

CRISPR-Cas9 应用于病毒性传染病防控的研究进展*

李 根¹⁾ 刘军花¹⁾ 赫丽杰²⁾ 尹秀山^{1,3)**}

(¹⁾ 沈阳化工大学制药与生物工程学院, 沈阳 110142; (²⁾ 辽宁省人民医院, 沈阳 110016;

(³⁾ Karolinska Institutet (MTC), Science for Life Laboratory, Tomtebodavägen 23A (Gamma5), 17165 Solna, Sweden)

摘要 病毒性传染病是威胁人类健康的重要因素, 迫切需要新的治疗方法来降低由急性病毒感染如鼻病毒和登革热病毒以及慢性病毒感染如人类免疫缺陷病毒 1 和乙型肝炎病毒引起的发病率和死亡率。随着分子生物学技术的发展, 靶向序列特异性的基因编辑技术成为传染病治疗的有力工具。其中规律成簇间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)-CRISPR 相关蛋白 9(CRISPR associated protein 9, Cas9)凭借其高效、简便、高特异性等特点被广泛应用于细胞系和动物模型中的传染病治疗, 从而成为有前景的新型传染病治疗模式。目前, 利用病毒和非病毒载体将 Cas9 以 DNA、mRNA 或蛋白质的形式递送到细胞中的可行性研究和评估 CRISPR-Cas9 体内适用性的临床试验已经在进行中。本篇综述中, 我们将对 CRISPR-Cas9 的原理, 其应用于传染病治疗的最新研究进展以及该技术面临的挑战和可预测性的解决方法等加以概述, 并进一步展望其未来的发展方向。

关键词 病毒性传染病, 基因编辑技术, CRISPR-Cas9, 病毒载体, 临床试验

学科分类号 Q81, R51

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0032

尽管经过数十年的深入研究, 由细菌、病毒和寄生虫引起的传染病仍然是导致人类发病和死亡的主要因素^[1]。病毒性传染病的治疗更具有挑战性, 因为病毒不具有自身的代谢网络并且依靠宿主来进行复制, 它们会特异性地攻击宿主细胞来引发疾病。对于单次感染性传染病, 可以使用小分子抗病毒药物、蛋白酶抑制剂药物及预防性疫苗等进行预防和治疗, 但是针对持续和反复的病毒感染的有效治疗仍然是一个难题^[2-4], 迫切需要我们开发一种新的抗病毒策略。基因编辑工具如锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)通过去除或校正有害突变或插入保护性突变来实现在病变细胞和组织中进行治疗性基因编辑的目的^[5-6]。然而这两种方法的载体构建所需成本较高而且费时, 这限制了它们在大规模和高通量研究中的应用。

最近, 一种在细菌和古生菌中发挥适应性免疫反应来抵抗外来遗传物质的系统——CRISPR-Cas9 成为关注的热点, CRISPR 的应用促进了与疾病发展相关的易感性基因和非编码调控元件功能的精确鉴定和定义^[7]。CRISPR-Cas9 可通过敲除靶基因继而引发易错的非同源末端连接(NHEJ)的方式在目

标位点产生功能缺失突变^[8], 也可添加同源 DNA 模板通过同源重组修复(HDR)在目的位点引入确定的序列^[9]。近年来, 利用 CRISPR-Cas9 介导的基因编辑被报道用来在动物体内敲除特定基因来构建疾病模型^[10-14], 引入报告基因, 在成体组织中引入定点突变以及建立大生物反应器^[15-18]。单链寡脱氧核苷酸(ssODN)模板供体较双链模板供体具有更高的靶向性, 无需构建同源臂, 并且可完整表达标记基因, 插入效率更高, 最近被广泛应用于动物体的基因改造^[19-20]。CRISPR-Cas9 使得动物疾病模型的建立比传统方法更快、更便宜, 同时通过在一个物种上快速累积基因突变使得利用基因驱动来消除媒介传播的疾病, 例如疟疾等成为可能^[21-22]。将 CRISPR-Cas9 系统应用于微生物病原体的基因改造可以更系统地进行功能基因组分析并剖析宿主和微

* 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2014CBA02002, 2014CBA02005)。

** 通讯联系人。

Tel: 024-89383906, E-mail: xiushanyin@me.com

收稿日期: 2018-05-06, 接受日期: 2018-07-13

生物病原体的相互作用^[23]. 相比于其他基因编辑方法, CRISPR-Cas9 在微生物基因改造方面更加通用, 可以进行高通量、重复编辑. 此外, 灵活的 CRISPR-Cas9 系统递送进入微生物细胞的方法, 如使用质粒、细菌接合物、噬菌体或核糖核蛋白颗粒促进了这种技术在多种微生物中的应用^[24-26].

CRISPR-Cas9 可以通过核酸酶介导的基因敲除和转录调节方法来对整个基因组进行功能筛选^[27-29]. 研究者们通过基于 CRISPR-Cas9 的全基因组筛选来发现毒力因子的宿主靶点, 感染和致死的必需基因, 研究病毒-宿主间的相互作用, 鉴别病毒蛋白质的加工通路等^[30-38]. CRISPR-Cas9 不仅可以通过直接靶向病毒基因组和宿主相关基因, 还可以通过敲除疫苗细胞株的宿主基因来提高抗病毒疫苗的生产和促进新型抗菌剂的开发^[39-40]. CRISPR-Cas9 技术还被应用于调控靶基因的转录水平, 这种保持基因组完整性的方法适用于调控抗病毒因子的表达和筛选病毒感染的必需基因^[41]. 这些优势赋予 CRISPR-Cas9 在治疗有挑战性的传染病方面的巨大潜力和优势. 已有研究表明 CRISPR-Cas9 在体外细胞水平和体内可以有效地抑制多种人类病毒如艾滋病毒、乙肝病毒、疱疹病毒、人乳头瘤病毒等的复制、转录和传播. 与此同时, 该技术面临的挑战和临床适用性等问题同样应该被重视.

1 CRISPR-Cas9 系统的原理

CRISPR-Cas 系统根据 Cas 核酸酶的差异主要分为 I 型系统(如 Cas3)、II 型系统(如 Cas9)以及 III 型系统(如 Cas10)^[42]. II 型的 CRISPR-Cas9 仅仅包括 CRISPR 重复-间隔序列和 3~4 个 Cas 基因. 鉴于其简易性, II 型是所有用于基因工程开发的 CRISPR-Cas 系统的最佳候选者^[43]. CRISPR-Cas9 系统介导的适应性免疫反应由三个部分组成: 外源 DNA 序列(也被称为原间隔序列)的获取、CRISPR RNA(crRNA)的合成以及成熟的 crRNA 与 Cas9 蛋白组装而介导的外源 DNA 的切割(图 1)^[44].

CRISPR 基因座由富含 A-T 的前导序列, 随后连接的大约 30 个碱基对间隔区段的重复序列元件组成. 原间隔序列的获取很大程度上取决于重组酶 RecBCD 介导的主要在复制叉上发生的双链 DNA 断裂的加工^[45]. 新的间隔序列立即从最先进入细胞的病毒游离 DNA 末端即 cos 位点来获取. 并且 Modell 等^[46]也发现从早期注射的基因组区域获得的间隔区比晚期注射区获得的间隔区提供更好的免疫

力. Cas9 也会影响着病毒序列获取的效率, Heler 等^[47]发现 Cas9 的 I473F 突变会将效率提高两个数量级以上. CRISPR 系统通过发现病毒颗粒的原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif sequence, PAM)来选取合适的序列, 随后高度保守的 Cas1-Cas2 复合物将带有 3'-羟基末端的原间隔序列(protospacer)整合入最靠近前导序列的重复序列中^[48-49]. Cas1-Cas2 整合酶的 DNA 结合特异性促使它们聚集在 CRISPR 序列, 这避免了将病毒 DNA 片段插入到错误的位点而产生潜在的致命影响^[50]. 加州大学的研究人员第一次从结构上揭示了 Cas1-Cas2 整合酶发现靶 DNA 机制: 这些短回文重复序列的核苷酸序列允许它们仅以正确的方式弯曲, 从而允许 Cas1-Cas2 根据形状特异性地识别它们的靶标^[51]. 此外, 结合 DNA 末端的 Csn2 蛋白招募 DNA 修复蛋白保护双链 DNA 末端免于核酸外切酶的降解来协助原间隔序列的整合^[52]. CRISPR 基因座转录形成非编码的前体 crRNA(pre-crRNA)和反式激活 crRNA(tracrRNA)、tracrRNA 与 pre-crRNA 的正向重复序列形成碱基配对的杂交双链体, 随后和 Cas9 结合. Cas9 是原始 crRNA 加工所必需的, 其用于结合和定位 RNA 分子以被 RNA 酶 III 切割^[53]. 内源性 RNase III 酶将 pre-crRNA 加工成含有单个截短的间隔序列的成熟 crRNA. 5' 末端 crRNA 的间隔序列被核酸酶修剪成 20 个核苷酸的长度^[54]. 最后, 成熟的复合物通过 crRNA 间隔区和原间隔序列间形成异源双链将 Cas9 以逐步的方式引导至由原间隔序列和必需的 PAM 组成的目标 DNA 附近^[55]. 然后由 Cas9 介导 PAM 的上游目标 DNA 的特定位点切割产生双链断裂(double-stranded breaks, DSBs), 继而启动细胞 DNA 修复机制(NHEJ 或 HDR 通路)^[56]. Cas9 的内切核酸酶活性由核酸酶的 2 个活性位点(HNH 区域切割与 crRNA 碱基互补的 DNA 链, 而 RuvC 区域则催化 DNA 的置换链)催化^[57]. 从结构角度上看, 目标 DNA 的识别驱动了 HNH 结构域构象变化, 这种构象变化激活了 RuvC 结构域的催化活性来确保两条 DNA 链的协同切割^[58]. 随后, Doudna 团队^[59]发现了控制 HNH 结构域的构象以调节总体催化能力的非催化结构域, REC3. REC3 中参与 RNA-DNA 异源双链体识别的氨基酸的突变使得错配情况下的 HNH 结构域构象检查更加严格, 减少脱靶效应的发生, 从而促进研究人员发现一些高精度的 Cas9^[59].

Jinek 等^[60]设计的替代 crRNA-tracrRNA 复合体的单链引导 RNA (sgRNA) 可以程序性控制 Cas9 核酸内切酶家族切割特定的 DNA 位点。由于其类似发夹结构的 gRNA 简单设计和易于克隆的优势, 使得 CRISPR-Cas9 系统得以快速推广应用。通过优化关键的 3' 端发夹结构大大提高了 gRNA 的编辑效率, 该系统在单个载体中编码多个 gRNA 序列从而达到编辑多个基因位点的能力也被证实^[61-62]。Cas9 在只有 17 或 18 个核苷酸互补的截短型 gRNA 展示出比 20 个核苷酸互补的全长 gRNA 更优良的切割特异性, 并且更适合与成对的 Cas9 切

口酶合用^[63]。sgRNA 文库最近被用于基因和调控元件的高通量功能筛选, 对 gRNA 骨架进行修饰和 gRNA 靶向预测算法的开发可以用于提高 gRNA 文库的筛选性能^[27, 64-65]。sgRNA 设计算法正在迅速改善, Cas9 的脱靶效应已经远远低于 RNA 干扰所观察到的脱靶效应^[66-67]。尽管如此, sgRNA 文库靶向大量基因产生的脱靶效应仍然是假阳性结果的主要来源。为了克服这个障碍, 针对每个基因 sgRNA 文库一般设计 4~10 个不同的 sgRNA^[68-70]。多个 sgRNA 产生相同的表型使得假阳性大大降低, 这种方法能够准确发现高置信度的目标基因。

