

CRISPR/Cas9 技术在遗传性心肌疾病研究中的进展

许霏¹ 王永明^{1,2} 沈雳¹

(1. 复旦大学附属中山医院心内科 上海市心血管病研究所, 上海 200032; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

【摘要】 基因编辑技术是一种能在基因组水平进行 DNA 序列稳定、精确改造的技术, 以 CRISPR/Cas9 技术应用最广泛。在遗传性心肌疾病研究中, CRISPR/Cas9 技术能被用于构建家族性肥厚型心肌病、扩张型心肌病、左心室心肌致密化不全等多种疾病模型, 探究致病基因在各疾病发生发展中的作用, 为疾病诊治提供有力帮助。目前, 通过将 CRISPR/Cas9 技术与多能干细胞等技术相结合, 国内外研究者已在细胞和动物水平开展了多种基因相关心血管疾病的形态和功能等研究, 极大地推动了相关领域的发展。

【关键词】 基因编辑; 基因工程; CRISPR/Cas9; 心血管病; 心肌疾病

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2019.09.011

CRISPR/Cas9 Technologies in Inherited Cardiomyopathy

XU Fei¹, WANG Yongming^{1,2}, SHEN Li¹

(1. Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

【Abstract】 Genome-editing is a kind of techniques which transforms DNA sequences stably and accurately at genomic level, and CRISPR/Cas9 is the most widely used genome-editing technique. CRISPR/Cas9 can be utilized to construct disease models in the research of inherited cardiomyopathy, such as familial hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, and left ventricular non-compaction cardiomyopathy, to investigate the role of defected genes in the occurrence and development of diseases, and provide effective help in the diagnosis or therapy of diseases. Currently, by combining the genome-editing techniques with other techniques such as pluripotent stem cells, scientists have performed researches of multiple cardiovascular diseases both in vitro and in vivo, which greatly promoted the development of cardiovascular disease research.

【Key words】 Gene editing; Genetic engineering; CRISPR/Cas9; Cardiovascular diseases; Cardiomyopathy

1 引言

心肌疾病包括遗传性心肌病、获得性心肌病和混合性心肌病, 常表现为心肌机械障碍和/或心电功能障碍, 最终可导致患者发生进行性心力衰竭或心脏性死亡。传统的药物和手术治疗均有局限性, 亟需将基因工程等新的技术和方法应用到心血管病的研究及临床诊疗中。

基因编辑是一种在基因组上对 DNA 序列进行精确敲除、插入和替换, 从而实现基因组序列稳定改造的技术^[1]。目前主要有 3 种基因编辑技术, 即锌指核

酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶和成簇规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR/Cas9) 技术, 目前以 CRISPR/Cas9 最常用。CRISPR/Cas9 技术已被用于构建多物种的多种遗传性心肌疾病模型, 在体内或体外修正突变实现部分基因相关疾病的治疗, 极大推动了心血管病的研究工作。

2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

基因编辑技术的原理是在目的基因序列上产生 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB), 激活细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81670319)

通讯作者: 沈雳, E-mail: shen.li1@zs-hospital.sh.cn

的 DNA 修复系统,在修复过程中改变 DNA 序列^[1]。细胞主要通过两种途径修复 DNA 序列,即非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous-directed recombination, HDR)修复^[2]。NHEJ 是 DNA 断裂后最常见的修复方式,仅能造成 DNA 序列的随机改变,而 HDR 则能够引入一个与 DSB 同源的外源 DNA 作为修复模板,使基因组 DNA 产生精确的序列改变。此两种途径竞争修复 DSB,用药物等手段抑制 NHEJ 可以促进 HDR 发生^[3]。

基因编辑的核心技术是制造能够识别并特异性切割 DNA 序列的核酸酶。锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶技术中的核酸酶是基于 FokI 内切酶改造得到的^[3]; CRISPR/Cas9 技术中的核酸酶为 Cas9 核酸内切酶,通过识别前间区序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)进行 DNA 双链切割^[4]。

CRISPR/Cas9 技术是目前最常用的基因编辑技术,来源于细菌和古细菌的获得性免疫系统。该系统包括 Cas9 核酸内切酶和单链向导 RNA(single guide RNA, sgRNA)两个元件,通过激活、识别靶位点、结合靶位点和定点切割的过程发挥功能。CRISPR/Cas9 在 sgRNA 与 Cas9 蛋白的特定位点相结合后进入激活状态,sgRNA 能够在基因水平搜寻具有 PAM 序列的 DNA 序列,通过前 20 个核苷酸与目标 DNA 碱基配对,并利用 Cas9 蛋白进行切割^[4]。该技术只需改变 sgRNA 的前 20 个核苷酸序列就可对基因组的不同位点实现靶向编辑,理论上能够识别任何含 PAM 序列的 DNA 片段。目前最常用的 Cas9 是源于链球菌的 SpCas9,活性较高,识别的 PAM 序列为简单的 NGG^[3],该序列在人基因组中每 8~12 bp 出现一次。来自金黄色葡萄球菌等不同细菌的 Cas9 酶能够识别 NGRN 等不同的 PAM 序列,能够对不同基因片段进行编辑,它们组合起来扩展了编辑范围^[5]。

