用于人工基因线路治疗肿瘤治疗领域的研究。

1 基于CRISPR的基因线路识别与干预

十余年来,合成生物学和生物信息学飞速发展,合理设计具有预期功能的高效人工基因线路取得了长足进展^[13]。人工基因线路首先在原核细胞中构建,并逐渐在真核细胞中实现^[14-16]。目前,生命体和细胞中的信号网络可被重编程,以改变原有致癌信号通路^[17]。CRISPR/Cas9技术为基因线路设计提供了一个高效的工具,极大提高了基因线路的设计和元件效率。已有研究者尝试使用CRISPR技术构建简单的基因线路用于肿瘤的基因治疗^[18-19]。实际上,利用CRISPR技术构建的基因线路不仅限于肿瘤细胞,还广泛应用于植物^[20-21]和动物^[4]。然而,人工基因线路应用于人体的安全性一直存在争议,如何利用遗传基因元件构建安全有效的基因线路一直是科学家们面临的难题。

为了解决这个问题，研究者在基因线路设计中引入了人工开关以提高其安全性。目前，已开发出了可由光^[22-24]、内源性蛋白质^[25]、小分子多西环素^[26-27]、阿魏酸钠^[28]等外源信号控制的

CRISPR开关，控制细胞内信号通路的开放与关闭（图1）。人工、可切换系统的使用提高了基因治疗的安全性，而可感知内部信号蛋白的装置将成为下一代基因治疗工具。

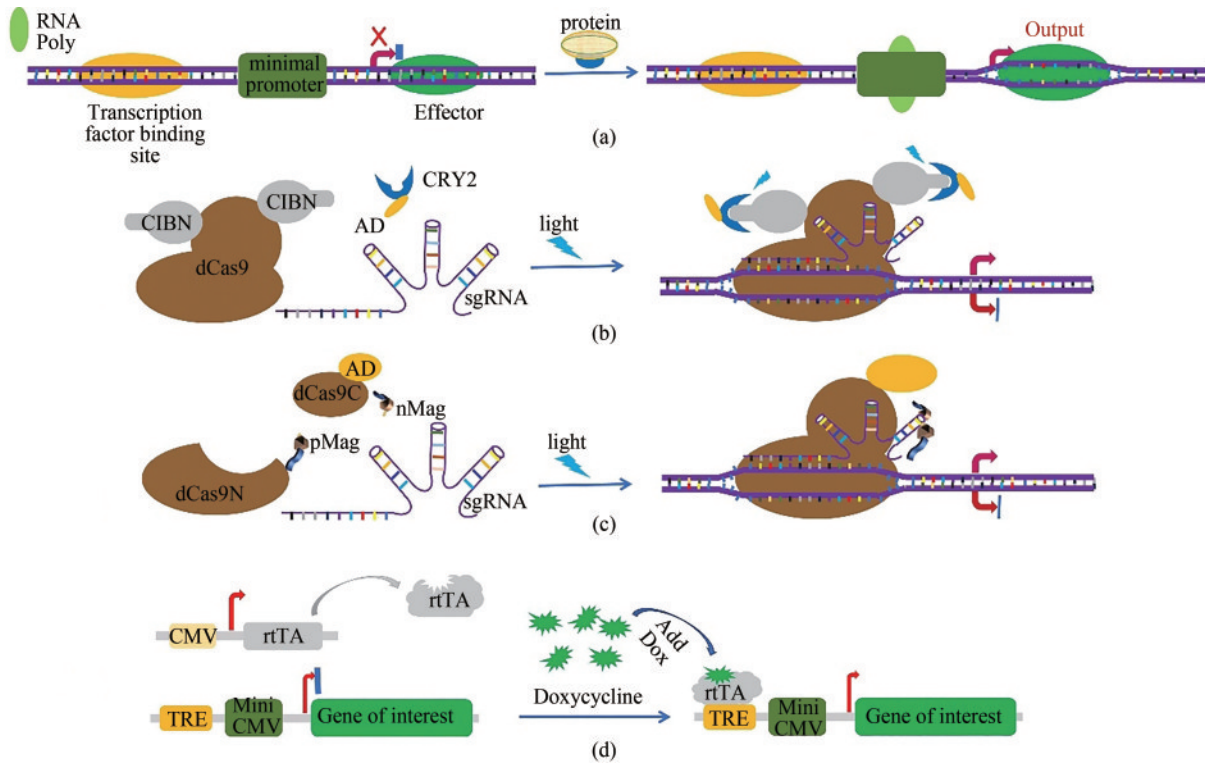


图1 基于CRISPR/Cas技术的人工基因线路^[29]

(a) 在CRISPR/Cas9基因序列上游插入编码转录因子结合位点的人工序列，通过感知细胞内信号蛋白来控制基因表达。在恶性肿瘤细胞中，一些特定的转录因子被异常激活，如 β -catenin和NF- κ B。当癌细胞中的异常信号蛋白与转录因子结合位点结合并且RNA聚合酶(RNA poly)被募集到TATA-box时，下游CRISPR/Cas9基因的表达就会开启。图中Effector指CRISPR系统的Cas9蛋白。(b) 癌细胞中基于CRISPR/Cas9技术的光诱导基因表达装置。蓝光刺激诱导拟南芥隐花色素2(CRY2)与其结合蛋白(隐色素相互作用的基本螺旋-环-螺旋蛋白1, CIBN)之间形成异二聚化。因此，与CRY2蛋白融合的转录激活域(AD)被携带到指定区域，促进下游基因的表达。(c) 光诱导CRISPR/dCas9的流程。dCas9被分成两个缺乏核酸酶活性的片段，dCas9片段与光诱导二聚化结构域(pMag和nMag)融合。蓝光刺激诱导pMag和nMag之间的异源二聚化，使分裂的dCas9片段能够重新结合，从而重建RNA引导的转录激活活性。(d) 小分子人工开关系统。多西环素与四环素转录激活因子(rtTA)的结合导致rtTA构象的变化，活化后的rtTA与Tet反应元件(TRE)进一步结合从而启动靶基因的表达(如Cas9)

Fig. 1 Schematic representation for the artificial gene circuits developed based on CRISPR/Cas technology