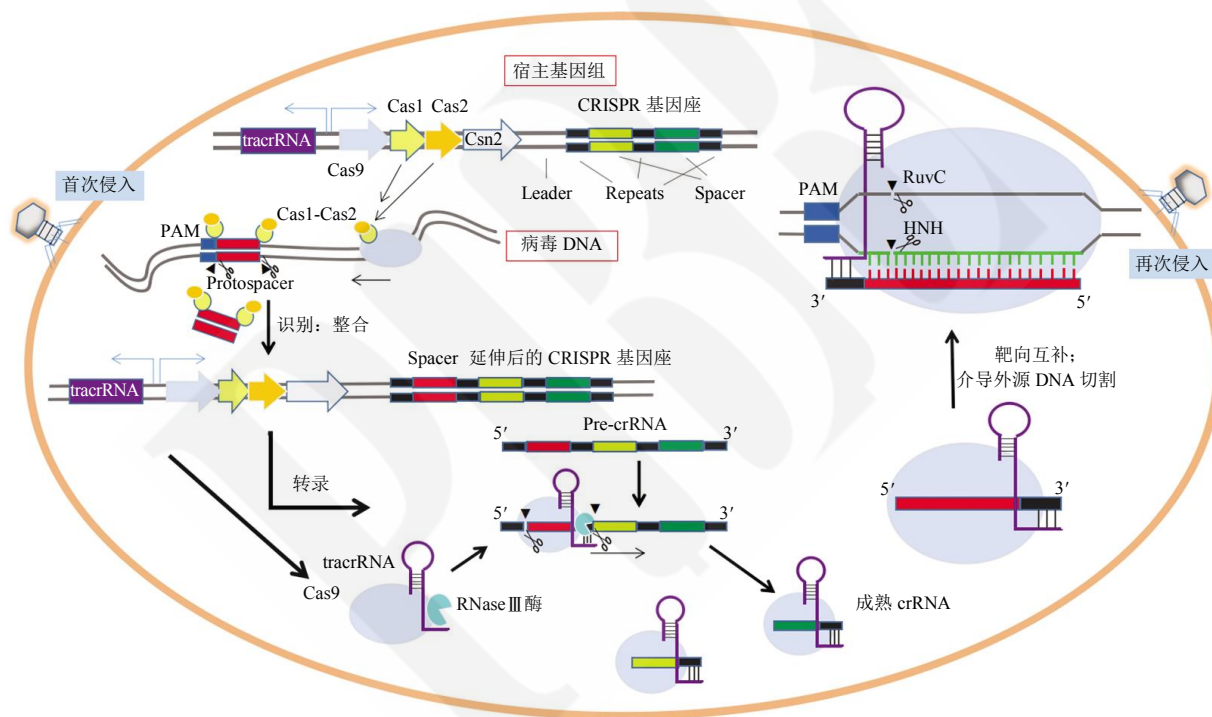


Fig. 1 A schematic overview of the CRISPR-Cas9 system

图 1 CRISPR-Cas9 系统的示意图

编码 Cas9、Cas1、Cas2 和 Csn2 蛋白的 Cas 基因簇构成了 Cas 基因簇。编码 tracrRNA 的基因位于 Cas 基因簇的上游而 CRISPR 序列 (CRISPR array) 则位于下游。Cas1 和 Cas2 蛋白参与原间隔序列 (protospacer) 的识别, 加工和整合入 CRISPR 序列的过程。CRISPR 序列的转录产生前 crRNA (pre-crRNA), 随后在 Cas9 蛋白的稳定作用下 tracrRNA 结合前 crRNA 的重复序列区域。RNase III 开始富集并切割 CRISPR 重复序列区域形成了成熟的抗病毒复合体。当 PAM 序列被发现并且目的序列和 crRNA 序列形成完全的互补结合, 进而 Cas9 内切核酸酶诱导双链 DNA 的断裂, 由此沉默入侵的外源 DNA。

2 CRISPR-Cas9 用于病毒性传染病防控的最新进展

2.1 艾滋病

艾滋病 (AIDS) 仍然是对人类健康构成主要威胁

的流行性疾病。过去 30 年来医生都在使用抗逆转录病毒疗法治疗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 携带者, 但是这种治疗只能防止疾病发展成为 AIDS, 却不能完全治愈病人。最新的研究表明, HIV 促使抗病毒的干扰素信号通路降解, 而没有了这些抗病毒

分子, 免疫系统也就无法清除病毒感染^[71]。

艾滋病的最终治疗方法是去除和破坏潜伏感染细胞中整合的 HIV 原病毒或完全消除这些潜伏细胞^[72]。基因编辑技术的突破展现了消灭 HIV 的潜力, 因为可以通过 CRISPR-Cas9 在宿主细胞基因组中有效地操纵前病毒。研究者们集中于应用 CRISPR-Cas9 来删除或破坏 HIV 受体在人类细胞上的表达。2013 年 Ebina 等^[73]首次尝试应用 CRISPR-Cas9 切割并突变 HIV 中促进 HIV 表达的 LTR 启动子位点以破坏和消除人类细胞中的原病毒。其他研究人员亦报道了类似的研究, 其中 CRISPR-Cas9 靶向病毒 LTR 或重要病毒基因可以显著抑制 CD4⁺ T 细胞衍生的细胞系中 HIV-1 产生和感染^[74-76]。HIV 治疗的一个新突破是, Liao 等^[77]使用多重靶向 HIV-1 基因组的方法来抑制人类细胞中的 HIV 复制, 它比使用单个 gRNA 更有效, 这种方法消除了 T 细胞衍生系长期培养中的病毒复制并可解决单个 gRNA 长期使用导致的 CRISPR 耐受突变的问题^[78-79]。Wang 等^[80]发现 HIV 复制被 CRISPR-Cas9 抑制不久, 由宿主细胞的 NHEJ 修复机制产生的 HIV 突变体部分显示出对 CRISPR-Cas9 的抗性。这可能是由一些对病毒复制无害的片段插入所造成的, 靶 DNA 序列改变后不能被相同的 gRNA 识别, 导致了病毒的逃逸现象^[80-81]。病毒的逃逸可以通过靶向病毒基因组中的重要片段或者同时指引多个 gRNA 作用于原病毒来控制^[82], 同时 CRISPR-Cas9 技术在根除 AIDs 的应用中进行认真的设计和谨慎评估也是十分必要的。该方法的缺点在于 HIV 原病毒的多重靶向将导致多区域大片的缺失或插入。随后 Lei 等^[83]发现使用 DNA 双链作为模板或暂时抑制内源性 APOBEC3, 可抑制 Cas9 切割后引起的有害突变。CRISPR-Cas9 直接靶向 HIV 前病毒的基因组可能是未来失活甚至清除感染的个体中潜伏 HIV 的治疗选择。

许多研究人员还将重点放在应用 CRISPR-Cas9 技术来破坏 HIV 受体在人类细胞上的表达。由于 CD4 是人类 T 细胞中维持正常的细胞功能必不可少的重要受体, 因此 CXCR4 和 CCR5 的 HIV 二级受体往往是 CRISPR-Cas9 技术用于靶向的候选者^[84]。如 Hu 等^[85]利用 CRISPR-Cas9 在人类原代 CD4⁺ T 细胞中有效地破坏了 CXCR4 基因, 改造后的 T 细胞显示出对 HIV 感染的抵抗力, 并且 HIV 感染早期病毒蛋白 p24 的表达降低 60%。如果用特定的替代序列进行校正 T 细胞基因, 而不是删

除, 则能提高用于临床治疗的机会。Schumann 等^[86]利用 Cas9 核糖核蛋白与同源修复模板以高达约 20% 的效率替换了原代人类 T 细胞的 CXCR4 和 PD-1 的核苷酸, 同时 Cas9 核糖核蛋白比其他使得细胞长时间暴露于 Cas9 的传递模式更为安全。CCR5 首次引起艾滋病研究人员的注意是在 2007 年, 一位名叫 Timothy Brown 的 HIV 阳性患者通过骨髓移植而被治愈。后来科学家发现他的骨髓供者含有 CCR5 突变, 使他的细胞对 HIV 感染产生了抵抗力。2009 年, Hütter 等^[87]将带有 CCR5 Δ 32 纯合子供体的造血干细胞移植到一名患者体内, 移植后 20 个月患者没有病毒反弹并停止抗逆转录病毒治疗。这一发现促进更多研究者开发基于移植的干细胞或 T 细胞疗法用于治疗 HIV 感染。Ye 等^[88]利用 CRISPR-Cas9 在诱导多能干细胞(iPSCs)引入 CCR5 Δ 32 突变, 随后分化而成的单核和巨噬细胞表现出对 HIV 的抗性。这种方法比 TALENs 更有效, 单个等位基因的同源重组效率接近 100%。随后, 几个研究小组报道了靶向 CCR5 的 CRISPR-Cas9 用于保护造血祖细胞, CD4⁺ T 细胞系和原代 CD4⁺ T 细胞免受 HIV 感染^[89-93]。同时靶向两种 HIV 共同受体以产生病毒抗性的可移植细胞有望用于临床治疗 HIV 感染。

开发利用 CRISPRa 诱导 HIV-1 的重新活化继而通过宿主的细胞病变或免疫监视机制来消灭病毒是一种新兴的方法^[94-95]。CRISPRa 通过融合催化失活的 dCas9 蛋白和转录激活因子结构域来特异性地激活潜伏 HIV 病毒的复制和转录, 并且无遗传毒性^[96-98]。dCas9-VPR、协同激活调节物(SAM)和 dCas9-Suntag 转录激活系统通过 sgRNA 证明了它们在体外功能遗传学研究中是有效的, 但是由于体内 Cas9 融合蛋白转染效率偏低且编码 dCas9/gRNA 与共转录激活物复合物的序列超出了最常见的病毒载体的容积, 它们被应用于体内研究仍然是个挑战。Liao 等^[99]利用基因改造带有两个用来招募 MPH 转录激活复合体的 dgRNA 系统, 在小鼠体内高水平地激活由于衰老或机体损伤而沉默的内源性基因的表达来恢复小鼠正常的生理功能。这种新型的基于表观遗传重塑的系统在体内激活潜伏 HIV 的研究和是否会引起宿主的免疫应答仍然有待于验证。此外, CRISPRa 可以上调抗病毒限制因子来增强人类细胞内源性抗病毒防御。Bogerd 等^[100]使用这种方法在人类 CD4⁺ T 细胞上调了抗病毒效应物 APOBEC3B (A3B) 和 APOBEC3G (A3G), 诱导

激活的 A3B 和 A3G 表现出抑制野生型 HIV-1 感染性。SAMHD1、TETHERIN、TRIM5 α 等最近发现的抵抗 HIV 的关键蛋白质在体内的特异性激活将成为抑制 HIV 病毒入侵的重要策略^[101-103]。Park 等^[104]使用 CRISPR-Cas9 全基因组筛选发现 CD166 抗原(ALCAM)、蛋白酪氨酸激酶转移酶 2(TPST2) 和腺苷 3'-磷酸 5'-磷酸硫酸转运蛋白 1(SLC35B2) 对 HIV 病毒复制十分关键, 并且这些基因的敲除并不影响细胞活力。随后, 这些新发现的宿主依赖性因子在生理相关的原代 CD4⁺ T 细胞中被证明在介导 HIV 感染方面的重要性。总之, CRISPR-Cas9 技术在根除 HIV 方面展现很大的潜力, 未来 CRISPR-Cas9 技术用于艾滋病治疗的研究将以安全性、效率和特异性为重点。FDA 已经批准在几项临床试验中使用 CRISPR-Cas9 技术, 我们相信在不久之后 CRISPR-Cas9 能够登上临床治疗和预防 HIV 的舞台。

2.2 乙肝病毒

目前世界上约有 2.4 亿乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的慢性携带者。HBV 慢性感染增加致死性并发症(包括肝硬化和肝细胞癌)的风险, 每年导致约 60 万人死亡^[105]。HBV 病毒体含有部分双链 DNA 基因组, 其在感染后不久在核内转化为双链共价闭合环状(ccc)DNA。在 HBV 复制期间持续存在的稳定的 cccDNA 是病毒 RNA 转录的基因组模板, 包括病毒蛋白的前基因组 RNA(pgRNA) 和信使 RNA(mRNA), 因此消除或永久灭活 cccDNA 对于根除慢性 HBV 感染至关重要^[106-107]。针对 HBV 的批准疗法如基于干扰素 α (IFN- α) 的免疫调节剂和逆转录酶(RT)抑制剂带有严重的副作用并且很快由于病毒抗性的出现而变得无效^[108]。包含 HBV 表面抗原的疫苗已被纳入许多国家的免疫治疗规划中。疫苗可以有效预防 HBV 感染, 但对现有 HBV 携带者却没有治疗作用^[109]。

基因组编辑技术是特异性破坏 HBV 基因组的有效方法, 其中 CRISPR-Cas9 因其设计 gRNA 的简便和灵活并适用于靶向任何目标基因使得消灭 cccDNA 成为可能。Lin 等^[110]第一次使用 CRISPR-Cas9 来限制 HBV 的感染, 他们分别将 HBV 表达载体转染入人肝癌细胞和 HBV 持久型的小鼠模型, 发现在体外和体内实验中 HBV 基因组模板都可以被有效地破坏。随后的一些研究通过使用 HBV- 表达质粒共转染模型、HBV 感染的细胞系、HBV- 表达质粒的水动力注射(HDI)模型或

HBV- 转基因(HBV-Tg)小鼠模型, 证明了 CRISPR-Cas9 在体内外可以有效地破坏 HBV 基因组, 甚至是 cccDNA^[111-123]。具有多个 gRNA 的 CRISPR-Cas9 系统可以同时切割 HBV 基因组的多个位点, 从而提高 HBV 基因组失活的效率^[110, 116-117, 120]。几项研究还表明 CRISPR-Cas9 系统可以破坏或灭活 HBV 的 cccDNAs 和整合的 HBV 基因组^[111-114, 116, 119, 123]。随后, Seeger 等^[124]利用二代测序确定了 Cas9 切割和经过非同源末端连接(NHEJ)修复的 cccDNA 中完整的突变谱。结果表明 CRISPR-Cas9 系统是迄今为止功能性地灭活 HBV cccDNA 的最佳方法, 并为慢性乙型肝炎的治疗提供更好的策略。