然而,CRISPR/Cas9 技术仍有局限性。例如,该技术实现基因编辑有赖于 PAM 序列,在附近无 PAM 序列的区域无法进行编辑。此外,由于 CRISPR/Cas9 能够容忍 sgRNA 与 DNA 间的错配,基因组中与靶位点序列相似的序列也会被 CRISPR/Cas9 识别并切断,出现脱靶。

研究者们发明了多种策略来克服 CRISPR/Cas9 的脱靶问题。Guilinger 等^[6]利用切割活性突变的 Cas9,将无催化活性的 Cas9 与 FokI 核酸酶结构域融合,大幅提高了 Cas9 的切割准确性。目前,科学家已

构建出多个特异性高的 Cas9 蛋白,包括 eSpCas9(1.1)^[7]、Cas9-HF1^[8]、HypaCas9^[9]等。近年,Liu 等将胞嘧啶脱氨酶或鸟嘌呤脱氨酶与只产生单缺口的 Cas9 蛋白融合,实现 C>T(G>A)或 A>G(T>C)转变^[10-11],发明了不依赖 DSB 的单碱基编辑方法,为基因编辑技术的发展提供了全新思路。

3 遗传性心肌病

肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)、扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)和遗传性离子通道病等心肌疾病的发生和发展均与单个或多个基因突变有关。目前,基因编辑技术主要用于由单基因突变导致的心肌疾病的研究和诊疗中^[3]。

多种基因突变可导致心肌细胞机械功能异常。例如,HCM 的发生与编码肌节蛋白的基因异常相关,约 70% 的患者具有 MYBPC3 或 MYH7 基因突变,其他患者常存在 TNNT2、TNNI3 或 TPM1 等基因突变^[12]。部分 DCM 呈家族遗传性,与编码肌联蛋白的基因异常相关,约 27% 的 DCM 患者存在肌联蛋白基因截断突变^[13]。左心室心肌致密化不全以心室内存在粗大的肌小梁和深陷的小梁隐窝为主要特征,与胚胎时期心肌致密化过程停止相关,TAZ、ACTC1 或 TNNT2 等基因突变可导致该病发生^[14]。致心律失常性右室心肌病患者常表现为心室壁进行性心肌萎缩及纤维化,与编码桥粒蛋白的基因异常相关,PKP2、DSG2、DSC2、DSP、JUP、TMEM43 或 TGFβ3 突变可能引起该病^[15]。假肥大性肌营养不良(duchenne muscular dystrophy, DMD)是一种侵犯心肌和骨骼肌的进行性肌营养不良症,为伴 X 染色体隐性遗传病,与 DMD 基因突变有关,约 13% 的患者在该基因第 48~50 外显子处存在突变^[5]。

多种遗传性离子通道病具有明确的致病基因。Chen 等^[16]于 1998 年发现 SCN5A 是 Brugada 综合征的致病基因。该基因突变可导致 Nav1.5 钠通道蛋白异常,致使电流密度降低,表现为心电图 ST 段改变及室性心律失常。多数长 QT 综合征^[17]患者存在 KCNQ1、KCNH2 或 SCN5A 基因突变,其中 KCNQ1 与 KCNH2 基因突变导致钾通道异常,分别使缓慢激活延迟整流钾通道及快激活延迟整流钾通道复极电流失调,动作电位与 QT 间期延长;SCN5A 突变则导致钠通道失活障碍,在复极过程中持续开放,可能引起恶性心律失常。Baruteau 等^[18]于 2018 年证实了 SCN5A 突变类型与长 QT 综合征患者的临床表型密切相关。

以上疾病致病基因较明确,现有治疗方案效果有限,利用基因编辑技术修正以上突变有望改善患者心脏功能。

4 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对遗传性心肌疾病的研究现状

4.1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术与多能干细胞技术结合研究遗传性心肌疾病

人体多能干细胞包括胚胎干细胞和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC),可被诱导分化成包括人体多能干细胞分化的心肌细胞(human pluripotent stem cell derived-cardiomyocyte, hPSC-CM)和收缩型平滑肌细胞在内的多种人体细胞,为心血管疾病的研究提供了有力的工具。

