

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在 HIV-1 感染治疗中的应用进展

韩英伦^{1,2}, 李庆伟^{1,2}

1. 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029;
2. 辽宁师范大学七鳃鳗研究中心, 大连 116029

摘要: 基因治疗是将外源正常基因通过一定方式导入人体靶细胞以纠正或补偿因基因缺陷和异常引起的疾病, 从而达到治疗目的。因此, 基因治疗的技术方法在研究持续感染 HIV-1 或潜伏感染 HIV-1 原病毒患者的治疗中具有重大的现实意义。目前, 现有的基因治疗方法存在识别靶向位点有限及脱靶几率大等主要问题。最新研究表明来源于细菌和古菌的规律间隔成簇短回文重复序列及其相关核酸酶 9 系统[Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9), CRISPR/Cas9]已被成功改造成基因组定点编辑工具。因此, 如何利用 CRISPR/Cas9 系统实现对 HIV-1 病毒基因组进行高效靶向修饰, 从而达到治疗 HIV-1 感染病患的目的已经成为当前研究的热点。本文参考最新国内外研究成果, 重点介绍了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在 HIV-1 感染疾病治疗中的应用, 主要包括 CCR5 基因编辑、清除 HIV-1 原病毒以及活化 HIV-1 原病毒, 以期对 HIV-1 感染疾病的预防与治疗提供重要研究参考。

关键词: CRISPR/Cas9; 人类免疫缺陷病毒; 基因组编辑

Application progress of CRISPR/Cas9 genome editing technology in the treatment of HIV-1 infection

Yinglun Han^{1,2}, Qingwei Li^{1,2}

1. College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;
2. Lamprey Research Center, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

Abstract: The goal of gene therapy is to introduce foreign genes into human target cells in a certain way to correct or compensate diseases caused by defective or abnormal genes. Therefore, gene therapy has great practical significance in studying the treatment of persistent or latent HIV-1 infection. At present, the existing methods of gene therapy have some major defects such as limited target site recognition and high frequency of off-targets. The latest re-

收稿日期: 2015-06-19; 修回日期: 2015-09-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)(编号: 2013CB835304), 全国海洋公益项目(编号: 201305016), 国家自然科学基金项目(编号: 31170353, 31202020, 31271323)和大连市科技计划(编号: 2013E11SF056)资助[Supported by grants from the National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (No. 2013CB835304), the National Marine Public Projects (No. 201305016), the National Natural Science Foundation of China (General Program) (Nos. 31170353, 31202020, 31271323), and Dalian Science and Technology Program (No. 2013E11SF056)]

作者简介: 韩英伦, 讲师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: hanyinglun@163.com

通讯作者: 李庆伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: liqw@263.net

DOI: 10.16288/j.yczs.15-284

网络出版时间: 2015-12-4 13:47:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20151204.1347.007.html>

search showed that the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR-associated nuclease 9 (Cas9) system from bacteria and archaea has been successfully reformed to a targeted genome editing tool. Thus, how to achieve the goal of treating HIV-1 infection by modifying targeted HIV-1 virus genome effectively using the CRISPR/Cas9 system has become a current research focus. Here we review the latest achievements worldwide and briefly introduce applications of the CRISPR/Cas9 genome editing technology in the treatment of HIV-1 infection, including *CCR5* gene editing, removal of HIV-1 virus and activation of HIV-1 virus, in order to provide reference for the prevention and treatment of HIV-1 infection.

Keywords: CRISPR /Cas9; Human immunodeficiency virus; genome editing

艾滋病又称获得性免疫缺陷综合征(Acquired immune deficiency syndrome, AIDS),是感染人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)导致的传染性疾病^[1]。艾滋病病毒 HIV 包含 HIV-1 型和 HIV-2 型两种类型。HIV-1 型病毒是引起艾滋病的主要病原,因此艾滋病的预防与治疗主要是针对 HIV-1 型艾滋病病毒^[2]。HIV-1 的感染效率与其他病毒感染相比较慢,大致可以分为 3 个时期即形成感染期、局部扩散期和全身播散期^[3]。根据 HIV-1 的感染特性,目前在临床上比较常用的治疗手段为高效抗逆转录病毒疗法(Highly active antiretroviral treatment, HAART),该方法虽然能显著改善患者病发症状,但是仍然存在大量弊端。首先,患者终身用药易产生对治疗药物的耐受,并且药物治疗只能抑制病毒复制并不能清除病毒,而一旦药物治疗失效就会产生耐药性病毒株导致患者死亡;其次,长期用药会产生较大毒副作用并能够破坏患者的心脑血管系统甚至产生肝脏衰竭现象;最后,高昂的治疗费用也会使普通患者难以承受^[4,5]。鉴于 HAART 的上述局限性,近年新兴的基因治疗技术被渐渐推广。目前,治疗 HIV-1 型艾滋病的基因治疗手段主要包括基于 RNA 的基因治疗、基于基因产物(蛋白质)的基因治疗、CD4⁺T 细胞基因治疗以及造血干细胞基因治疗等。基因治疗的临床效果虽然已经被证实,但是在技术和应用上仍然存在一些亟待解决的问题:(1)无论采用何种基因治疗技术都不可避免地产生一定的脱靶几率;(2)基因治疗对 HIV-1 病毒基因的高效性与专一性问题;(3)基因治疗药物是否会对患者产生毒性以及免疫原性;(4)基因治疗所需的高昂费用等^[6,7]。因此,研发一种可在较短时间内能够抑制病毒复制、预防病毒感染、对机体毒副作用小、费用低廉的新型治疗手段将会成为全球医疗科