目前针对 HBV 的脱靶效应来说, 只有少数报道, 通过基因组编辑检测实验或潜在脱靶位点的测序来检查 HBV 特异性 gRNA 的脱靶效应^[116, 120, 123]。二代测序比基因组切割检测试验对脱靶效应更敏感。有研究表明, 利用 Cas9 切口酶可以提高对 HBV 基因组编辑的特异性, 并且有较高的针对 HBV 的抑制效率^[114, 120]。具有更短的原型间隔子互补区的截短型 gRNA 和高保真度的 Cas9 内切核酸酶都有待于研究降低抗 HBV 治疗的脱靶效应。尽管如此, 开发一个 CRISPR-Cas9 脱靶效应长期风险评估的平台还是非常必要的。

最近, Wang 等^[125]将 CRISPR-Cas9 与 RNAi 结合起来, 发现其可以在体外和体内发挥协同作用来抑制 HBV 复制。更重要的是, 这种鸡尾酒疗法显示出对 cccDNA 强效的破坏作用^[125]。gRNA-miRNA-gRNA 三元盒具有广泛用于基因组编辑的研究和治疗应用的潜力, 尤其是抗病毒治疗。来自化脓链球菌(Sp)的 Cas9 蛋白较大, 这使得利用 AAV 载体将 CRISPR-Cas9 系统有效递送至肝或肝细胞仍然是个难题。Liu 等^[126]通过使用更小的葡萄球菌(sa)的 Cas9 很好地解决了这个困扰, 这个系统也许会代替传统的 SpCas9 成为对抗慢性 HBV 感染的新型治疗手段。已有研究者通过检索 HBV 序列数据库以找到 HBV 基因组的保守区域, 靶向 HBV 基因组保守区的 CRISPR-Cas9 系统也许会对不同基因型的 HBV 具有更广泛的抗病毒活性^[127]。总之, CRISPR-Cas9 系统能够特异且有效地破坏 HBV 基因组并且没有明显的细胞毒性。遗憾的是这些人造模型并不能完全模拟类似于 cccDNA 大量存在于肝细胞中的持续性 HBV 感染。这些研究通过使用 cccDNA 特异性引物进行 PCR 来定量 cccDNA。但已有研究表明, 这种基于 PCR 的

cccDNA 测定也许并不能准确地测量 cccDNA 水平^[128]。因此, 开发具有可定量 cccDNA 的体外检测系统对于监测 CRISPR-Cas9 的抗 HBV 功效是十分重要的。并且, CRISPR-Cas9 在清除慢性 HBV 感染 cccDNA 的作用还需要在临床上进行证实。

2.3 疱疹病毒

疱疹病毒是一类具有包膜的双链 DNA 病毒, 一旦进入细胞核, 病毒 DNA 会被环化并保持为游离基因^[129]。它们可以感染宿主并建立终身潜伏感染。在潜伏期中, 病毒蛋白质的表达受到抑制, 从而逃避宿主免疫系统的检测^[130]。世界卫生组织预估超过 90% 的成年人至少感染 8 种疱疹病毒中的一种, 目前对疱疹病毒感染的治疗主要是通过使用阻断病毒复制的核苷类似物^[131]。但是这些药物在感染的潜伏期无法发挥作用^[132]。另外, 疱疹病毒可能对常用的核苷类似物产生抗性, 例如阿昔洛韦和更昔洛韦^[133]。开发可替代的策略来提供对抗疱疹病毒感染的保护或清除感染的宿主细胞中的潜伏病毒变得迫在眉睫。

最近已有很多研究报道了 CRISPR-Cas9 基因编辑系统在体外细胞培养中抗疱疹病毒的应用, 包括单纯疱疹病毒 1 和 2 (herpes simplex virus, HSV-1/2)、巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 和 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV)^[134-159]。HSV-1 经常感染口腔黏膜上皮, 而 HSV-2 经常感染生殖器黏膜。随后, HSV-1 病毒进入感觉神经元的轴突并通过逆行转运迁移到以三叉神经节 (TG) 为主的细胞, 而 HSV-2 则是迁移到骶骨背侧神经节的细胞体中, 从此建立了一种潜伏性终身感染^[134]。2014 年 Bi 等^[135]首次利用 CRISPR-Cas9 系统在野生型 HSV-1 病毒引入位点特异性突变和外源基因, 原病毒的复制过程被特异性抑制, 子代病毒中重组病毒的丰度也显著增加。体外构建 HSV 基因组模型通常依赖于低效率的自发性同源重组和费时费力的细菌人工染色体技术^[136-137]。研究证实了使用 CRISPR-Cas9 系统制造突变型 HSV-1 病毒的潜力, 它比传统方法更容易地对用于病毒载体和裂解肿瘤细胞等治疗应用的病毒进行工程化改造^[138-140]。最近的两项研究展示了抗 HSV-1 gRNA 在抑制人类细胞系中病毒复制的效力^[141-142]。在人类上皮和成纤维细胞中引入靶向必要 HSV-1 基因的 CRISPR-Cas9 系统可以有效地抑制 HSV-1 复制。然而, 由于 CRISPR-Cas9 诱导的靶位点的突变使得细胞经长时间孵育后出现逃避 Cas9 靶向的逃逸突变体。

Van Diemen 等^[141]随后通过共同递送两种 gRNA 来同时靶向两种重要的病毒基因 UL29 和 UL8。Roehm 等^[142]同样使用这种方法同时靶向病毒关键基因 ICP0 和 ICP4, 在两种情况下观察到病毒的感染几乎被完全抑制。由于 HSV 与潜伏感染的神经节中的病毒载量成比例的速率重新激活, 即使潜伏基因组不完全失活也可以显著降低疾病严重程度和病毒脱落, 甚至导致功能性治愈^[143]。然而, Van Diemen^[141]的实验结果显示, CRISPR-Cas9 系统并不能靶向 MRC5 细胞中的潜伏 HSV-1 基因组, 这可能与 HSV-1 基因组在核小体存在下呈严重抑制状态有关^[144]。这种观点同样由 Horlbeck^[146]和 Chen^[145]的团队加以证实, Horlbeck 团队还发现在体外添加染色质重塑酶可以使 Cas9 重新恢复活性。因此, 使用 CRISPR-Cas9 来靶向潜伏的 HSV 基因组将成为突变或清除潜伏细胞中病毒有前景的策略。当然需要更多的研究去评估是否 Cas9 可以有效切割核小体比率偏低的 HSV 基因组和染色质重构后的基因组位点, 从而有利于治疗角膜或生殖器疱疹的复发性感染。HSV 衣壳蛋白不仅保护病毒基因组免受损害, 而且在病毒基因组释放到宿主细胞核中发挥重要作用^[147]。最近, 中国科学院生物物理研究所和加州大学的研究者们解析出疱疹病毒 HSV-1/HSV-2 衣壳蛋白三维结构, 提出衣壳蛋白组装和稳定性的机理, 这将为基于 CRISPR-Cas9 的 HSV 基因治疗提供新的思路和方法^[148-149]。

HCMV 可以在多种类型的细胞进行复制, 包括上皮细胞、内皮细胞、骨髓细胞、神经元细胞和成纤维细胞。HCMV 感染是先天性疾病的最常见病, 并且该病毒在免疫系统受损的宿主如移植受体中伺机产生感染^[141, 150-151]。Bierle 等^[151]通过瞬时转染将单个病毒特异性 gRNA 靶向豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 基因组的 GP133 位点, 发现 CRISPR-Cas9 可以在预测的 Cas9 切割位点处产生短的插入或缺失突变。此外, 两种 gRNA 的共转染可以产生大片的基因敲除, 并且可以使用同源重组修复在病毒基因组中引入特定的基因片段。Bierle 等的研究第一次证实 CRISPR-Cas9 技术可以有效地改造 GPCMV 基因组。Van Diemen 等^[141]发现单一抗 HCMV gRNA 可以有效地减弱 MRC5 细胞中的 HCMV 感染, 病毒复制被抑制。然而, 在长时间培养感染细胞后, 病毒的靶位点通过缺失完整的密码子 (3-6-9-12 bp 等的变化) 来保持基因的阅读框, 从而保留了目标蛋白质的部分功能性, 这导致了抗

性病毒大量出现. 和 HSV 病毒类似, 研究者使用几种 gRNA 同时靶向病毒的多个位点可以有效防止抗性病毒突变体的出现. 然而和 HSV 病毒有所差异的是, 靶向非必需基因 US6、US7 和 US11 并不影响病毒复制. 这种结果可能是由 HCMV 和 HSV 复制动力学差异引起的, HCMV 是一种缓慢复制的病毒, DNA 修复机器有足够的时间来完全修复断裂的病毒基因组. 由于 HCMV 突变体的体外复制不受非必需基因突变的影响, 所以病毒可以像野生型病毒那样有效地复制. CRISPR-Cas9 靶向 HCMV 基因组脱靶效应的评估和靶向潜伏基因组的可行性还有待于进一步研究.

EB 病毒(EBV)可以在 90% 以上的成年人中建立终生感染. EBV 主要感染 B 淋巴细胞和上皮细胞, 病毒主要在记忆 B 细胞中潜伏^[152]. 该病毒引起传染性单核细胞增多症, 并与广泛的恶性肿瘤相关, 包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和鼻咽癌^[153]. 一些研究已经证实 CRISPR-Cas9 技术可以有效编辑 EBV 基因组和干扰 EBV 复制^[141, 154-156]. Wang 等^[154]首次将 CRISPR-Cas9 系统应用于潜伏性疾病感染治疗即特异性靶向潜伏 EBV 感染的基因组. gRNA 被设计为靶向潜伏 EBV 基因组上的多个位点, 包括病毒基因 EBNA1、EBNA3C 和 LMP1. 通过结合 7 种 gRNA 并将它们转染到潜伏的淋巴瘤细胞中, EBV 病毒 DNA 在活细胞和死细胞分别减少 65% 和 85%. Van Diemen 等^[141]则靶向了 EBNA1 和 EBV 的复制起点区域的几个区域, 并发现单个 gRNA 靶向重要的 EBNA1 基因导致细胞潜伏的 EBV 损失 50%~60%, 导入靶向 EBNA1 基因上不同区域的第二个 gRNA 导致 EBV 基因组的去除率达到 95%. 因此, 多种抗 EBV gRNA 同时施用于潜伏感染的细胞将进一步增强 EBV 游离基因的不稳定性并可能有助于完全根除病毒. 在潜伏期中, 病毒不会产生病毒后代却会产生大量的非编码 RNA 例如 miRNA. 这些 miRNA 会靶向病毒基因以逃避免疫应答和调节病毒基因表达并诱导癌变, 因此靶向激活 miRNA 表达的启动子区域是对抗病毒的新策略^[157-158]. Yuen 等^[155]使用 CRISPR-Cas9 特异性地在编码病毒 miRNA 的 BART 启动子 P1 和 P2 区域中引入 558 bp 的缺失突变并通过同源重组在同样的位点引入一个选择性标记物, 在潜伏性感染 EBV 的几种人类上皮细胞系中都证实这种方法是有效的, 并且首次证明 P1 和 P2 是 BART

RNA 转录的主要启动子. Van Diemen 等^[141]在潜伏感染的胃癌细胞系中用 CRISPR-Cas9 同样靶向了病毒 miRNA 的 BART5、BART6 和 BART16, 测序结果显示 CRISPR-Cas9 具有很好的位点特异性. 通过删除其启动子来消除 miRNA 表达和活性的策略还可以被推广并用于其他生物系统中. CRISPR-Cas9 还可以应用于构建重组 EBV 病毒, 如 Kanda 等^[156]通过同源重组修复高效地将 BAC 载体序列插入到 EBV 基因组内的特定基因座, 并通过使用重构病毒感染上皮细胞来研究 EBV 介导的上皮癌发生机制. 显然, 对更多的疾病相关病毒基因组进行测序以及对这些病毒进行重构和实验测试以确定它们与非致病性病毒的行为是否不同是很重要的. 在早期的类淋巴母细胞系(LCL)研究中, CRISPR-Cas9 的基因敲除技术被用来验证 EBNA3 相关泛素特异性蛋白酶 46(USP46), 在细胞生长中和 EBV 激活的线性泛素装配复合体亚基 HOIP 在 LCL 生长和存活中的宿主依赖性^[159-160]. 最近, CRISPR-Cas9 被用于研究 CD63 在潜伏膜蛋白 1 (LMP1)外泌体包装中的作用、Ephrin 受体 A2 在 EBV 进入上皮细胞中的作用以及 IL-1 受体相关激酶 4(IRAK4)或 B 细胞淋巴瘤 6(BCL6), 在抑制裂解性复制的作用^[161-164]. 为了系统地确定对 LCL 生长和存活重要的宿主依赖因子, Ma 等^[165]进行 CRISPR-Cas9 功能缺失筛选并系统地鉴定出 57 个对 EBV 感染的淋巴母细胞和 87 个对伯基特淋巴瘤 B 细胞生长和存活至关重要的宿主依赖性因子. Ma 团队所建立的 CRISPR 和 RNA 测序的数据集为未来 EBV - 宿主相互作用和淋巴瘤发生机理的研究提供了资源, 并强调了基于 CRISPR-Cas9 的筛选在人类肿瘤病毒研究中的作用. 另外, 在原发性人源 B 细胞感染早期测试已筛选的宿主依赖因子, 如何影响 EBV 驱动转化细胞的生长和存活是个很有趣的问题.