遗传性心肌病患者特异性的 iPSC 细胞可用于疾病模型的构建与研究。Lan 等^[19]利用 MYH7 基因突变的 HCM 患者的表皮细胞,制作出了 HCM 干细胞模型,可用于该病的机制研究。Kodo 等^[20]将携带 TBX20 突变的左心室心肌致密化不全患者的成纤维细胞重编程为 iPSC,诱导分化为 TGF- β 信号通路异常激活的 hPSC-CM 并通过 CRISPR/Cas9 修正突变,成功改善其细胞功能。Liang 等^[21]基于 iPSC 构建的单细胞 Brugada 综合征模型重现了 Brugada 综合征的心肌细胞电生理特性,包括内向钠电流减弱、触发激动增强及钙离子异常传递。Limpitkul 等^[22]利用长 QT 综合征患者来源的 hPSC-CM,发现修正 CALM 基因突变可改善细胞的疾病表型。

然而,利用 iPSC 技术制作疾病模型周期长,工作繁琐,已有大量研究借助 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将致病突变引入到干细胞中以构建携带突变的心肌疾病模型并开展研究。Mosqueira 等^[23]首次针对 HCM 的致病突变 c. C9123T-MYH7 构建了 11 种突变型 hPSC-CM,可用于形态学、电生理和代谢功能等研究。Chang 等^[24]于 2017 年利用 CRISPR/Cas9 技术构建了两种 FHL2 基因敲除胚胎干细胞系,可用于 DCM 的机制研究及药物筛选。Ceholski 等^[25]通过构建 R9C PLN 突变 hiPSC-CM 细胞系,证实了该突变可导致心肌细胞对 β 受体激动剂反应迟缓,并且可引起钙离子调控异常。此类模型构建周期较短,易进行疾病相关基因突变的高通量筛选试验,在可能导致心肌疾病的临床意义不明的基因突变鉴定中具有良好的应用价值^[26-27]。

以上研究表明,通过将基因编辑技术与多能干细胞技术相结合,研究者能够在人类细胞中更深入地探

究遗传性心肌疾病的发病机制,辅助药物研发和疾病诊治。

4.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在动物水平对遗传性心肌疾病的研究

目前,借助细胞模型无法研究遗传性心肌病的致病基因对于机体组织和器官的作用,故动物水平的研究仍具有必要性。

通过将基因编辑元件注射到小鼠等动物的受精卵或成体中,研究者能够快速构建疾病动物模型并开展疾病研究。Amoasii 等^[28]利用 CRISPR/Cas9 技术敲除小鼠 Dmd 基因第 50 外显子,构建出心肌细胞内抗肌萎缩蛋白表达量显著降低的 DMD 小鼠模型,并通过引入靶向第 51 外显子的 sgRNA 实现该外显子跳跃,成功使小鼠心肌中抗肌萎缩蛋白表达量恢复至正常水平。

近年,研究者们开发了基于 CRISPR/Cas9 的心脏特异性基因编辑技术以进行遗传性心肌疾病的精准研究。2016 年,Carroll 等^[29]利用 Cre-loxP 技术构建了胚系转基因心脏特异性表达 Myh6/Cre 的小鼠,借助 AAV9 在成年小鼠心肌中转入靶向 Myh6 的 sgRNA,成功构建出具有心肌肥厚表型的心脏特异性 Myh6 基因敲除动物模型。随后,Johansen 等^[30]利用 AAV9 在心肌细胞特异表达 Cas9 的小鼠中敲除 Myh6、Tbx20 或 Sav1 的表达以产生镶嵌型基因型的小鼠,证实 Myh6 的镶嵌型敲除能够导致其心功能下降。

5 应用前景

5.1 胚胎基因组编辑治疗遗传性心肌疾病

Liang 等^[31]于 2015 年成功编辑人受精卵中 β -珠蛋白基因,证实了 CRISPR/Cas9 技术对受精卵基因组具有较好的编辑能力。2017 年,Ma 等^[32]利用 HCM 的致病基因 MYBPC3 第 16 外显子缺失的人类受精卵,基于 CRISPR/Cas9 技术引入单链寡核苷酸,获得了该基因的野生型纯合子,证实此技术能够提高胚胎质量,为遗传性心血管病治疗提供了一种高效、准确的新方法。然而,多数心脏病的致病机制复杂,且在生殖细胞系或胚胎细胞基因组中进行基因编辑^[5]面临较大的伦理争议,基因编辑技术在遗传性疾病修正中的应用仍面临挑战。

5.2 出生后基因编辑治疗遗传性心肌疾病

尽管胚胎基因编辑能够修正部分遗传性心血管病,但包括 HCM 和 DCM 在内的多种遗传性疾病发病晚、预后差,因此,针对出生后体细胞的基因编辑在遗传性心肌疾病的研究中仍具必要性。然而,体内基因