(a) artificial sequences of transcription factor binding site are inserted into the upstream of the Cas9 coding sequences to control gene expression by sensing intracellular signal proteins. In malignant tumor cells, some specific transcription factors such as β -catenin and NF- κ B are abnormally activated. The expression of the downstream CRISPR/Cas genes is turned on when abnormal signal proteins in malignant cells bind to the transcription factor binding site and RNA polymerase (RNA poly) is recruited to the TATA box. Effector represents the Cas9 protein. (b) the light-inducible gene expression regulation system in cancer cells developed based on CRISPR/Cas9 technology. Blue light stimulation induces heterodimerization between *A. thaliana* cryptochrome 2 (CRY2) and its binding partner CIBN (cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix protein 1). Therefore, the transcriptional activation domain (AD) fused with the CRY2 protein is targeted to the specific region and promotes the expression of downstream genes. (c) schematic diagram for the light inducible CRISPR/dCas9 system. The dCas9 is split into two fragments lacking nuclease activity, and the dCas9 fragments are fused with light-inducible dimerization domains (pMag and nMag). Blue light stimulation induces heterodimerization between pMag and nMag, which enables split dCas9 fragments to reassociate, thereby reconstituting RNA-guided transcriptional activation activity. (d) schematic diagram for a small molecular artificial switch system. The binding of doxycycline results in the conformational change of reverse tetracycline transcriptional activator rtTA, and then the activated rtTA could bind to the Tet-responsive element (TRE) to drive the expression of the target genes, such as Cas9 gene.

光调控系统不断更新迭代。Ye等将红细菌中响应远红光的蛋白BphS, 链球菌中的转录因子BldD^[30]以及酿脓链球菌中的Cas9核酸酶经理性设计、组装和重编程构成了远红光调控的分割型split-Cas9基因编辑系统(far-red light-activated split-Cas9 system, FAST), 该系统以较低强度的远红光外部照射作为控制手段, 借助于远红光本身的组织通透性优势, 克服了目前化学小分子调控以及蓝光调控CRISPR/Cas9系统的缺点, 具有远程无痕、低本底泄漏、低脱靶效应、低毒性等体内应用优势, 能够在时间和空间上特异性地精准控制体内深层组织和器官的基因编辑^[31]。Tang等^[32]开发一类新型光敏感crRNA, 丰富了光诱导型gRNA(guide RNA)的种类。使用维生素E或胆固醇等具有大位阻疏水基团, 利用光敏基团将其修饰在crRNA的5'末端得到的光敏crRNA可以正常和Cas9结合形成核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物, 维生素E或胆固醇的修饰阻碍了RNP复合物与目标DNA三元复合物的形成。在给予光照刺激后, 维生素E从crRNA上解离, CRISPR/Cas9恢复功能。Ha等^[33]设计了光敏感、可裂解的gRNA(pcRNA), 能够利用光照降解gRNA分子, 从而实现对Cas9核酸酶基因编辑活性的调控。

Budeck等^[34]设计了一个光遗传anti-CRISPR系统, 由一个化脓性链球菌Cas9(*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9)抑制剂AcrIIA4蛋白和一个来自于燕麦的LOV2光传感器蛋白杂合构成, 两者与CRISPR/Cas9效应器共同表达, 从而实现光介导的基因组和表观基因组编辑。

2 CRISPR/dCas9介导的信号传感器

近年来, 研究者已经开发出一些人工合成元件来调节细胞基因信号网络。Nissim等^[35]构建了一个双启动子整合器来区分结肠癌细胞和正常成纤维细胞。Xie等^[36-38]通过检测5种内源性miRNA分子的差异表达, 成功开发了一种特异性细胞分类器, 可有效区分HeLa细胞与其他类型的细胞。Morsut等^[39]根据肿瘤相关抗原-受体系统, 构建了

双受体“与门”T细胞, 运用布尔逻辑提高特异性识别肿瘤细胞的能力: 在T细胞表面设计合成了两个Notch受体(即“双受体”), 使T细胞能够识别对应的两种肿瘤特异性抗原, 只有当肿瘤细胞同时表达这两种抗原时, 该工程化T细胞才能被激活。在肿瘤细胞生长过程中, 除miRNA和细胞表面受体蛋白或抗原性蛋白外, 一些内源性蛋白也会直接参与细胞内信号网络调控, 发现并利用癌发生发展中的关键信号调控蛋白质, 也可开发出更直接的调节元件。

构建复杂基因线路的瓶颈之一是缺乏工程化的基因调控元件, CRISPR技术则提供了一种有效解决方案, 可以极大提升基因线路的设计。Liu等^[40-41]开发了CRISPR介导的信号传感器, 可同时识别多个蛋白质信号, 解决了传统基因线路缺陷。该研究创造性地将RNA核糖开关序列整合到sgRNA的3'端, 构建了一种可控制sgRNA的新型核糖开关。具体来说, 首先构建RNA核糖开关(riboswitch)序列, 该序列包括可感应特定蛋白质信号分子的RNA核酸适配体(apramer)以及与DNA识别区互补的反义RNA。随后将核糖开关序列整合到sgRNA的3'端, 在没有相应信号存在情况下, 反义RNA保持双链, 不对靶基因转录产生调控作用, 当目标信号与核酸适配体结合后, 分子构象发生变化, 双链反义RNA打开形成单链, 使得DNA识别区域能够与靶基因启动子区结合从而产生转录激活或抑制效果。该基因线路在活细胞水平特异感应多个肿瘤信号分子(ETS-1、AFP、NF- κ B、 β -catenin), 进而激活多条下游抑癌信号通路(E-cadherin细胞迁移通路、Bax-Bcl2细胞凋亡通路), 由此组成新的“信号转导网络”, “重新编程”癌细胞的分子信息程序, 逆转其恶性生物学行为, 或诱导其凋亡(图2)。受蛋白质信号调控的CRISPR/dCas9转录因子能动态响应, 并有效处理不同的肿瘤信号, 进一步改变细胞内信号传递(信息流)方向, 这种特性使其有潜力发展成为构建人工基因线路的重要工具。因此, 这种新型CRISPR/dCas9介导的信号传感器可在合成生物学和癌症治疗中得以发挥更多应用。