2.4 人乳头瘤病毒

在没有免疫接种的情况下, 人们在其生命中的某个阶段会不可避免地感染乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)^[166]. HPV 是一种双链 DNA 病毒, 感染皮肤或黏膜上皮细胞、生殖器组织和上呼吸道. 将病毒 DNA 整合入宿主基因组后, HPV 可导致宫颈癌和口咽或生殖道癌症^[167-169]. HPV 相关的肿瘤发生主要归因于 HPV E6 和 E7 蛋白, 其对于恶性转化和维持宫颈癌的恶性表型是必需

的^[170-172]。根据几项流行病学和生物学研究, HPV 感染是促进宫颈癌发展的主要病因, HPV DNA 可以在 95% 以上的宫颈癌和上皮内瘤样活检中被检测到^[173-174]。由于 HPV 癌基因的表达与宫颈癌癌变之间有着密切的关系, 靶向这些癌基因新方法的开发可为宫颈癌提供新的疗法。例如 HPV 疫苗、靶向 E6 癌基因的肽适体、siRNA 和利用 HSP90 和 GRP78 抑制剂来抑制 E6 和 E7 的几种治疗策略都显示对宫颈癌细胞生长具有抑制作用^[175-178]。

最近, 高效且高特异性的 CRISPR-Cas9 技术已被开发为一种新型治疗 HPV 感染的策略并已进入临床试验阶段^[179-183]。Kennedy 等^[179]发现在培养 HPV-18 和 HPV-16 转化的细胞中, CRISPR-Cas9 可以特异性地在 E6 和 E7 基因中引入缺失和插入突变, 从而抑制 p53 或 Rb 的降解, 导致肿瘤细胞周期停滞和细胞凋亡。Zhen 等^[180]将 CRISPR-Cas9 系统转染入宫颈 HPV-16 阳性细胞系并靶向 E6/E7 启动子和 E6/E7 癌基因, 发现 p53 和 p21 的积累, 宫颈癌细胞体外增殖能力显著降低。随后的两项研究同样表明特异性靶向 HPV E6/E7 癌基因的 CRISPR-Cas9 可以有效、特异和稳定地抑制人类宫颈癌细胞的生长^[181-182]。Liu 等^[183]破坏人类角质细胞系中 HPV6 / 11 的 E7 基因并且也都获得了相似的结果, 结果表明 CRISPR-Cas9 系统具有对生殖系统辅助治疗的潜力。CRISPR-Cas9 被证实在体内同样有效的治疗和消除 HPV 诱导的癌症的工具。Zhen 等^[184]将 CRISPR-Cas9 靶向 E6/E7 后的皮下细胞接种到免疫缺陷小鼠体内建立移植的肿瘤动物模型, 发现小鼠体内肿瘤生长受到显著抑制。Zhen 团队随后发现 CRISPR-Cas9 是用于宫颈癌治疗的顺铂(CDDP)潜在的化学增敏剂。在体内研究发现, CRISPR-Cas9 和 CDDP 的鸡尾酒疗法在诱导凋亡和转移抑制方面优于单一方法治疗。因此, 靶向 E6 / E7 的 CRISPR-Cas9 与细胞毒性剂的组合可能对 P53 和 Rb 功能的恢复具有协同作用, 可能是用于治疗宫颈癌的更有效的治疗方式。此外, 验证脱靶效应和最小干扰素诱导的评估是基于 CRISPR-Cas9 的组合疗法临床应用的重要条件。

CRISPR-Cas9 不仅可以介导 E6 和 E7 的突变来抑制体内外的肿瘤生长, 还可以通过基因敲除的手段来发现治疗 HPV 感染潜在的靶点^[185-188]。Langsfeld 等^[189]使用 shRNA 敲除宫颈角质细胞的 SIRT1 基因减弱了 HPV31 基因组的保持并阻断了

细胞分化后的病毒扩增。结果证实了 SIRT1 对于 HPV 病毒生命周期的保持是必需的。Das 等^[185]使用 CRISPR-Cas9 在宫颈癌 C33a 细胞中准确敲除了 SIRT1 基因, 发现 SIRT1 的缺失影响了 HPV16 E1-E2 介导的 DNA 复制, 证明了 SIRT1 通过调控病毒蛋白的乙酰化状态来调节 C33a 细胞中 E1 和 E2 的 DNA 复制特性。SIRT1 调控 HPV 转录和复制机理的提出促进了 CRISPR-Cas9 靶向 SIRT1 来减弱 HPV 感染和相关疾病的可行性研究。最近, Leung^[186]和 Chiang 团队^[187]同样使用 CRISPR-Cas9 基因敲除技术分别发现 HPV E6 蛋白通过富集带有 CD55 受体的宫颈癌细胞来促进癌细胞的抗辐射性与侵袭性; 通过靶向 USP15 和 TRIM25 来抑制 RIG-I 介导的抗病毒的天然免疫信号。CRISPR-Cas9 介导的基因敲除揭示了 HPV E6 蛋白在宫颈癌发生过程中的关键作用, 并有望发现新的抑制 HPV E6 蛋白通路的靶点。已有研究报道整合到 HeLa 基因组中的 HPV 片段可以顺式激活位于整合位点下游 500 kb 的原癌基因 MYC 的表达^[188]。Shen 等^[190]结合染色体构象捕获和 CRISPR-Cas9 基因敲除技术第一次展示出整合的 HPV 片段与 MYC 基因和 8q24.22 区域的长距离相互作用, 整合的 HPV 片段对于这种作用的保持起主导作用。这种病毒整合对宿主细胞基因和细胞恶性转化的新调控机制未来将成为与病毒感染相关的肿瘤领域的新研究方向。最近已有研究者使用 CRISPR-Cas9 干扰 HPV 阴性的头颈部鳞状细胞癌的 NSD1 来增加化学治疗的效果, 这种技术应用在更广泛的 HPV 相关疾病如生殖器和头颈部鳞状细胞癌将是未来的研究方向^[191]。

2.5 其他病毒性传染病

人类神经多瘤病毒(JCV)是携带环状双链 DNA 基因组的无包膜病毒, 病毒基因组在细胞核内形成一个微型染色质^[192]。JCV 是一种罕见的脱髓鞘疾病: 进行性多灶性白质脑病(PML)的致病因子, 并且可能和多种人类肿瘤的发生发展有关^[193]。PML 的多种治疗方案已应用于临床, 但是大多都没有成功^[194]。两项研究报道人类细胞系中的 JCV 基因组对 CRISPR-Cas9 介导的切割十分敏感, 表明这种技术在抗 PML 方面的潜在治疗价值^[195-196]。Wollebo 团队^[195]使用 CRISPR-Cas9 靶向病毒复制必需的病毒 T 抗原的 N 端区域相对应的 DNA 序列, 通过引入突变干扰病毒蛋白的表达和功能, 并且没有出现

脱靶效应。然而在这个研究中,在引入病毒基因组之前,CRISPR-Cas9 与特定的 gRNA 已经存在于细胞中,因此可能在 DNA 复制开始之前就靶向病毒基因组。Chou 团队^[196]进一步证实在病毒感染后引入 CRISPR-Cas9 仍然可以特异性靶向 JCV 基因组的非编码区和基因开放阅读框,成功地抑制了 JCV 的复制和传播。CRISPR-Cas9 为由 JCV 病毒引起的中枢神经系统的致命性脱髓鞘疾病提供了新的治疗策略。

基于 CRISPR-Cas9 的全基因组筛选已成功鉴定出对 RNA 病毒侵入、复制和传播至关重要的宿主因子。许多病毒如脊髓灰质炎病毒或 DENV 可以裂解细胞,这使得能够在基于细胞活力的筛选中直接选择抗病毒细胞。这种选择获得不支持病毒进入、病毒基因组翻译、病毒基因组复制或病毒诱导的细胞死亡的突变细胞,但通常不包括不支持病毒体组装的突变细胞。在筛选过程中,由于要求抗性细胞在多轮感染后仍要存活,选择会非常严格。因此,这种筛选方法可以鉴定出引起明显表型变化的基因。最近,研究者利用这种筛选方法发现了登革病毒、西尼罗病毒、寨卡病毒和丙型肝炎病毒这 4 种黄病毒复制所需的内质网(endoplasmic reticulum, ER)相关蛋白质^[33-35, 196-198]。许多 ER 蛋白质参与膜和分泌蛋白的生物合成并在 N-连接糖基化,ERAD 和信号肽插入和加工中发挥重要作用。值得注意的是,这些蛋白质的鉴定结果在不同实验室以及使用不同的细胞系和不同的病毒株都具有显著的重现性。CRISPR-Cas9 筛选与单倍体遗传筛选的结果也有很大的重叠,并进一步增加 CRISPR-Cas9 筛选结果的可信度。

Orchard 和 Haga 团队^[30-31]使用 CRISPR-Cas9 全基因组筛选发现一种诺如病毒的蛋白质细胞受体,CD300lf。CD300lf 的表达赋予人类细胞对诺如病毒的易感性,而敲除了 CD300lf 的小鼠可以抵抗诺如病毒的感染。最新的研究也证实诺如病毒感染一种罕见类型的、表达 CD300lf 表面受体、被称作簇细胞的肠道上皮细胞,IL-4 和 IL-25 可以促进簇细胞的增殖进而增加小鼠体内受感染的风险^[199]。同样,CRISPR-Cas9 筛选发现了对人鼻病毒(HRV)感染起关键作用的宿主因子,细胞内黏附分子 1(ICAM1)和 Exocyst 靶向与囊泡运输途径组分

(EXOC4)。ICAM1 是已知的 HRV 受体,EXOC4 在参与 HRV 感染中的作用仍有待进一步研究^[197]。

CRISPR-Cas9 技术使我们可以更好地理解 RNA 病毒生命周期并挖掘抗病毒治疗的潜在靶点,CRISPR-Cas9 系统可以与其他技术相结合,开发出更精细的筛选方法。来自弗朗西斯氏菌属(FnCas9)的 Cas9(FnCas9)被发现能够有效靶向并切割真核细胞内的 HCV 病毒,FnCas9 可靶向 RNA 的反义和正义链并通过阻断病毒翻译和复制机制来抑制病毒的繁殖^[200]。所以,FnCas9 很可能用于靶向多种 RNA 病毒,包括存在 ssRNA 的病毒(如黄病毒、脊髓灰质炎病毒和鼻病毒)和不存在 ssRNA 的病毒(如丝状病毒、副黏病毒和正黏病毒)。

3 展 望

尽管科学家在细菌适应性免疫防御方面进行了一个多世纪的研究,Sapranas 等在 2011 年才发现并鉴定,CRISPR-Cas9 系统可以通过在不同的种属间转移来对抗入侵的核苷酸^[201]。其对推进生命科学在医疗领域的发展有着广泛而深远的影响。本文所概述的研究显示 CRISPR-Cas9 具有破坏和消除来自人细胞的病毒基因组的潜力(图 2)。CRISPR-Cas9 在对抗传染疾病方面能提供更持久更特异的效果,有望帮助我们控制和根除一些全球性传染病。CRISPR-Cas9 介导的基因编辑使细胞易受小分子抑制剂如化疗药物的影响,这种协同作用可以增强药物的治疗效果,降低用量来减轻毒副作用,还能够验证潜在的药物靶标。然而,CRISPR-Cas9 诱导的编辑可能会诱导病毒的逃逸导致产生更多致病性病毒株。研究者通过同时在多个位点靶向病毒基因组来限制这种逃逸病毒的形成,此外,在编码关键氨基酸残基的位点处靶向必需基因也许可以降低逃逸突变体的可能性,因为在这些位点处的大多数编辑将使必需蛋白质失活。使用可替代的效应核酸酶,如更小尺寸、更简单、且高度特异性的 Cpf1 也许会减少病毒逃逸现象的发生,因为被编辑后的等位基因仍然保持对 Cpf1 的可靶向性。CRISPR-Cas9 似乎是与病毒作斗争的双刃剑,针对宿主而非病毒本身的基因编辑可能是未来成功的关键。