编辑尚存在脱靶效应、镶嵌型编辑、伦理争议等问题有待解决。

6 总结与展望

以 CRISPR/Cas9 技术为代表的基因编辑技术能够高效实现目标基因片段的稳定改造,在细胞和动物水平进行多种遗传性心肌疾病的模型构建和机制研究,能够在细胞和动物水平有效改善疾病表型。可以预见,基因编辑技术未来将对心血管病的预防和诊治工作带来革命性改变。但心血管病的基因治疗目前尚存在脱靶效应明显、编辑效率低等问题,尚有大量基础研究亟待完善。

参考文献

- [1] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [2] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258-1266.
- [3] Chadwick AC, Musunuru K. Genome editing for the study of cardiovascular diseases [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2017, 19(3): 22.
- [4] Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering [J]. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869.
- [5] Ohiri JC, McNally EM. Gene editing and gene-based therapeutics for cardiomyopathies [J]. *Heart Fail Clin*, 2018, 14(2): 179-188.
- [6] Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(6): 577-582.
- [7] Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88.
- [8] Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects [J]. *Nature*, 2016, 529(7587): 490-495.
- [9] Chen JS, Dagdas YS, Kleinstiver BP, et al. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy [J]. *Nature*, 2017, 550(7676): 407-410.
- [10] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [11] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A · T to G · C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [12] Sabater-Molina M, Pérez-Sánchez I, Hernández Del Rincón JP, et al. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: a review of current state [J]. *Clin Genet*, 2018, 93(1): 3-14.
- [13] Ware JS, Cook SA. Role of titin in cardiomyopathy: from DNA variants to patient stratification [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(4): 241-252.
- [14] Arbustini E, Favalli V, Narula N, et al. Left ventricular noncompaction: a distinct genetic cardiomyopathy? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(9): 949-966.
- [15] Haggerty CM, James CA, Calkins H, et al. Electronic health record phenotype in subjects with genetic variants associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a study of 30,716 subjects with exome sequencing [J]. *Genet Med*, 2017, 19(11): 1245-1252.
- [16] Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation [J]. *Nature*, 1998, 392(6673): 293-296.
- [17] Arbelo E, Sarquella-Brugada G, Brugada J. Gene-specific therapy for congenital long QT syndrome: are we there yet? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(9): 1059-1061.
- [18] Baruteau AE, Kyndt F, Behr ER, et al. SCN5A mutations in 442 neonates and children: genotype-phenotype correlation and identification of higher-risk subgroups [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(31): 2879-2887.
- [19] Lan F, Lee AS, Liang P, et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(1): 101-113.
- [20] Kodo K, Ong SG, Jahanbani F, et al. iPSC-derived cardiomyocytes reveal abnormal TGF- β signalling in left ventricular non-compaction cardiomyopathy [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(10): 1031-1042.
- [21] Liang P, Sallam K, Wu H, et al. Patient-specific and genome-edited induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes elucidate single-cell phenotype of Brugada syndrome [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(19): 2086-2096.
- [22] Limpitkul WB, Dick IE, Tester DJ, et al. A precision medicine approach to the rescue of function on malignant calmodulinopathic long-QT syndrome [J]. *Circ Res*, 2017, 120(1): 39-48.
- [23] Mosqueira D, Mannhardt I, Bhagwan JR, et al. CRISPR/Cas9 editing in human pluripotent stem cell-cardiomyocytes highlights arrhythmias, hypocontractility, and energy depletion as potential therapeutic targets for hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(43): 3879-3892.
- [24] Chang CW, Chang CC, Hsia KC, et al. Generation of FHL2 homozygous knockout lines from human embryonic stem cells by CRISPR/Cas9-mediated ablation [J]. *Stem Cell Res*, 2018, 27: 21-24.
- [25] Ceholski DK, Turnbull IC, Kong CW, et al. Functional and transcriptomic insights into pathogenesis of R9C phospholamban mutation using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 119: 147-154.
- [26] Ma N, Zhang JZ, Itzhaki I, et al. Determining the pathogenicity of a genomic variant of uncertain significance using CRISPR/Cas9 and human-induced pluripotent stem cells [J]. *Circulation*, 2018, 138(23): 2666-2681.
- [27] Chavali NV, Kryshtal DO, Parikh SS, et al. The patient-independent human iPSC model: a new tool for rapid determination of genetic variant pathogenicity in long QT syndrome [J]. *Heart Rhythm*, 2019, 16(11): 1686-1695.
- [28] Amoasii L, Long C, Li H, et al. Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(418): pii. eaan8081.
- [29] Carroll KJ, Makarewicz CA, McAnally J, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(2): 338-343.
- [30] Johansen AK, Molenaar B, Versteeg D, et al. Postnatal cardiac gene editing using CRISPR/Cas9 with AAV9-mediated delivery of short guide RNAs results in mosaic gene disruption [J]. *Circ Res*, 2017, 121(10): 1168-1181.
- [31] Liang P, Xu Y, Zhang X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363-372.
- [32] Ma H, Marti-Gutierrez N, Park SW, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 413-419.

收稿日期:2019-04-24