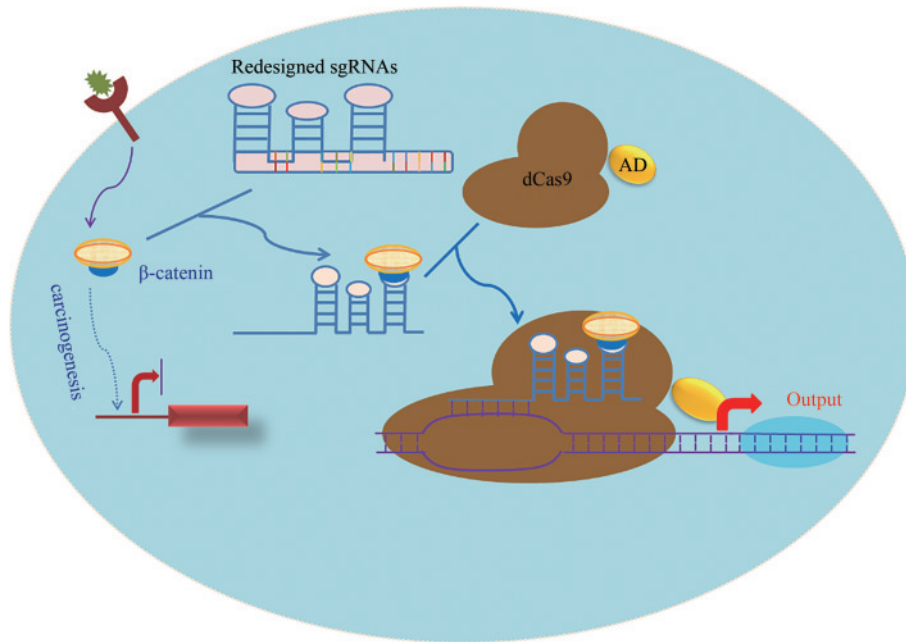


图2 基于 CRISPR/Cas 技术的信号传感器

[β -catenin 激活 Wnt 通路，促进肿瘤细胞增殖。人工设计的 sgRNA 优先结合内源性 β -连环蛋白，进而被激活。接着，人工设计的 sgRNA 与 dCas9 蛋白结合，并与靶序列结合、激活输出基因，如内源性抑癌基因（如 p53）或凋亡基因（如 p21 和 caspase 3），使肿瘤细胞由癌发生信号通路重新定向为抗癌信号通路]

Fig. 2 Schematic diagram for the signal conductor that links one signal with another developed based on CRISPR/Cas technology

[The β -catenin activates the Wnt pathway, and promotes the proliferation of tumor cells. The redesigned sgRNA preferentially binds to the endogenous β -catenin, and then couples with dCas9-AD protein to activate the output genes, such as the endogenous tumor suppressor genes (eg, p53) or apoptosis genes (eg, p21 and caspase 3), enabling the tumor cells to redirect oncogenic signaling to an anti-oncogenic pathway.]

3 基于 CRISPR/Cas9 技术的多基因同步调控

与传统的基因编辑工具如转录激活因子样效应核酸酶 (TALENs) 和锌指核酸酶 (ZFNs) 相比，CRISPR/Cas9 不仅高效便捷，尤其具有在单个细胞内同时调控多个靶点的潜力^[42]。将 dCas9 蛋白融合到某基因的转录抑制或转录激活结构域，便可下调或上调特定的单个基因，随着 CRISPR 技术的成熟，利用多基因靶向串联 sgRNA 阵列设计即可实现同时调控多个内源基因的表达^[43]，并且这种控制可以按需求而人为设置。

当 dCas9 直接和一个转录相关域（即激活或抑制）融合时，它仅提供一种调节方法。然而，有研究已经表明 sgRNA 可以招募不同的转录相关结构域，因而具有同时上调和下调不同基因的能力^[44]。RNA 结合蛋白用于携带相应的转录相关结构域，并特异性结合 RNA 发夹结构，不同的 RNA

发夹结构与 sgRNA 融合后，可以激活或抑制相应基因的转录。这一技术为癌症的精准治疗提供了广阔的应用前景和巨大的应用价值，也为生物学科学提供了更多的可能性。然而，基因在肿瘤细胞的生长发育中始终发挥着重要作用，但基因的功能复杂多变，因此需要针对不同的基因选择不同的调控方式。

4 基于新型 CRISPR/dCas12a 的工程细胞信号传导

CRISPR/Cas9 系统在肿瘤精准治疗中潜力巨大，其有效递送至靶细胞是一个影响应用的重要因素。*SpCas9* 是最常用的 CRISPR 核酸酶基因，大小约为 4.2 kb，这是现有生物技术应用中常见的分子大小。然而，在细胞中表达 Cas9 蛋白还需要增加启动子等调控元件，这就增大了该基因系统的

总体大小。此外，若要细胞中表达的 Cas9/dCas9 蛋白不发挥其生物学功能，还需要在细胞中共表达其他成分（如 sgRNA、供体模板、转录激活子或转录阻遏物等），共表达载体的尺寸通常大于现有病毒载体容量，因而难以使用常见的载体（如腺相关病毒 AAV）递送这一“庞大”基因系统。

目前的解决方案是使用小型化、拆分的 *SpCas9* 蛋白和 CRISPR 系统。研究者们相继发现了一系列尺寸较小的 CRISPR/Cas 蛋白，如来自金黄色葡萄球菌的 Cas9 (*SaCas9*)^[45] (3.2 kb)、新发现的基因组编辑工具 CasX (3.0 kb)^[46]，或构建 mini-*SpCas9* 等系统^[47-49]。然而，小型化 CRISPR 基因编辑效率可能远低于野生型 *SpCas9* 以及来自普雷沃菌 (*Prevotella*) 和弗朗西斯菌 1 (*Francisella 1*) 的 CRISPR (Cpf1, 也称为 Cas12a)。Cas12a 是麻省理工学院张锋研究组发现的一种比 Cas9 更小的蛋白质，易于包装和递送，其在哺乳动物细胞中具有与 *SpCas9* 相当的靶向切割效率。通过对 Cas12a 基因两个位点 (D10A、H841A) 进行点突变，可使 Cas12a 蛋白丧失核酸内切酶的活性 (dCas12a)，但保留其通过 sgRNA 结合特定 DNA 序列的能力，其在基因组编辑中的信号放大和转录调控方面具极大的应用价值。

Cas12a 对靶标识别更加严格，其有望解决 Cas9 “基因靶向特异性低”的问题。Liu 等^[50] 首先在真核细胞鉴定了 CRISPR/dCas12a 调控基因转录激活或抑制的能力，再利用构建 crRNA 偶联核糖开关、将 G 蛋白偶联受体融合到 Cas12a 蛋白这两种方式，分别实现了细胞内不同类型配体分子控制的可编辑 Cas12a 系统以调节内源基因转录。这一设计使细胞能够通过响应不同类型的配体信号调节内源性基因的转录，从而在细胞内构建具有全新输入-输出连接的人工信号通路，以控制细胞行为。当从一个转录本中加工多个串联的 crRNA 时，该系统表现出信号放大，这符合细胞内信号传递级联放大的重要特征，提示 Cas12a 为工程化定制细胞信号线路提供了一个可靠、有效的平台，极大提高了智能化基因线路在未来精准癌症治疗中的应用潜力。