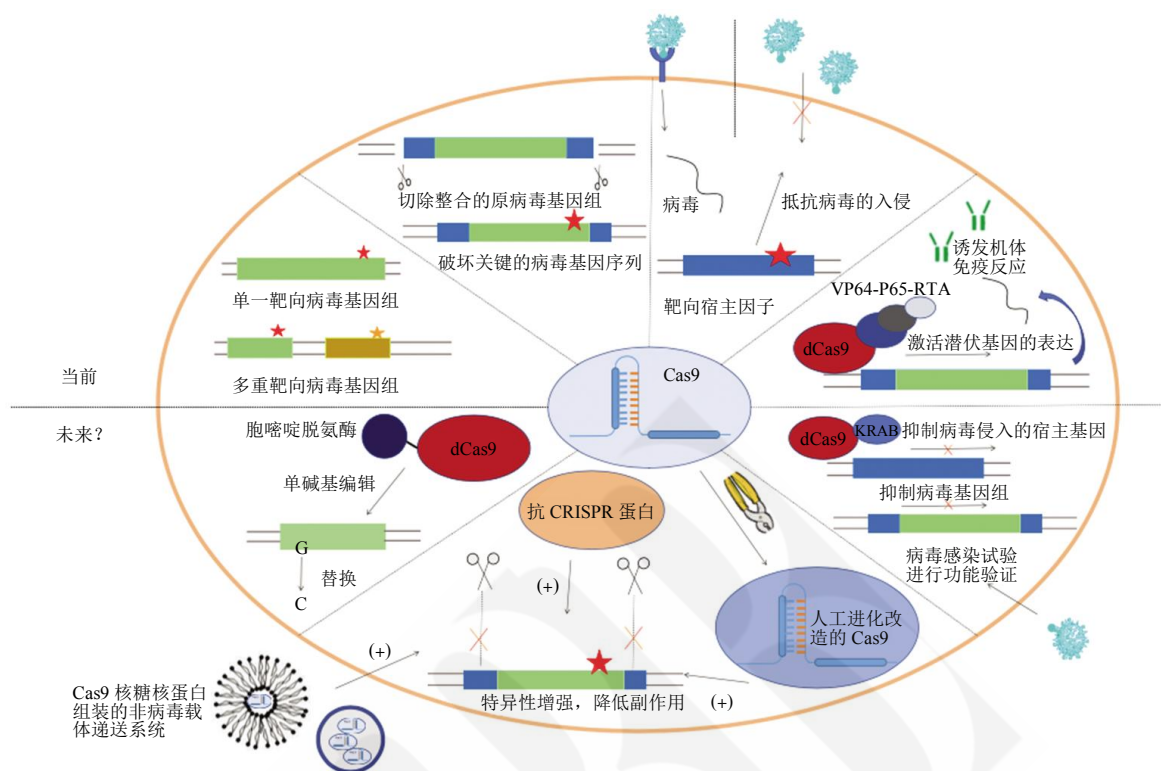


Fig. 2 Strategies to combat virus infections in human cells using Crispr-Cas9 at present and in future

图 2 CRISPR-Cas9 系统在当前以及未来预测的用于人类细胞抗病毒感染的策略

当前阶段针对人类细胞抗病毒感染的策略分为 4 个方向: a. 通过 CRISPR-Cas9 直接靶向病毒基因组可应用于在感染周期中带有 dsDNA 中间产物的病毒, 包括综述里提到的所有病毒. 单一靶向病毒基因组可能破坏必需的病毒基因或对于病毒复制或维持所必需的基因组; 多重靶向病毒基因组可导致多种病毒基因的破坏或病毒基因组的分裂并且有效地防止了病毒逃逸的发生. b. 某些病毒如 HPV 和 HIV 可将其基因组的一部分整合到宿主的基因组中. 通过 CRISPR-Cas9 靶向病毒侧翼区域, 可以从感染细胞中完全切除整合的病毒基因组. 或者, 可将 CRISPR-Cas9 导向整合病毒基因组内的重要位点, 作为灭活病毒的手段. c. 通过破坏病毒感染必需的宿主因子, 可以产生抗病毒感染的细胞群. d. 通过 CRISPRa 诱导潜伏(整合)病毒基因组的激活可以诱导潜伏病毒蛋白表达或病毒颗粒产生, 继而通过宿主的细胞病变或免疫监视机制来消灭病毒. 未来针对人类细胞抗病毒感染的策略主要有: a. 通过 CRISPRi 或 CRISPRa 筛选异常表达对病毒适应性和宿主细胞的侵入有显著影响的宿主基因, 挖掘新的抗病毒靶点. b. 使用 Cas9 核糖核蛋白组装的非病毒载体, 抗 CRISPR 蛋白和人工进化改造的 Cas9 来显著降低脱靶效应发生的概率. c. 无需双链断裂和特异性更强更准确的单碱基编辑有望成为抗病毒治疗的新方向.

对于临床适用性问题, 它是每一项医学进步必须经历的一大挑战, 同样地 CRISPR-Cas9 技术也面临着临床安全和有效性问题. 将 CRISPR-Cas9 递送到人体组织或靶细胞是其治疗传染疾病的一大挑战, 因此高效的递送系统对 CRISPR-Cas9 在临床应用能否成功至关重要. 感染细胞的位置和类型可显著影响递送系统的选择, 并因此影响疗效. 循环细胞中发生的病毒感染的治疗是很困难的, 因为这需要有效和全身性地将抗病毒 CRISPR-Cas9 递送至身体中的大多数器官. 同时, 这种全身性的递送方法会增加存在于健康组织中的脱靶编辑的风险. 在特定组织位点复制的病毒可能更适合于 CRISPR-Cas9 的靶向, 并且 CRISPR-Cas9 的局部施用降低了旁组织中脱靶编辑的可能性, 因此更加

安全. AAV 载体相比于慢病毒和腺病毒载体来说, 具有低的免疫原性和广泛的组织导向性, 并且不整合到宿主基因组中, 通常被认为可以安全用于体内^[202]. 然而, AAV 载体的小包装容量适用于常用的 Cas9(SpCas9)或较小的直系同源物, 如新发现的 Cpf1^[203], AAV 载体无法应用于分子质量大的 Cas9 的包装, 并且不太适合于靶向低感染率的淋巴细胞. 最近 Chew 等^[204]报道 Cas9 蛋白可以作为分裂蛋白递送到体内, 但是需要两种病毒载体的同时感染. 来源于金黄色葡萄球菌(3.2 kb)、奈氏脑膜炎双球菌(3.2 kb)和嗜热链球菌(3.4 kb)的 Cas9 被报道均可以有效地包装在病毒递送载体中, 并且仍保持高效的基因编辑功能^[205-207]. 大部分人群对 AAV 具有先天免疫力, 使得他们不适用于 AAV 的疗法^[208].

此外, 由于 Cas9 的持续表达, 基于 AAV 的 Cas9 递送可能会导致显著的脱靶基因组损伤^[86]. 最后, 虽然几个基于 AAV 的 Cas9 在体内临床前实验的结果令人兴奋, 但是产生治疗水平的基因编辑所需的病毒滴度比临床上可接受的水平高出多个数量级^[209-211]. 非病毒递送系统如流体动力学注射(HDI)、与电穿孔结合的视网膜下注射、基于脂质的阳离子核酸转染、生物可降解的脂质纳米颗粒、脂质体、DNA 纳米螺旋可以有效避开病毒递送系统的问题, 并且具有良好的膜通透性、高效和更低的脱靶效应^[118, 212-216]. Doudna 团队开发了 Cas9 核糖核蛋白(RNP), 这种组装的功能性酶同样可以降低脱靶的风险, 同时实现在特定组织器官释放 CRISPR-Cas9 系统, 发挥其相应作用^[217]. 脂质体和聚乙烯亚胺是最成功的 Cas9 RNP 递送载体, 并且已经能够将 Cas9 RNP 递送到耳和肿瘤中以通过非同源末端连接敲除基因. 最新报道的 CRISPR-Gold 纳米颗粒递送 Cas9 RNP 和供体 DNA 可以在体内诱导同源重组^[218]. 开发体内诱导的递送 Cas9 RNP 的非病毒载体将是基因编辑治疗领域中的重要课题.

CRISPR-Cas9 在抗病毒方面的大部分研究是基于体外的细胞培养系统, 在体内检测 CRISPR-Cas9 的抗病毒效果有待于更多验证. 为了将 CRISPR-Cas9 这一基因编辑工具发展到临床应用, 必须提高其安全性和有效性, 即考虑潜在的脱靶效应. 研究者们通过改造具有不同 PAM 偏好或增强目标序列识别的 Cas9 核酸酶, 可以显著降低 Cas9 切割的脱靶事件, 例如成对的 Cas9 缺口酶、截短的具有较短原型间隔区互补区的 gRNA 和高精度 Cas9 内切核酸酶如特异性增强的 eSpCas9(1.1)、SpCas9-HF1 和 HypaCas9^[65, 219]. 连续的人工定向进化方法可以改造生物分子获得期望的性能, 近期 David Liu 团队^[220]在细菌中使用基于噬菌体的人工进化系统(PACE)筛选出拥有最广泛 PAM 兼容性和高特异性的 Cas9、xCas9. xCas9 的识别能力比 SpCas9 增加了至少 4 倍, 可以靶向人类基因组中 1/4 的位点, 同时也会扩宽用于靶向病毒基因组和基因组筛选的范围. Casini 等^[221]则在酵母中通过在 REC3 结构域制造随机突变并构建突变体库筛选出最优突变体, evoCas9, 它突出的优点是超高的保真度, 比野生型 SpCas9 的保真度提高了 79 倍. CRISPR/Cas9 系统利用天然的 gRNA 分子进行切割是非常准确的, 仅发生大约 1% 的差错. 然而, 鉴于人体内有数万亿个细胞, 即使发生 1% 差错也是非常显

著的, 特别考虑到基因编辑是永久性的. 若发生错误切割, 那么患者可能最终会患上如癌症之类的严重疾病. 近期, 一种被称作桥接核酸(bridged nucleic acid, BNA)的合成向导分子替换天然的向导 RNA(gRNA)分子可极大地提高基因编辑技术的准确性, 将它的特异性提高 10 000 倍以上^[222]. 这种基因编辑技术仍然有障碍需要克服, 即如何将它高效地运送到人体内. 2016 年, 科学家们首次发现了 CRISPR-Cas9 的“关闭开关”. 研究小组鉴定出了 3 个天然存在的、能够抑制 Cas9 酶的蛋白质家族(AcrIIIC1、2、3), 这些抗 CRISPR 蛋白能够被用作人类细胞基因编辑的有效抑制剂^[223]. 这个“关闭开关”在基因编辑完成后被打开, 所以我们可以利用抑制 Cas9 的抗 CRISPR 蛋白来减少脱靶效应的发生^[224]. 抗 CRISPR 蛋白也可用于限制基因编辑对特定组织或发育阶段的活性来提高基于 Cas9 的基因组编辑技术的安全性和效率. CRISPR-Cas9 的基因组编辑方法一直依赖于同源重组修复的细胞机制, 然而这种修复效率很低, 而且经常在断裂点附近引入错误的碱基, 从而使得它不适合用于点突变治疗性地校正. David Liu 团队^[225]将 dCas9 和胞嘧啶脱氨酶进行融合, 构建出一种实现 C→T 准确替换的单碱基编辑器. Kouno^[226]和 Kim 团队^[227]分别通过优化胞嘧啶脱氨酶和 dCas9 的性能来改善单碱基编辑的适用范围和准确性. A→G 的腺嘌呤碱基编辑器也已经被 David Liu 团队开发, 其极大地扩展了单碱基编辑的范围, 并与先前描述的单碱基编辑器一起在基因组 DNA 实现可编程的所有 4 种碱基转换(C→T, A→G, T→C 和 G→A)^[228]. 这种方法不仅无需剪切核苷酸链产生双链裂口, 还克服了靶基因座大量片段的随机插入和缺失问题, 同时脱靶效率大大地降低. 利用单碱基编辑将病毒 DNA 进行逐点突变修饰, 覆盖错误或有意转化为非编码病毒蛋白质序列可能是 CRISPR-Cas9 应用于抗病毒继续探寻的另一个新的方向. 这些改善特异性的最新研究使得 CRISPR-Cas9 技术更加接近于临床应用, 在降低脱靶效应的副作用同时又能保持高效的治疗效果(图 2).

Cas9 中切割结构域中的突变体: dCas9 丧失了切割 DNA 的性能, 其可与转录抑制结构域融合来阻断靶基因转录(CRISPRi)或与转录激活结构域结合来激活转录(CRISPRa). 除了激活潜伏病毒和抗病毒因子或抑制病毒关键基因的表达外, CRISPRi 和 CRISPRa 技术在病毒学研究中还有多种潜在应

用. CRISPRa 和 CRISPRi 可以快速有效地筛选异常表达对病毒适应性和宿主细胞的侵入有显著影响的宿主基因. CRISPRa 比 cDNA 表达筛选具有很多优势例如, gRNA 比 cDNA 规格更小, 可以更容易更经济地来建立文库; gRNA 比 cDNA 更容易被递送到目标细胞中; gRNA 可以上调基因亚型的表达. CRISPRi 也许可以适用在传统 CRISPR-Cas9 或 siRNA 筛选难以进行研究的领域如筛选长非编码 RNA(lncRNA), 因为 lncRNA 在 RNA 水平上起作用, 并且 NHEJ 诱导的插入或缺失突变通常不足以阻断 lncRNA 的功能. 同样, lncRNA 功能的 RNAi 筛选由于脱靶效应和不稳定的敲除效率的存在也具有挑战性^[229]. CRISPRi 可适用于感染细胞的病毒基因组中存在多个拷贝位点的功能丧失研究和评估宿主细胞增强子在病毒感染细胞中的重要性的研究(图 2).

过去的 20 年里, PCR 检测和 DNA 测序方法的进步促进了对多种传染病的准确而快速的诊断, 并有助于监测抗病毒治疗的效果(如由 HIV 和巨细胞病毒引起的感染). 然而, 我们现有的诊断设备距离快速、可靠、易于使用并且价格低廉的诊断方法仍然有很大的差距. 最近, 张锋团队^[230-231]利用特异性靶向 RNA 的 Cas13a 的附属效应(一旦靶向目的 RNA, Cas13a 具有了非特异性的 RNase 活性便会开始切割临近相关的 RNA 序列)开发出一种快速检测具有单碱基特异性的核酸检测系统——SHERLOCK. SHERLOCK 可以高灵敏度检测寨卡病毒和登革热病毒的特定菌株, 还能区分这两种相近的病原菌. Cas9-Cas13a 组合展示出同时筛选宿主和 RNA 病毒基因组的潜力. 由于 Cas9 和 Cas13a 的脱靶图谱可能是有差异的, 所以 Cas13a 的分析也可以用于 Cas9 筛选的验证研究, 其中一致的表型将提示靶向特异性. 最近, Doudna 团队^[232]发现结合双链或单链 DNA 的 Cpf1 具有切割任意单链 DNA 的活性, 将其与等温扩增技术相结合开发一种新型检测系统——DETECTR. 和 SHERLOCK 类似, DETECTR 能够以高灵敏度和特异性检测任何 DNA 序列. 这些新技术的开发将推动宿主-病原体相互作用的遗传基因分析的发展, 使得病毒如何利用宿主因素这个最根本的问题更加容易得到解答.

CRISPR-Cas9 在疫苗研发方面同样具有巨大的潜力. 哺乳动物细胞系被用于大多数疫苗的生产过程, 使用基于 CRISPR-Cas9 全基因组筛选来鉴定

影响病毒复制的宿主基因的研究, 可用于创建新一代稳定的高性能疫苗生产细胞系. 带有 CRISPR-Cas9 介导的基因(抑制病毒复制的宿主基因)敲除的疫苗细胞系比 siRNA 敲除的细胞系表现出更强的病毒复制的性能并且不改变病毒的抗原性^[39]. 疫苗生产的提高促进更多本地化的小型生产设施的发展, 它们通过最小化冷藏、包装和运输要求来进一步降低成本.

综上所述, 这些最新的研究将推动 CRISPR-Cas9 系统应用于传染性疾病预防新时代的到来, 作为基因组编辑方法的 CRISPR-Cas9 技术的快速发展, 使得传染性疾病预防被深入系统地研究以及发现创新的预防和治疗干预手段. 因此, CRISPR-Cas9 系统可能是人类在抗击多种抗药性病原体 and 引发全球所有死亡人数 1/4 的流行病爆发的战斗中迫切需要的武器. 我们可以将 CRISPR-Cas9 技术与前沿的干细胞相关的再生医学技术或合成生物学技术相结合, 来降低其在人体的副作用以及人体免疫系统对其的抗性. 在未来几年该领域进一步发展的另一重点将是提高 CRISPR 基因编辑的特异性以及 CRISPR-Cas9 基因编辑评估方法的标准化. 尽管研究者在理解 CRISPR-Cas9 功能方面取得了很多重要进展, 但许多核心问题仍然模糊不清. 有趣的发现是 CRISPR-Cas9 在细菌中不仅起到适应性免疫系统的作用, 而且对于疾病的发生似乎也很重要^[132]. 这也留给我们更多的机遇来探索 CRISPR-Cas9 未知的生理功能, 进而充分发挥其抗病原体的作用.

参 考 文 献

- [1] Sepúlveda J, Murray C. The state of global health in 2014. *Science*, 2014, **345**(6202): 1275-1278
- [2] Zumla A, Rao M, Wallis R S, *et al.* Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect Dis*, 2016, **16**(4): e47-63
- [3] Birkmann A, Zimmermann H. HSV antivirals-current and future treatment options. *Curr Opin Virol*, 2016, **18**: 9-13
- [4] Graham B S, Sullivan N J. Emerging viral diseases from a vaccinology perspective: preparing for the next pandemic. *Nat Immunol*, 2018, **19**(1): 20-28
- [5] Cox D B, Platt R J, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, 2015, **21**(2): 121-131
- [6] Yin H, Kauffman K J, Anderson D G, *et al.* Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, **16**(6): 387-399
- [7] O'Connell M R, Oakes B L, Sternberg S H, *et al.* Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 2014, **516**(7530): 263-266

- [8] Zuo E, Cai Y J, Li K, *et al.* One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell Res*, 2017, **27**(7): 933–945
- [9] Findlay G M, Boyle E A, Hause R J, *et al.* Saturation editing of genomic regions by multiplex homology-directed repair. *Nature*, 2014, **513**(7516): 120–123
- [10] Xue W, Chen S, Yin H, *et al.* CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*, 2014, **514**(7522): 380–384
- [11] Chiou S H, Winters I P, Wang J, *et al.* Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and *in vivo* CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. *Genes Dev*, 2015, **29**(14): 1576–1585
- [12] Sánchez-Rivera F J, Papagiannakopoulos T, Romero R, *et al.* Rapid modelling of cooperating genetic events in cancer through somatic genome editing. *Nature*, 2014, **516**(7531): 428–431
- [13] Chen Y, Zheng Y, Kang Y, *et al.* Functional disruption of the dystrophin gene in Rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015, **24**(13): 3764–3774
- [14] Feng C, Wang X, Shi H, *et al.* Generation of ApoE deficient dogs *via* combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer. *J Genet Genomics*, 2018, **45**(1): 47–50
- [15] Peng J, Wang Y, Jiang J, *et al.* Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Sci Rep*, 2015, **5**: 16705
- [16] Paquet D, Kwart D, Chen A, *et al.* Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 2016, **533**(7601): 125–129
- [17] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, *et al.* *In vivo* genome editing *via* CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, 2016, **540**(7631): 144–149
- [18] Winters I P, Chiou S H, Paulk N K, *et al.* Multiplexed *in vivo* homology-directed repair and tumor barcoding enables parallel quantification of Kras variant oncogenicity. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2053
- [19] Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, *et al.* ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10431
- [20] Wang K, Tang X, Liu Y, *et al.* Efficient generation of orthologous point mutations in pigs *via* CRISPR-assisted ssODN-mediated homology-directed repair. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, **5**(11): e396
- [21] Chen S, Sanjana N E, Zheng K, *et al.* Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell*, 2015, **160**(6): 1246–1260
- [22] Hammond A, Galizi R, Kyrou K A, *et al.* CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(1): 78–83
- [23] Shapiro R S, Chavez A, Collins J J. CRISPR-based genomic tools for the manipulation of genetically intractable microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2018, **16**(6): 333–339
- [24] Ji W, Lee D, Wong E, *et al.* Specific gene repression by CRISPRi system transferred through bacterial conjugation. *ACS Synth Biol*, 2014, **3**(12): 929–931
- [25] Yosef I, Manor M, Kiro R, *et al.* Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(23): 7267–7272
- [26] Soares Medeiros L C, South L, Peng D, *et al.* Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *MBio*, 2017, **8**(6): e01788–17
- [27] Korkmaz G, Lopes R, Ugalde A P, *et al.* Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(2): 192–198
- [28] Yilmaz A, Peretz M, Aharony A, *et al.* Defining essential genes for human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 screening in haploid cells. *Nat Cell Biol*, 2018, **20**(5): 610–619
- [29] Klann T S, Black J B, Chellappan M, *et al.* CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(6): 561–568
- [30] Nelson C A, Fremont D H, Virgin H W. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. *Science*, 2016, **353**(6302): 933–936
- [31] Haga K, Fujimoto A, Takai-Todaka R, *et al.* Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(41): E6248–E6255
- [32] Sebastian Virreira Winter, Arturo Zychlinsky, Bart W Bardoel. Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated toxicity. *Sci Rep*, 2016, **6**: 24242
- [33] Zhang R, Miner J J, Gorman M J, *et al.* A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. *Nature*, 2016, **535**(7610): 164–168
- [34] Ma H, Dang Y, Wu Y, *et al.* A CRISPR-based screen identifies genes essential for west-nile-virus-induced cell death. *Cell Rep*, 2015, **12**(4): 673–683
- [35] Marceau C D, Puschnik A S, Majzoub K, *et al.* Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens. *Nature*, 2016, **535**(7610): 159–163
- [36] Sidik S M, Huet D, Ganesan S MA, *et al.* A genome-wide CRISPR screen in toxoplasma identifies essential apicomplexan genes. *Cell*, 2016, **166**(6): 1423–1435
- [37] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, **343**(6166): 84–87
- [38] Ophir Shalem, Neville E. Sanjana, Feng Zhang. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews Genetics*, 2015, **16**(5): 299–311
- [39] van der Sanden S M, Wu W, Dybdahl-Sissoko N, *et al.* Engineering enhanced vaccine cell lines to eradicate vaccine-preventable diseases: the polio end game. *J Virol*, 2015, **90**(4): 1694–1704
- [40] Bikard D, Euler C W, Jiang W, *et al.* Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(11): 1146–1150

- [41] Dominguez A A, Lim W A, Qi L S. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, **17**(1): 5–15
- [42] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(6): 467–477
- [43] Chylinski K, Makarova K S, Charpentier E, *et al.* Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(10): 6091–6105
- [44] Konermann S, Brigham M D, Trevino A E, *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, **517**(7536): 583–588
- [45] Levy A, Goren M G, Yosef I, *et al.* CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature*, 2015, **520**(7548): 505–510
- [46] Modell J W, Jiang W, Marraffini L A. CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity. *Nature*, 2017, **544**(7648): 101–104
- [47] Heler R, Wright A V, Vucelja M, *et al.* Mutations in Cas9 enhance the rate of acquisition of viral spacer sequences during the CRISPR-cas immune response. *Mol Cell*, 2017, **65**(1): 168–175
- [48] van der Oost J, Westra E R, Jackson R N, *et al.* Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2014, **12**(7): 479–492
- [49] Nuñez J K, Lee A S, Engelman A, *et al.* Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*, 2015, **519**(7542): 193–198
- [50] Moch C, Fromant M, Blanquet S, *et al.* DNA binding specificities of *Escherichia coli* Cas1-Cas2 integrase drive its recruitment at the CRISPR locus. *Nucleic Acids Res*, 2017, **45**(5): 2714–2723
- [51] Wright A V, Liu J J, Knott G J, *et al.* Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*, 2017, **357** (6356): 1113–1118
- [52] Arslan Z, Wurm R, Brener O, *et al.* Double-strand DNA end-binding and sliding of the toroidal CRISPR-associated protein Csn2. *Nucleic Acids Res*, 2013, **41**(12): 6347–6359
- [53] Fonfara I, Le Rhun A, Chylinski K, *et al.* Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**(4): 2577–2590
- [54] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, **471**(7340): 602–607
- [55] Sternberg S H, Redding S, Jinek M, *et al.* DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 2014, **507**(7490): 62–70
- [56] Prashant Mali, Kevin M Esvelt, George M Church. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, **10**(10): 957–963
- [57] Jinek M, Jiang F, Taylor D W, *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, **343**(6176): 1247997
- [58] Sternberg S H, LaFrance B, Kaplan M, *et al.* Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. *Nature*, 2015, **527**(7576): 110–113
- [59] Chen J S, Dagdas Y S, Kleinstiver B P, *et al.* Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 2017, **550**(7676): 407–410
- [60] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, **337**(6096): 816–821
- [61] Mali P, Yang L, Esvelt K M, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, **339**(6121): 823–826
- [62] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, **339**(6121): 819–823
- [63] Fu Y, Sander J D, Reyon D, *et al.* Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2014, **32**(3): 279–284
- [64] Wang T, Wei J J, Sabatini D M, *et al.* Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, **343** (6166): 80–84
- [65] Kleinstiver B P, Pattanayak V, Prew M S, *et al.* High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 2016, **529**(7587): 490–495
- [66] Nisha Rajagopal, Sharanya Srinivasan, Kameron Kooshesh, *et al.* High-throughput mapping of regulatory DNA. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(2): 167–174
- [67] Smith I, Greenside P G, Natoli T, *et al.* Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. *Plos Biology*, 2017, **15**(11): e2003213
- [68] Tzelepis K, Koikeysa H, Brackeleer E D, *et al.* A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell Reports*, 2016, **17**(4): 1193–1205
- [69] Wang T, Birsoy K, Hughes N W, *et al.* Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*, 2015, **350**(6264): 1096–1101
- [70] Vidigal J A, Ventura A. Rapid and efficient one-step generation of paired gRNA CRISPR-Cas9 libraries. *Nat Commun*, 2015, **6**: 8083
- [71] Gargan S, Ahmed S, Mahony R, *et al.* HIV-1 promotes the degradation of components of the type 1 IFN JAK/STAT pathway and blocks anti-viral ISG induction. *EBioMedicine*, 2018, **30**: 203–216
- [72] Gu W G. Genome editing-based HIV therapies. *Trends Biotechnol*, 2015, **33**(3): 172–179
- [73] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, *et al.* Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013, **3**: 2510
- [74] Kaminski R, Chen Y, Fischer T, *et al.* Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci Rep*, 2016, **6**: 22555
- [75] Kaminski R, Chen Y, Salkind J, *et al.* Negative feedback regulation of HIV-1 by gene editing strategy. *Sci Rep*, 2016, **6**: 31527
- [76] Zhu W, Lei R, Le Duff Y, *et al.* The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 2015, **12**: 22