5 无启动子基因表达技术 (CRISP-Reader)

随着 CRISPR 系统结合并激活靶 DNA 转录能力的不断优化，基于 CRISPR 的人工基因表达调控装置得到了广泛的研究^[51]。基因由 DNA 密码子组成，包括启动子及其读码控制等表达元件。Liu 等^[52] 利用 CRISPR 开发了一种读码系统 (CRISPReader)，它是一种新型的以稳健方式控制的非启动子依赖的基因表达技术，其显著特征是能够“阅读”基因簇的开放阅读框架，而不需要传统的调控元件或其他辅助因子。该系统通过 TATA 盒进行初步转录起始，然后利用 sgRNA 介导的基于 dCas9 的转录激活因子与 TATA 盒上游序列的结合促进转录，实现正反馈的表达回路 (图 3)。利用该策略建的紧凑型 AAV-CRISPR-Cas9 一体化系统，简化了冗余的基因线路，消除调控元件与细胞基因组之间的相互干扰，不仅在反式激活、DNA 切割和基因编辑方面比编码两个独立 Cas9 元件的双 AAV 载体更有效，还解决了现有 AAV 对 CRISPR 系统包装尺寸问题。

6 基于 CRISPReader 的微型基因线路 (minigene)

通过将 dCas9 与 VP64 (一个强转录激活域) 融合，可以实现 CRISPR 介导的转录激活^[53]，在 dCas9 的引导下，VP64 将转录元件招募到特定序列上，从而实现靶基因的转录起始激活或链延伸。Liu 等^[52] 通过调节 sgRNA 间隔的长度，可控制 Cas9-VP64 融合蛋白在转录激活和 DNA 切割两种功能之间的切换：当 sgRNA 间隔区长度为 20 nt 时，Cas9-VP64 可诱导 DNA 切割断裂，而当 sgRNA 间隔区长度为 14 nt 时，Cas9-VP64 仅起转录激活作用，并且 Cas9-VP64 的靶向特异性优于 Cas9 蛋白。

如图 4 所示，首先将 Cas9-VP64 引入基因线路，并删除膀胱组织特异性启动子 UPII 和癌特异性启动子 TERT 元件，仅保留相应的转录因子结合元件。结合已知 TERT 启动子序列的肿瘤靶向转录

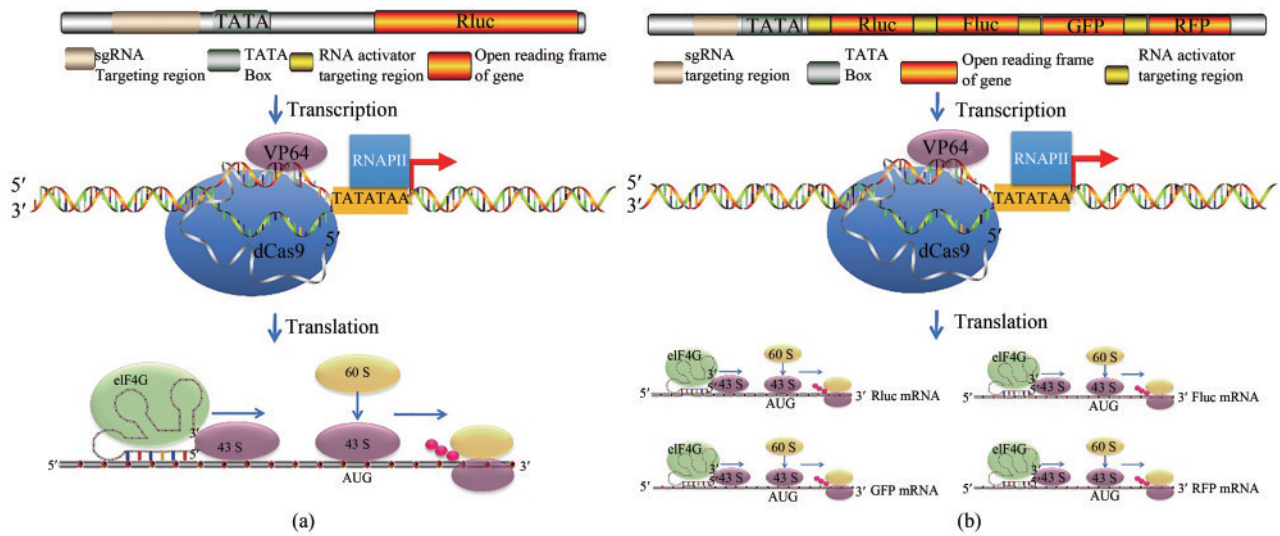


图3 CRISPRReader 通过耦合转录和翻译机制来驱动无启动子基因表达^[52]

(a) CRISPRReader 通过组合的转录和翻译的平台构成。当 dCas9-VP64 融合蛋白包括 1 个催化失活的 Cas9 和 1 个 VP64 转录激活结构域，VP64 结构域可招募 RNA 聚合酶 II，sgRNA 与靶基因 TATA 盒上游位点同源，sgRNA 与靶序列结合进一步引导 dCas9-VP64 结合与 TATA 盒上游，强力激活靶报告基因 *RLuc* 的转录。RNA 激活导致转录起始因子复合物的形成，其包括 eIF4G 以及招募来的核糖体，这时翻译启动。(b) CRISPRReader 驱动基因簇表达的机制。在 dCas9-VP64 激活转录后，RNA 激活剂与每个目标 mRNA 结合并独立启动 mRNA 翻译。RNAPII—RNA polymerase II (RNA 聚合酶 II)

Fig. 3 CRISPRReader drives gene expression by coupling the transcriptional and translational mechanisms^[52]

(a) CRISPRReader is constructed by combining transcriptional and translational platforms. The dCas9-VP64 protein robustly activated transcription of reporter is constructed when combined with sgRNA targeting sequences near the TATA box. Then, the RNA activator leads to the formation of initiation factor complexes involving eIF4G and recruits ribosomes to initiate translation. (b) mechanisms of the CRISPRReader designed to drive the gene cluster expression. After dCas9-VP64-mediated transcription, the RNA activators bind to each targeted mRNA and independently initiates mRNA translation.