- [77] Liao H K, Gu Y, Diaz A, *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 2015, **6**: 6413
- [78] Lebbink R J, de Jong D C, Wolters F, *et al.* A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci Rep*, 2017, **7**: 41968
- [79] Wang G, Zhao N, Berkhout B, *et al.* A combinatorial CRISPR-Cas9 attack on HIV-1 DNA extinguishes all infectious provirus in infected T cell cultures. *Cell Rep*, 2016, **17**(11): 2819–2826
- [80] Wang G, Zhao N, Berkhout B, *et al.* CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. *Mol Ther*, 2016, **24**(3): 522–566
- [81] Wang Z, Pan Q, Gendron P, *et al.* CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep*, 2016, **15**(3): 481–489
- [82] Yin C, Zhang T, Qu X, *et al.* *In vivo* excision of HIV-1 provirus by saCas9 and multiplex single-guide RNAs in animal models. *Mol Ther*, 2017, **25**(5): 1168–1186
- [83] Lei L, Chen H, Xue W, *et al.* APOBEC3 induces mutations during repair of CRISPR-Cas9-generated DNA breaks. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2017, **25**(1): 45–52
- [84] Barré-Sinoussi F, Ross A L, Delfraissy J F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*, 2013, **11** (12): 877–883
- [85] 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): 11461–11466
- [86] Schumann K, Lin S, Boyer E, *et al.* Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(33): 10437–10442
- [87] Hütter G, Nowak D, Mossner M, *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2009, **360**(7): 692–698
- [88] Ye L, Wang J, Beyer A I, *et al.* Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(26): 9591–9600
- [89] Mandal P K, Ferreira L M, Collins R, *et al.* Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*, 2014, **15**(5): 643–652
- [90] Calero-Garcia M, Gaspar H B. Gene-ectomy: gene ablation with CRISPR/Cas9 in human hematopoietic cells. *Cell Stem Cell*, 2014, **15**(5): 529–530
- [91] Wang W, Ye C, Liu J, *et al.* CCR5 gene disruption *via* lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *Plos One*, 2014, **9**(12): e115987
- [92] Li C, Guan X, Du T, *et al.* Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J Gen Virol*, 2015, **96**(8): 2381–2393
- [93] Xu L, Yang H, Gao Y, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance *in vivo*. *Mol Ther*, 2017, **25**(8): 1782–1789
- [94] Martin A R, Siliciano R F. Progress toward HIV eradication: case reports, current efforts, and the challenges associated with cure. *Annu Rev Med*, 2016, **67**: 215–228
- [95] Soppe J A, Lebbink R J. Antiviral goes viral: harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. *Trends Microbiol*, 2017, **25**(10): 833–850
- [96] Saayman S M, Lazar D C, Scott T A, *et al.* Potent and targeted activation of latent HIV-1 using the CRISPR/dCas9 activator complex. *Mol Ther*, 2016, **24**(3): 488–498
- [97] Limsirichai P, Gaj T, Schaffer D V. CRISPR-mediated activation of latent HIV-1 expression. *Mol Ther*, 2016, **24**(3): 499–507
- [98] Ji H, Jiang Z, Lu P, *et al.* Specific reactivation of latent HIV-1 by dCas9-SunTag-VP64-mediated guide RNA targeting the HIV-1 promoter. *Mol Ther*, 2016, **24**(3): 508–521
- [99] Liao H K, Hatanaka F, Araoka T, *et al.* *In vivo* target gene activation *via* CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell*, 2017, **171**(7): 1495–1507
- [100] Bogerd H P, Kornepati A V, Marshall J B, *et al.* Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(52): E7249–E7256
- [101] Chen S, Bonifati S, Qin Z, *et al.* SAMHD1 suppresses innate immune responses to viral infections and inflammatory stimuli by inhibiting the NF-κB and interferon pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(16): E3798–E3807
- [102] Joas S, Parrish E H, Gnanadurai C W, *et al.* Species-specific host factors rather than virus-intrinsic virulence determine primate lentiviral pathogenicity. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1371
- [103] Jung U, Urak K, Veillette M, *et al.* Preclinical assessment of mutant human TRIM5α as an anti-HIV-1 transgene. *Hum Gene Ther*, 2015, **26**(10): 664–679
- [104] Park R J, Wang T, Koundakjian D, *et al.* A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nature Genetics*, 2017, **49**(2): 193–203
- [105] Stanaway J D, Flaxman A D, Naghavi M, *et al.* The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2016, **388** (10049): 1081–1088
- [106] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, **343**(6176): 1221–1228
- [107] Revill P, Testoni B, Locarnini S, *et al.* Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, **13**(4): 239–248
- [108] Yuen M F, Lai C L. Treatment of chronic hepatitis B: evolution over two decades. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, Suppl 1: 138–143
- [109] Nayagam S, Thursz M, Sicuri E, *et al.* Requirements for global elimination of hepatitis B: a modelling study. *Lancet Infect Dis*, 2016, **16**(12): 1399–1408
- [110] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, *et al.* The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, **3**(8): e186

- [111]Seeger C, Sohn J A. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, **3**(12): e216
- [112]Dong C, Qu L, Wang H, *et al.* Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res*, 2015, **118**: 110–117
- [113]Kennedy E M, Bassit L C, Mueller H, *et al.* Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology*, 2015, **476**: 196–205
- [114]Karimova M, Beschorn N, Dammermann W, *et al.* CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13734
- [115]Liu X, Hao R, Chen S, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system *via* targeting the conserved regions of the viral genome. *J Gen Virol*, 2015, **96**(8): 2252–2261
- [116]Ramanan V, Shlomai A, Cox D B, *et al.* CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci Rep*, 2015, **5**: 10833
- [117]Wang J, Xu Z W, Liu S, *et al.* Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*, 2015, **21**(32): 9554–9565
- [118]Zhen S, Hua L, Liu Y H, *et al.* Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther*, 2015, **22**(5): 404–412
- [119]Li H, Sheng C, Liu H, *et al.* An effective molecular target site in hepatitis B virus S gene for Cas9 cleavage and mutational inactivation. *Int J Biol Sci*, 2016, **12**(9): 1104–1113
- [120]Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, *et al.* Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*, 2016, **21**(11): 1253–1262
- [121]Zhu W, Xie K, Xu Y, *et al.* CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res*, 2016, **217**: 125–132
- [122]Jiang C, Mei M, Li B, *et al.* A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and psk9 *in vivo*. *Cell Res*, 2017, **27**(3): 440–443
- [123]Li H, Sheng C, Wang S, *et al.* Removal of integrated hepatitis B virus DNA using CRISPR-Cas9. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, **7**: 91
- [124]Seeger C, Sohn J A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol Ther*, 2016, **24**(7): 1258–1266
- [125]Wang J, Chen R, Zhang R, *et al.* The gRNA-miRNA-gRNA ternary cassette combining CRISPR/Cas9 with RNAi approach strongly inhibits hepatitis B virus replication. *Theranostics*, 2017, **7** (12): 3090–3105
- [126]Liu Y, Zhao M, Gong M, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication *via* HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res*, 2018, **152**: 58–67
- [127]Yang H C, Chen P J. The potential and challenges of CRISPR-Cas in eradication of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Virus Res*, 2018, **244**: 304–310
- [128]Chisari F V, Mason W S, Seeger C. *Virology*. Comment on "Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA". *Science*, 2014, **344**(6189): 1237
- [129]Skoreň ski M, Sień czyk M. Anti-herpesvirus agents: a patent and literature review (2003 to present). *Expert Opin Ther Pat*, 2014, **24**(8): 925–941
- [130]Griffin B D, Verweij M C, Wiertz E J. Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet Microbiol*, 2010, **143**(1): 89–100
- [131]Harris S A, Harris E A. Herpes simplex virus type 1 and other pathogens are key causative factors in sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2015, **48**(2): 319–353
- [132]Doerflinger M, Forsyth W, Ebert G, *et al.* CRISPR/Cas9-The ultimate weapon to battle infectious diseases? *Cell Microbiol*, 2017, **19**: e12693
- [133]Coen D M, Schaffer P A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**(4): 278–288
- [134]Ma Y, He B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. *J Mol Biol*, 2014, **426**(6): 1133–1147
- [135]Bi Y, Sun L, Gao D, *et al.* High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *Plos Pathog*, 2014, **10**(5): e1004090
- [136]Mocarski E S, Post L E, Roizman B. Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell*, 1980, **22**(1 Pt 1): 243–255
- [137]Agarwalla P K, Aghi M K. Oncolytic herpes simplex virus engineering and preparation. *Methods Mol Biol*, 2012, **797**: 1–19
- [138]Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, *et al.* Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol*, 2014, **58**(9): 513–522
- [139]Russell T A, Stefanovic T, Tschärke D C. Engineering herpes simplex viruses by infection-transfection methods including recombination site targeting by CRISPR/Cas9 nucleases. *J Virol Methods*, 2015, **213**: 18–25
- [140]Xingli Xu, Shengtao Fan, Jienan Zhou, *et al.* The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of α -4 gene transcription. *Virol J*, 2016, **13**(1): 152
- [141]van Diemen F R, Kruse E M, Hooykaas M J, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *Plos Pathog*, 2016, **12** (6): e1005701
- [142]Roehm P C, Shekarabi M, Wollebo H S, *et al.* Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy. *Sci Rep*, 2016, **6**: 23146
- [143]Weber N D, Aubert M, Dang C H, *et al.* DNA cleavage enzymes for treatment of persistent viral infections: recent advances and the pathway forward. *Virology*, 2014, **454–455**(1): 353–361
- [144]Nicol M P, Proença J T, Efsthathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, **36**(3): 684–705
- [145]Chen X, Rinsma M, Janssen J M, *et al.* Probing the impact of

- chromatin conformation on genome editing tools. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(13): 6482–6492
- [146]Horlbeck M A, Witkowsky L B, Guglielmi B, *et al.* Nucleosomes impede Cas9 access to DNA *in vivo* and *in vitro*. *Elife*, 2016, **5**: e12677
- [147]Ojala P M, Sodeik B, Ebersold M W, *et al.* Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: Reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex *in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(13): 4922–4931
- [148]Yuan S, Wang J L, Zhu D J, *et al.* Cryo-EM structure of a herpesvirus capsid at 3.1 Å. *Science*, 2018, **360**(6384): eaao7283
- [149]Dai X, Zhou Z H. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. *Science*, 2018, **360**(6384): eaao7298
- [150]Griffiths P D. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. *Lancet Infect Dis*, 2012, **12**(10): 790–800
- [151]Bierle C J, Anderholm K M, Wang J B, *et al.* Targeted mutagenesis of guinea pig cytomegalovirus using CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *J Virol*, 2016, **90**(15): 6989–6998
- [152]Worth A J, Houldcroft C J, Booth C. Severe Epstein-Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host. *Br J Haematol*, 2016, **175**(4): 559–576
- [153]Taylor G S, Long H M, Brooks J M, *et al.* The immunology of *Epstein-Barr* virus-induced disease. *Annu Rev Immunol*, 2015, **33**: 787–821
- [154]Wang J, Quake S R. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, **111**(36): 13157–13162
- [155]Yuen K S, Chan C P, Wong N H, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Epstein-Barr* virus in human cells. *J Gen Virol*, 2015, **96**(Pt 3): 626–636
- [156]Kanda T, Furuse Y, Oshitani H, *et al.* Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated cloning and functional characterization of gastric cancer-derived *Epstein-Barr* virus strains. *J Virol*, 2016, **90**(9): 4383–4393
- [157]Lo A K, Dawson C W, Jin D Y, *et al.* The pathological roles of BART miRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*, 2012, **227**(4): 392–403
- [158]Riley K J, Rabinowitz G S, Yario T A, *et al.* EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *EMBO J*, 2012, **31**(9): 2207–2221
- [159]Ohashi M, Holthaus A M, Calderwood M A, *et al.* The EBNA3 family of *Epstein-Barr* virus nuclear proteins associates with the USP46/USP12 deubiquitination complexes to regulate lymphoblastoid cell line growth. *Plos Pathogens*, 2015, **11** (4): e1004822
- [160]Greenfield H, Takasaki K, Walsh M J, *et al.* TRAF1 coordinates polyubiquitin signaling to enhance *Epstein-Barr* virus LMP1-mediated growth and survival pathway activation. *Plos Pathogens*, 2015, **11**(5): e1004890
- [161]Chen J, Sathiyamoorthy K, Zhang X, *et al.* Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for *Epstein-Barr* virus. *Nature Microbiology*, 2018, **3**(2): 172–180
- [162]Zhang H, Li Y, Wang H B, *et al.* Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for *Epstein-Barr* virus entry. *Nat Microbiol*, 2018, **3**(2): 1–8
- [163]Jordi M, Marty J, Mordasini V, *et al.* IRAK4 is essential for TLR9-induced suppression of *Epstein-Barr* virus BZLF1 transcription in Akata Burkitt's lymphoma cells. *Plos One*, 2017, **12**(10): e0186614.
- [164]Ersing I, Nobre L, Wang L W, *et al.* A temporal proteomic map of *Epstein-Barr* virus lytic replication in B cells. *Cell Reports*, 2017, **19**(7): 1479–1493
- [165]Ma Y, Walsh M J, Bernhardt K, *et al.* CRISPR/Cas9 screens reveal *Epstein-Barr* virus-transformed B cell host dependency factors. *Cell Host Microbe*, 2017, **21**(5): 580–591
- [166]Mighty K K, Laimins L A. The role of human papillomaviruses in oncogenesis. *Recent Results Cancer Res*, 2014, **193**: 135–148
- [167]Zaravinos A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget*, 2014, **5**(12): 3956–3969
- [168]Accardi R, Gheit T. Cutaneous HPV and skin cancer. *Presse Med*, 2014, **43**(12 Pt 2): e435–e443
- [169]Yom S S. HPV and oropharyngeal cancer: etiology and prognostic importance. *Semin Cutan Med Surg*, 2015, **34**(4): 178–181
- [170]Moody C A, Laimins L A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 2010, **10**(8): 550–560
- [171]Bello J O, Nieva L O, Paredes A C, *et al.* Regulation of the Wnt/β-catenin signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Viruses*, 2015, **7**(8): 4734–4855
- [172]Tan S, de Vries E G, van der Zee A G, *et al.* Anticancer drugs aimed at E6 and E7 activity in HPV-positive cervical cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, **12**(2): 170–184
- [173]Zhen S, Hu C M, Bian L H. Glutathione S-transferase polymorphism interactions with smoking status and HPV infection in cervical cancer risk: an evidence-based meta-analysis. *Plos One*, 2013, **8**(12): e83497
- [174]Münger K, Baldwin A, Edwards K M, *et al.* Mechanisms of human papillomavirus induced oncogenesis. *J Virol*, 2004, **78**(21): 11451–11460
- [175]Giuliano A R, Palefsky J M, Goldstone S, *et al.* Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med*, 2011, **364**(5): 401–411
- [176]Butz K, Denk C, Ullmann A, *et al.* Induction of apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(12): 6693–6697
- [177]Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, *et al.* siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 2003, **22**(38): 5938–5945
- [178]Ajiro M, Zheng Z M. E6*E7, a novel splice isoform protein of human papillomavirus 16, stabilizes viral E6 and E7 oncoproteins via HSP90 and GRP78. *Mbio*, 2015, **6**(1): e02068
- [179]Kennedy E M, Kornepati A V, Goldstein M, *et al.* Inactivation of

- the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells by using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided endonuclease. *J Virol*, 2014, **88**(20): 11965–11972
- [180] 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): 1422–1426
- [181] Hu Z, Yu L, Zhu D, *et al.* Disruption of HPV16-E7 by CRISPR/Cas system induces apoptosis and growth inhibition in HPV16 positive human cervical cancer cells. *Biomed Res Int*, 2016, **2014**(3): 612823
- [182] Lan Y, Wang X, Da Z, *et al.* Disruption of human papillomavirus 16 E6 gene by clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas system in human cervical cancer cells. *Oncotargets & Therapy*, 2015, **8**(default): 37–44
- [183] Liu Y C, Cai Z M, Zhang X J. Reprogrammed CRISPR-Cas9 targeting the conserved regions of HPV6/11 E7 genes inhibits proliferation and induces apoptosis in E7-transformed keratinocytes. *Asian Journal of Andrology*, 2016, **18**(3): 475–479
- [184] Zhen S, Lu J J, Wang L J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* synergistic therapeutic effect of cisplatin with human papillomavirus 16 E6/E7 CRISPR/Cas9 on cervical cancer cell line. *Translational Oncology*, 2016, **9**(6): 498–504
- [185] Das D, Smith N, Wang X, *et al.* The deacetylase SIRT1 regulates the replication properties of human papillomavirus 16 E1 and E2. *Journal of Virology*, 2017, **91**(10): e00102–17
- [186] Leung T H, Tang H W, Siu M K, *et al.* HPV-E6 protein enriches the CD55 (+) population in cervical cancer cells promoting radio-resistance and cancer aggressiveness. *Journal of Pathology*, 2017, **244**(2): 151–163
- [187] Chiang C, Pauli E K, Biryukov J, *et al.* The human papillomavirus E6 oncoprotein targets USP15 and TRIM25 to suppress RIG-I-mediated innate immune signaling. *Journal of Virology*, 2017, **92**(6): e01737–17
- [188] Gimenes F, Souza R P, Abreu A L P D, *et al.* Simultaneous detection of human papillomavirus integration and c-MYC gene amplification in cervical lesions: an emerging marker for the risk to progression. *Archives of Gynecology & Obstetrics*, 2016, **293**(4): 857–863
- [189] Langsfeld E S, Bodily J M, Laimins L A. The deacetylase sirtuin 1 regulates human papillomavirus replication by modulating histone acetylation and recruitment of DNA damage factors NBS1 and Rad51 to viral genomes. *Plos Pathogens*, 2015, **11**(9): e1005181
- [190] Shen C, Liu Y, Shi S, *et al.* Long-distance interaction of the integrated HPV fragment with MYC gene and 8q24.22 region upregulating the allele-specific MYC expression in HeLa cells. *Int J Cancer*, 2017, **141**(3): 540–548
- [191] Bui N, Huang J K, Bojorquez-Gomez A, *et al.* Disruption of NSD1 in head and neck cancer promotes favorable chemotherapeutic responses linked to hypomethylation. *Mol Cancer Ther*, 2018, pii: molcanther.0937.2017
- [192] Jiang M, Abend J R, Johnson S F, *et al.* The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, 2009, **384**(2): 266–273
- [193] Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, *et al.* Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med*, 2012, **366**(20): 1870–1880
- [194] Tavazzi E, White M K, Khalili K. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and molecular aspects. *Reviews in Medical Virology*, 2012, **22**(1): 18–32
- [195] Wollebo H S, Bellizzi A, Kaminski R, *et al.* CRISPR/Cas9 system as an agent for eliminating polyomavirus JC infection. *Plos One*, 2015, **10**(9): e0136046
- [196] Chou Y Y, Krupp A, Kaynor C, *et al.* Inhibition of JCPyV infection mediated by targeted viral genome editing using CRISPR/Cas9. *Sci Rep*, 2016, **6**: 36921
- [197] Pereira J M, Meraner P, Brass A L. Functional genomic strategies for elucidating human-virus interactions: will CRISPR knockout RNAi and haploid cells? *Adv Virus Res*, 2016, **94**: 1–51
- [198] Savidis G, McDougall W M, Meraner P, *et al.* Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics. *Cell Reports*, 2016, **16**(1): 232–246
- [199] Wilen C B, Lee S, Hsieh L L, *et al.* Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. *Science*, 2018, **360**(6385): 204–208
- [200] Price A A, Sampson T R, Ratner H K, *et al.* Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(19): 6164–6169
- [201] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, **346**(6213): 1258096
- [202] Kotterman M A, Schaffer D V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2014, **15** (7): 445–451
- [203] Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, **163**(3): 759–771
- [204] Chew W L, Tabebordbar M, Cheng J K, *et al.* A multifunctional AAV-CRISPR-Cas9 and its host response. *Nature Methods*, 2016, **13**(10): 868–874
- [205] Ran F A, Cong L, Yan W X, *et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, **520**(7546): 186–191
- [206] Hou Z, Zhang Y, Propson N E, *et al.* Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110** (39): 15644–15649
- [207] Price A A, Sampson T R, Ratner H K, *et al.* Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(19): 6164–6169
- [208] Lin S, Staahl B T, Alla R K, *et al.* Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *Elife*, 2014, **3**(6): e04766
- [209] Tabebordbar M, Zhu K, Cheng J, *et al.* *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 2016, **351**(6271): 407–411

- [210] Nelson C E, Hakim C H, Ousterout D G, *et al.* *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2016, **351**(6271): 403–407
- [211] Long C, Amoasii L, Mireault A A, *et al.* Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 2015, **351**(6271): 400–403
- [212] Bakondi B, Lv W, Lu B, *et al.* *In vivo* CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 2016, **24**(3): 556–563
- [213] Zuris J A, Thompson D B, Shu Y, *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2015, **33**(1): 73–80
- [214] Wang M, Zuris J A, Meng F, *et al.* Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(11): 2868–2873
- [215] Sun W, Ji W, Hall J M, *et al.* Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, **54**(41): 12029–12033
- [216] Yu X, Liang X, Xie H, *et al.* Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnology Letters*, 2016, **38**(6): 919–929
- [217] Staahl B T, Benekareddy M, Coulonbainier C, *et al.* Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(5): 431–434
- [218] Lee K, Conboy M, Park H M, *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering* 2017, **1**(11): 889–901
- [219] Slaymaker I M, Gao L, Zetsche B, *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, **351**(6268): 84–88
- [220] Hu J H, Miller S M, Geurts M H, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, **556**(7699): 57–63
- [221] Casini A, Olivieri M, Petris G, *et al.* A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nature Biotechnology*, 2018, **36**(3): 265–271
- [222] Cromwell C R, Sung K, Park J, *et al.* Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nature Communications*, 2018, **9**(1): 1448
- [223] Pawluk A, Amrani N, Zhang Y, *et al.* Naturally occurring off-switches for CRISPR-Cas9. *Cell*, 2016, **167**(7): 1829–1838
- [224] Shin J, Jiang F, Liu J J, *et al.* Disabling Cas9 by an anti-CRISPR DNA mimic. *Sci Adv*, 2017, **3**(7): e1701620
- [225] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, **533**(7603): 420–424
- [226] Kouno T, Silvas T V, Hilbert B J, *et al.* Crystal structure of APOBEC3A bound to single-stranded DNA reveals structural basis for cytidine deamination and specificity. *Nat Commun*, 2017, **8**: 15024
- [227] Kim Y B, Komor A C, Levy J M, *et al.* Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 2017, **35**(4): 371–376
- [228] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, *et al.* Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, **551**(7681): 464–471
- [229] Gebre M, Nomburg J L, Gewurz B E. CRISPR-Cas9 genetic analysis of virus-host interactions. *Viruses*, 2018, **10**(2): 55
- [230] Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, *et al.* RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, **550**(7675): 280–284
- [231] Gootenberg J S, Abudayyeh O O, Lee J W, *et al.* Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, **356**(6336): 438–442
- [232] Chen J S, Ma E, Harrington L B, *et al.* CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 2018, **360**(6387): 436–439

Applications of CRISPR-Cas9 in The Prevention and Control of Viral Infectious Diseases*

LI Gen¹⁾, LIU Jun-Hua¹⁾, HE Li-Jie²⁾, YIN Xiu-Shan^{1,3)**}

¹⁾ College of Pharmaceutical and Biological Engineering, Shenyang University Of Chemical Technology, Shenyang 110142, China;

²⁾ The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, China;

³⁾ Karolinska Institutet (MTC), Science for Life Laboratory, Tomtebodavägen 23A (Gamma5), 17165 Solna, Sweden)

Abstract Infectious diseases make up an important threat to human health and there is an urgent need for new treatments to reduce morbidity and mortality caused by acute viral infections such as rhinovirus and dengue virus, and chronic viral infections such as human immunodeficiency virus-1 and hepatitis B virus. With the development of molecular biology technology, gene-editing technology targeting sequence-specific loci has become a powerful tool for the treatment of infectious diseases. Among them, the regular clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) -CRISPR associated protein 9 (Cas9) is widely used in cell lines and animal models because of its high efficiency, convenience and high specificity, which has become a promising model for the treatment of new infectious diseases. Currently, feasibility studies of the use of viral and non-viral vectors to deliver Cas9 into cells in the form of DNA, mRNA or protein and clinical trials assessing the *in vivo* applicability of CRISPR-Cas9 are under way. In this review, we outline the principles of CRISPR-Cas9, the latest research advances in the treatment of infectious diseases, the challenges and possible solutions to the technology, and look further into its future direction.

Key words viral infectious diseases, gene editing techniques, CRISPR-Cas9, viral vectors, clinical trials

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0032

* This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2014CBA02002, 2014CBA02005).

**Corresponding author.

Tel: 86-755-36307403, E-mail: siqiliu@genomics.cn

Received: May 6, 2018 Accepted: July 13, 2018