活性主要由 c-Myc 转录因子决定，而 UPII 启动子序列的膀胱上皮组织特异性主要由 Get1 转录因子调控。理论上讲，c-Myc 和 Get1 仅在膀胱癌细胞中具有相对高的表达水平。初始表达后，sgRNA 可进一步与自身转录起始位点 (TATA box) 上游结合，并通过正反馈机制放大转录信号 (c-Myc 和 Get1) 的激活效应，驱动其下游基因转录。Cas9-VP64/sgRNA2 进一步抑制 *Lacl* 基因的表达，使荧光素酶报告基因被转录激活。在正常的膀胱上皮细胞中，荧光素酶不能被有效转录，并且在背景水平上被微量的 *Lacl* 表达进一步沉默。从传统的基因线路中减少 3.2 kb 的 DNA 序列后，利用单个质粒载体将 minigene 线路转染到细胞中 (传统的基因线路需要多个质粒载体共转染)。质粒转染 48 h 后检测报告基因荧光素酶表达水平显示，正常细胞中荧光素酶表达泄漏在 minigene 线路中几乎不存在，而在膀胱癌高恶性亚组中荧光素酶表达水平约为低恶性亚组的 1.5 倍，这表明与传统基因

线路相比，小基因线路对膀胱癌的认识灵敏度更高。将荧光素酶基因换为 Bax、p21、E-cadherin 等抑癌因子的基因，进一步利用体内体外实验，测试线路对膀胱癌细胞的选择性识别及抑癌能力后发现，高度控制的微型基因线路相比传统逻辑线路和基因线路有更好的癌症诊断和抑癌效率^[53]。这一研究作为精准肿瘤治疗提供了一个应用工具，并可能为目前医学合成生物学应用的障碍提供一个潜在的有效解决方案。

7 靶向线粒体 DNA 的 CRISPR/Cas 工具

线粒体 DNA (mtDNA) 序列的变异在肿瘤中很常见，线粒体基因型的细微变化会对细胞核、癌发生和进展产生深远的影响^[55-56]。CRISPR/Cas9 在核基因编辑方面取得了快速进展，其应用涉及 gRNA 引导 Cas9 至待编辑 DNA 区域，由于线粒体

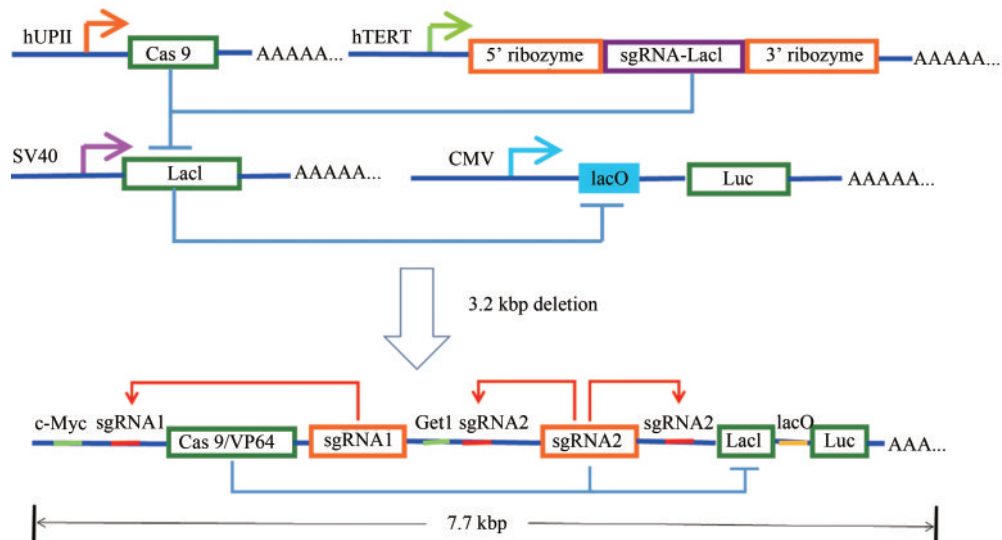


图4 与门微型基因线路的设计与构建^[54]

(UPII 启动子驱动 Cas9 mRNA 的转录，而 TERT 启动子用于促进靶向 *LacI* 的 sgRNA 的转录。输出海肾荧光素酶基因受 *LacI* 控制的 CMV 启动子调控。荧光素酶仅在 UPII 启动子和 TERT 启动子都被激活时表达。在小基因线路的设计中，UPII 和 TERT 启动子被它们各自的转录因子结合元件取代。c-Myc 和 Get1 仅在膀胱癌细胞中同时具有相对较高的表达水平。sgRNA1 和 sgRNA2 初始表达后，它们可以进一步结合自身转录起始位点的上游，通过正反馈机制放大 c-Myc 和 Get1 的转录信号，分别放大下游基因的转录。此外，*LacI* 基因被 sgRNA2 敲除，荧光素酶报告基因被转录激活。在正常膀胱上皮细胞中，荧光素酶不能被有效转录，并被在背景水平表达的痕量 *LacI* 进一步沉默)

Fig. 4 Design and construction of the AND gate minigene circuits^[54]

(The UPII promoter drives the transcription of Cas9 mRNA, while the TERT promoter is used to promote the transcription of sgRNA targeting *LacI*. The output Renilla luciferase gene is regulated by a *LacI*-controlled CMV promoter. The luciferase is expressed only when both UPII promoter and TERT promoter are activated. In the design of the minigene circuit, the UPII and TERT promoters are replaced by their respective transcription factor binding elements. Both c-Myc and Get1, only in bladder cancer cells, have a relative high expression level at the same time. After initial expression of sgRNA1 and sgRNA2, they could further bind to the upstream of their own transcription initiation sites, and amplify the transcription signals of c-Myc and Get1 through the positive feedback mechanism to amplify their downstream gene transcription. Furthermore, the *LacI* gene is knocked out by sgRNA2, and luciferase reporter gene is activated by transcription. In normal bladder epithelial cells, luciferase could not be effectively transcribed and further silenced by a trace amount of *LacI* expressed at the background level.)

缺乏输入 RNA 的能力，如何将 RNA 引入线粒体等问题限制了 CRISPR/Cas9 系统在线粒体基因编辑应用的可行性和有效性。

2015 年首次报道 CRISPR/Cas9 系统成功应用于线粒体基因编辑^[57]。然而，该研究结果与另一研究存在一些争议。首先，gRNA 引入线粒体的机制尚不明确。20 个核苷酸茎环系列来自 H1 RNA (RNase P enzyme RNA component)^[58]，它附着在注入的细胞质 RNA 上，可以成功地将 RNA 靶向到线粒体中。该方法对非编码 RNA (如 tRNA) 和编码蛋白质的 mRNA 均有效，为在 CRISPR/Cas9 系统中将 gRNA 导入线粒体提供了思路。Gammage 等总结了现有的 RNA 导入理论，他们否认 mtRNase P 中存在 RNA 成分，认为 RNase P 和 RNase MRP 主要在细胞核中发挥作用，并质疑线粒体核糖体在协助 rRNA 和 PNPase 在细

胞质 RNA 运输中的作用^[59]。也有报道称，酵母胞质 tRNA^{Lys} (CUU) 的两个结构域 F-arm 和 D-hairpin^[60]，以及 5S RNA 的一些结构域也可能帮助 RNA 进入线粒体^[61]。

由于线粒体中只存在同源重组 (HR) 修复途径，缺乏非同源末端连接 (NHEJ) 修复，利用 CRISPR/Cas9 系统产生双链断裂 (DSB) 和支持同源互补的外源 DNA 片段，已成功在人和斑马鱼线粒体^[62]、酵母线粒体的 mtDNA 中插入 DNA 序列^[62]。过去，由于膜电位、pH 和噬菌体的吞噬作用，DNA 对线粒体的渗透面临很大困难^[63]。近年来，用 DNA 包被钨颗粒、DQAsome (由 dequalinium 制成的阳离子囊泡)/DNA 复合物和 TAT (trans-activator of transcription protein) 等方式修饰的 DNA，加载至基因枪对细胞进行轰击，成功实现了外源 DNA 进入酵母的线粒体^[61]。

另一项研究利用 MTS 修饰腺相关病毒衣壳 VP2 并成功将 ND4 基因转运到线粒体中, 为线粒体递送 DNA 序列提供了一种新方法^[64]。其他用于药物或蛋白质的线粒体输送系统是通过金属有机开架 (MOF) 或三苯基膦 (TPP) 和细胞穿透聚(二硫化物) (CPD) 修饰的可生物降解二氧化硅纳米粒子 (BS-NPs), 它们有可能用于外源性 DNA 或 RNA 成分的线粒体递送^[65-66]。在 Bian 等^[67]的研究中, 在体外用 MTS 和转录物修饰 Cas9, 然后将 gRNA 和体外转录产物显微注射到细胞质中; 他们还通过 ViaFect 转染引入了含有同源臂的外源 DNA 载体。令人惊讶的是, 具有短同源臂的外源 ssDNA 被准确敲入了靶向位点, 这种诱变可以稳定地传递给 F1 代斑马鱼, 这表明 ssDNA 和 gRNA 可以不加修饰地转运到线粒体中, 这与最近的研究一致^[68]。

8 基于 CRISPR/Cas9 基因线路的挑战与展望

CRISPR/Cas 系统已成为合成生物学领域的重要工具, 但其局限性不容忽视。当 dCas9 蛋白发挥其转录激活或转录抑制作用时, 它通常与转录激活因子 (VPR) 或转录抑制因子 (KRAB) 融合以增强功能, 而 dCas9-VPR/KRAB 的体积大于现有病毒载体容量, 这导致 CRISPR/dCas9 系统在现实中的应用受到限制。因此, 开发高效的递送途径是临床治疗前应解决的重要问题。

腺相关病毒 (adeno associated virus, AAV) 在临床治疗疾病已多年, 具有良好的递送效率和相对较高的安全性^[69]。AAV 作为稳定的辅助物存在, 不会整合到宿主细胞的基因组中。过去几年, AAV 在动物体内进行基因转移的能力已经得到证实, 包括人体靶组织, 如肝脏、视网膜、心脏、肌肉和中枢神经系统^[70-71]。因此, AAV 仍然是用于恶性肿瘤细胞基因治疗的常用载体。研究者正在努力寻找较小的 Cas 蛋白, 例如空肠弯曲杆菌中 Cas13d (仅 1000 个氨基酸), 以适应 AAV 递送系统。

溶瘤病毒是一种减毒或工程化病毒, 可因选

择性复制而导致癌细胞裂解, 并引发系统免疫反应, 已被认为是一类癌症免疫治疗药物^[72], 同时也是癌症治疗有前途的替代载体。有研究利用溶瘤腺病毒作为载体递送靶向 EGFR 的 CRISPR/Cas12a 系统, 以破坏肿瘤细胞增殖信号通路, 从而实现精确和癌症特异性基因组重编程和有效的肿瘤消退^[73]。利用重组溶瘤黏液瘤病毒 (oncolytic myxoma virus, MYXV) 递送诱导型 CRISPR 靶向 RAS 基因, 也显著降低了胚胎横纹肌肉瘤细胞的增殖^[74]。虽然许多溶瘤病毒单独只引起微弱的免疫反应, 但通过编码和局部释放细胞因子和趋化因子, 可以大大增强溶瘤病毒对肿瘤的治疗效果, 这有助于克服肿瘤微环境中的免疫抑制, 与免疫调节剂的系统给药相比, 副作用更小。Xie 等^[75]利用 microRNA 开关构建的基因线路, 进一步提高溶瘤病毒的癌症靶向特异性, 并在癌症微环境中成功触发了针对癌细胞的免疫反应。

2021 年 8 月张锋研究团队^[76]开发了一种全新的 RNA 递送平台——SEND (selective endogenous ncapsidation for cellular delivery), 其核心是一种逆转录病毒样蛋白 PEG10, 它能够与自身的 mRNA 结合并在其周围形成球型保护囊。研究团队将其改造设计后用来包装和递送 RNA。PEG10 是逆转录转座子衍生蛋白质的其中一种, 可形成类似于病毒的结构, 优先结合并促进其自身信使 RNA (mRNA) 的囊泡分泌, 并能够在细胞之间转移 RNA。而且, PEG10 所携带的 mRNA 可以被与 PEG10 的非翻译区域和相关 RNA 的侧翼基因重编程。利用这种可重编程性, 设计了小鼠和人类 PEG10 来包装、分泌和递送特定的 RNA, 用 PEG10 蛋白实现了对 Cas9 mRNA 以及 sgRNA 的包装, 并对人类细胞和小鼠细胞基因组的目标位点均成功实现了基因编辑。通过改造 PEG10 蛋白的 RNA 包装组件和识别组件, 理论上能针对不同疾病提供模块化的治疗平台。

另一方面, Cas9 等外源蛋白在人体中使用的安全性也不容忽视。自问世以来, 脱靶一直是 Cas9 编辑哺乳动物细胞的潜在问题。提高 CRISPR/Cas 的保真度可增强基因线路的可靠性, 并最大化地减少副作用。Doudna 等^[77-79]通过设计

一种开关,使CRISPR/Cas9完成编辑后失活,从而减少CRISPR技术的脱靶效应。研究者未来还可利用定向进化和理性设计等方法改善碱基编辑系统,以实现理想的、宽度可窄至单个核苷酸的靶向窗口,甚至达到100%的碱基替换效率。

目前,基于CRISPR/Cas的哺乳动物基因工具和基因线路正用于越来越宏大的目标,最大限度地提高CRISPR/Cas系统的保真度以及递送效率将对该领域的发展作用巨大,使用CRISPR技术的智能化基因线路将成为未来肿瘤基因治疗领域的一个重要方向。

参 考 文 献

- [1] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [2] BROPHY J A N, VOIGT C A. Principles of genetic circuit design[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(5): 508-520.
- [3] ROYBAL K T, RUPP L J, MORSUT L, et al. Precision tumor recognition by T cells with combinatorial antigen-sensing circuits[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 770-779.
- [4] NISSIM L, WU M R, PERY E, et al. Synthetic RNA-based immunomodulatory gene circuits for cancer immunotherapy[J]. *Cell*, 2017, 171(5): 1138-1150.
- [5] XIE M Q, YE H F, WANG H, et al. β -Cell-mimetic designer cells provide closed-loop glycemic control[J]. *Science*, 2016, 354(6317): 1296-1301.
- [6] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [7] TANG X, LOWDER L G, ZHANG T, et al. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17018.
- [8] YAMANO T, ZETSCHKE B, ISHITANI R, et al. Structural basis for the canonical and non-canonical PAM recognition by CRISPR-Cpf1[J]. *Molecular Cell*, 2017, 67(4): 633-645.
- [9] WANG L P, WANG H J, LIU H Y, et al. Improved CRISPR-Cas12a-assisted one-pot DNA editing method enables seamless DNA editing[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019, 116(6): 1463-1474.
- [10] NIHONGAKI Y, OTABE T, UEDA Y, et al. A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation[J]. *Nature Chemical Biology*, 2019, 15(9): 882-888.
- [11] FREIJE C A, MYHRVOLD C, BOEHM C K, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(5): 826-837.
- [12] YANG L Z, WANG Y, LI S Q, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(6): 981-997.
- [13] NANDAGOPAL N, ELOWITZ M B. Synthetic biology: Integrated gene circuits[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1244-1248.
- [14] FRIEDLAND A E, LU T K, WANG X, et al. Synthetic gene networks that count[J]. *Science*, 2009, 324(5931): 1199-1202.
- [15] DANINO T, MONDRAGÓN-PALOMINO O, TSIMRING L, et al. A synchronized quorum of genetic clocks[J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 326-330.
- [16] NIELSEN J, KEASLING J D. Engineering cellular metabolism[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1185-1197.
- [17] GUPTA S, BRAM E E, WEISS R. Genetically programmable pathogen sense and destroy[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(12): 715-723.
- [18] CULLER S J, HOFF K G, SMOLKE C D. Reprogramming cellular behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins[J]. *Science*, 2010, 330(6008): 1251-1255.
- [19] ZHAN H J, XIE H B, ZHOU Q, et al. Synthesizing a genetic sensor based on CRISPR-Cas9 for specifically killing p53-deficient cancer cells[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(7): 1798-1807.
- [20] MEGRAW M, CUMBIE J S, IVANCHENKO M G, et al. Small genetic circuits and microRNAs: Big players in polymerase II transcriptional control in plants[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(2): 286-303.
- [21] JANSING J, SACK M, AUGUSTINE S M, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 350-361.
- [22] NIHONGAKI Y, YAMAMOTO S, KAWANO F, et al. CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system[J]. *Chemistry & Biology*, 2015, 22(2): 169-174.
- [23] LIN F, DONG L, WANG W M, et al. An efficient light-inducible P53 expression system for inhibiting proliferation of bladder cancer cell[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(10): 1273-1278.
- [24] ZHOU X X, ZOU X Z, CHUNG H K, et al. A single-chain photoswitchable CRISPR-Cas9 architecture for light-inducible gene editing and transcription[J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(2): 443-448.
- [25] STROVAS T J, ROSENBERG A B, KUYPERS B E, et al. MicroRNA-based single-gene circuits buffer protein synthesis rates against perturbations[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2014, 3(5): 324-331.
- [26] KIPNISS N H, DINGAL P C D P, ABBOTT T R, et al. Engineering cell sensing and responses using a GPCR-coupled CRISPR-Cas system[J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1):

- 2212.
- [27] KIANI S, BEAL J, EBRAHIMKHANI M R, et al. CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(7): 723-726.
- [28] WANG Y D, LIAO S Y, GUAN N Z, et al. A versatile genetic control system in mammalian cells and mice responsive to clinically licensed sodium ferulate[J]. *Science Advances*, 2020, 6(32): eabb9484.
- [29] ZHOU Q, ZHAN H, LIAO X, et al. A revolutionary tool: CRISPR technology plays an important role in construction of intelligentized gene circuits[J]. *Cell Proliferation*, 2019, 52(2): e12552.
- [30] SHAO J W, XUE S, YU G L, et al. Smartphone-controlled optogenetically engineered cells enable semiautomatic glucose homeostasis in diabetic mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2017, 9(387): eaal2298.
- [31] YU Y H, WU X, GUAN N Z, et al. Engineering a far-red light-activated split-Cas9 system for remote-controlled genome editing of internal organs and tumors[J]. *Science Advances*, 2020, 6(28): eabb1777.
- [32] ZHANG Y, LING X Y, SU X X, et al. Optical control of a CRISPR/Cas9 system for gene editing by using photolabile crRNA[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(47): 20895-20899.
- [33] ZOU R S, LIU Y, WU B, et al. Cas9 deactivation with photocleavable guide RNAs[J]. *Molecular Cell*, 2021, 81(7): 1553-1565.
- [34] BUBECK F, HOFFMANN M D, HARTEVELD Z, et al. Engineered anti-CRISPR proteins for optogenetic control of CRISPR-Cas9[J]. *Nature Methods*, 2018, 15(11): 924-927.
- [35] NISSIM L, BAR-ZIV R H. A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells[J]. *Molecular Systems Biology*, 2010, 6: 444.
- [36] XIE Z, WROBLEWSKA L, PROCHAZKA L, et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1307-1311.
- [37] LI Y Q, JIANG Y, CHEN H, et al. Modular construction of mammalian gene circuits using TALE transcriptional repressors[J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(3): 207-213.
- [38] MA D C, PENG S G, XIE Z. Integration and exchange of split dCas9 domains for transcriptional controls in mammalian cells[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13056.
- [39] MORSUT L, ROYBAL K T, XIONG X, et al. Engineering customized cell sensing and response behaviors using synthetic Notch receptors[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 780-791.
- [40] LIU Y C, ZHAN Y H, CHEN Z C, et al. Directing cellular information flow via CRISPR signal conductors[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(11): 938-944.
- [41] LIU Y C, LI J F, CHEN Z C, et al. Synthesizing artificial devices that redirect cellular information at will[J]. *eLife*, 2018, 7: e31936.
- [42] STERNBERG S H, REDDING S, JINEK M, et al. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9[J]. *Nature*, 2014, 507(7490): 62-67.
- [43] CHENG A W, WANG H Y, YANG H, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system[J]. *Cell Research*, 2013, 23(10): 1163-1171.
- [44] ZALATAN J G, LEE M E, ALMEIDA R, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds[J]. *Cell*, 2015, 160(1/2): 339-350.
- [45] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-191.
- [46] BURSTEIN D, HARRINGTON L B, STRUTT S C, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes[J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 237-241.
- [47] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [48] NISHIMASU H, CONG L, YAN W X, et al. Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9[J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1113-1126.
- [49] STERNBERG S H, LAFRANCE B, KAPLAN M, et al. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9[J]. *Nature*, 2015, 527(7576): 110-113.
- [50] LIU Y C, HAN J H, CHEN Z C, et al. Engineering cell signaling using tunable CRISPR-Cpf1-based transcription factors[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2095.
- [51] KIANI S, CHAVEZ A, TUTTLE M, et al. Cas9 gRNA engineering for genome editing, activation and repression[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(11): 1051-1054.
- [52] ZHAN H J, ZHOU Q, GAO Q J, et al. Multiplexed promoterless gene expression with CRISPRReader[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 113.
- [53] WEI S, ZOU Q J, LAI S S, et al. Conversion of embryonic stem cells into extraembryonic lineages by CRISPR-mediated activators[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19648.
- [54] LIU Y C, HUANG W R, CAI Z M. Synthesizing and gate minigene circuits based on CRISPRReader for identification of bladder cancer cells[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5486.
- [55] KOPINSKI P K, SINGH L N, ZHANG S P, et al. Mitochondrial DNA variation and cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2021, 21(7): 431-445.
- [56] CHOUDHURY A R, SINGH K K. Mitochondrial determinants of cancer health disparities[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2017, 47: 125-146.
- [57] JO A, HAM S, LEE G H, et al. Efficient mitochondrial genome

- editing by CRISPR/Cas9[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 305716.
- [58] WANG G, SHIMADA E, ZHANG J, et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(13): 4840-4845.
- [59] GAMMAGE P A, MORAES C T, MINCZUK M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized[J]. *Trends in Genetics*, 2018, 34(2): 101-110.
- [60] SMIRNOV A, TARASSOV I, MAGER-HECKEL A M, et al. Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria[J]. *RNA*, 2008, 14(4): 749-759.
- [61] YANG X B, JIANG J C, LI Z Y, et al. Strategies for mitochondrial gene editing[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 3319-3329.
- [62] YOO B C, YADAV N S, OROZCO E M JR, et al. Cas9/gRNA-mediated genome editing of yeast mitochondria and *Chlamydomonas* chloroplasts[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8362.
- [63] YUAN P Y, MAO X, WU X F, et al. Mitochondria-targeting, intracellular delivery of native proteins using biodegradable silica nanoparticles[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(23): 7657-7661.
- [64] TORCHILIN V P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2006, 8: 343-375.
- [65] HADDAD S, ABÁNADES LÁZARO I, FANTHAM M, et al. Design of a functionalized metal-organic framework system for enhanced targeted delivery to mitochondria[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(14): 6661-6674.
- [66] LOUTRE R, HECKEL A M, SMIRNOVA A, et al. Can mitochondrial DNA Be CRISPRized: Pro and Contra[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(12): 1233-1239.
- [67] BIAN W P, CHEN Y L, LUO J J, et al. Knock-in strategy for editing human and zebrafish mitochondrial DNA using Mito-CRISPR/Cas9 system[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 621-632.
- [68] SWARTS D C, HEGGE J W, HINOJO I, et al. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(10): 5120-5129.
- [69] DUNBAR C E, HIGH K A, JOUNG J K, et al. Gene therapy comes of age[J]. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672.
- [70] GRIMM D, BÜNING H. Small but increasingly mighty: latest advances in AAV vector research, design, and evolution[J]. *Human Gene Therapy*, 2017, 28(11): 1075-1086.
- [71] LENIS T L, SARFARE S, JIANG Z C, et al. Complement modulation in the retinal pigment epithelium rescues photoreceptor degeneration in a mouse model of Stargardt disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(15): 3987-3992.
- [72] KAUFMAN H L, KOHLHAPP F J, ZLOZA A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(9): 642-662.
- [73] YOON A R, JUNG B K, CHOI E, et al. CRISPR-Cas12a with an oAd induces precise and cancer-specific genomic reprogramming of EGFR and efficient tumor regression[J]. *Molecular Therapy*, 2020, 28(10): 2286-2296.
- [74] PHELPS M P, YANG H, PATEL S, et al. Oncolytic virus-mediated RAS targeting in rhabdomyosarcoma[J]. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 2018, 11: 52-61.
- [75] HUANG H Y, LIU Y Q, LIAO W X, et al. Oncolytic adenovirus programmed by synthetic gene circuit for cancer immunotherapy[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 4801.
- [76] SEGEL M, LASH B, SONG J W, et al. Mammalian retrovirus-like protein PEG10 packages its own mRNA and can be pseudotyped for mRNA delivery[J]. *Science*, 2021, 373(6557): 882-889.
- [77] SHIN J, JIANG F G, LIU J J, et al. Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic[J]. *Science Advances*, 2017, 3(7): e1701620.
- [78] CHEN J S, DAGDAS Y S, KLEINSTIVER B P, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy[J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-410.
- [79] HARRINGTON L B, DOXZEN K W, MA E, et al. A broad-spectrum inhibitor of CRISPR-Cas9[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1224-1233.e1215.



通讯作者: 黄卫人(1980—),男,研究员,博士生导师。主要研究方向:(1)肿瘤基因组学,应用多组学手段鉴定肿瘤及微环境诊疗标志物,开发相关临床应用;(2)肿瘤类器官,利用体外培养系统还原肿瘤体内生长,药物筛选及耐药机制研究;(3)医学合成生物学,创新肿瘤治疗新方法。

E-mail: pony8980@163.com



第一作者: 宋斐(1979—),女,副研究员,硕士生导师。

E-mail: lst121@outlook.com