研工作者的主要研究目标之一。

随着基因组测序技术的成熟以及模式生物全基因组数据被不断解析,利用基因编辑技术对 HIV-1 进行治疗已经成为可能。锌指核糖核酸酶(Zinc-finger nuclease, ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(Transcription activator-like effector nuclease, TALEN)为目前较为广泛应用的基因组编辑技术。ZFN 和 TALEN 均由 DNA 结合结构域和 *Fok I* 核酸内切酶切割结构域两部分组成,DNA 结合结构域可以促使 ZFN 或 TALEN 与靶向 DNA 特异性的结合,当 ZFN 或 TALEN 与 DNA 结合后 *Fok I* 即可对目标 DNA 双链进行切割,受损后的 DNA 能够通过非同源末端连接(Non-homology ending joining, NHEJ)和同源重组(Homology directed recombination, HDR)的方式进行修复,进而完成对靶基因的编辑^[8~10]。近年来,ZFN 和 TALEN 在艾滋病预防与治疗方面已经得到了广泛应用。Christy 等^[11]运用 TALEN 技术在体外对 HIV-1 原病毒 DNA 的反式激活效应元件(Transactivation response element, TAR)进行识别与切割进而彻底清除 HIV-1 原病毒 DNA。Lin 等^[12]成功应用 TALEN 技术得到了缺失 32 bp 的 C-C 趋化因子受体类型 5(*CCR5A32*)基因纯合子的诱导性多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPSCs),这种干细胞无论是在体内或者体外均具有较强抵御 HIV-1 病毒感染的能力。Yi 等^[13]同样发现经 ZFN 编辑后含有 *CCR5A32* 的 CD4⁺T 细胞具有较强抵御 HIV-1 侵袭的能力。Ru 等^[14]还对 ZFN 和 TALEN 进行了改良得到了 TAT-ZFN 和 TAT-TALEN,TAT-ZFN 和 TAT-TALEN 的靶位点依然为 *CCR5*,并且较改造之前具有更强的透过细胞的能力。目前,ZFN 和 TALEN 在 HIV-1 预防与治疗方面虽然存在诸多优势,但是同样存在很多问题,如这两种编辑工具识别靶向位点有限、

识别模块构建复杂、体外合成费用高以及脱靶几率大等。最近研究发现,成簇的规律性间隔短回文重复序列及其相关系统(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9)作为一种新型基因组编辑技术具有制备简单、靶向性强、成本低和脱靶率低等诸多优势^[15~18],已经被应用于疱疹病毒和乙型肝炎病毒等的临床治疗。本文主要综述了 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在 HIV-1 感染治疗中的应用。

1 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术

CRISPR 于 20 世纪 90 年代最早在细菌中被发现,它能够识别并结合许多病毒或质粒 DNA,从而将入侵噬菌体和质粒 DNA 的片段整合到 CRISPR 中,并利用相应的 CRISPR RNAs(crRNAs)来指导同源序列的降解,因此其被定义为细菌抵御外源病原体入侵的一套特异性防御系统^[9,10]。2012 年,人们发现经过“改造”后的 CRISPR 包含一个 sgRNA(Single guide RNA)和一个来源于酿脓链球菌(*Streptococcus pyo-*

genes)的 Cas9 核酸酶(图 1),能够识别来源于不同物种的任何 DNA 序列,进而实现对外源入侵质粒或者噬菌体 DNA 进行平末端切割^[15~18]。Cas9 对 DNA 靶位点进行有效准确地切割主要是依靠由 17~20 nt 组成的 sgRNA 发挥“引导”作用。经 Cas9 切割后 DNA 序列利用细胞 NHEJ 或 HDR 机制对断裂的 DNA 进行插入缺失、修复或者替换^[19,20](图 1)。

目前,CRISPR/Cas9 作为一种新的基因组编辑技术已经在诸多因病毒感染的疾病治疗过程中发挥重要作用。乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是一种 DNA 病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae),HBV 对药物的抵抗力较强并且在我国感染率极高。Lin 等^[21]发现 CRISPR/Cas9 技术可以在体内、体外对 HBV 基因组 DNA 进行有效切割,进而明显抑制 HBV 核心蛋白和表面蛋白的表达,从而达到清除 HBV 的目的。人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)属于乳头瘤病毒科的乳头瘤病毒属,是一种球形无包膜的双链 DNA 病毒,能够加大宫颈癌的发病几率。Zhen 等^[22]发现 CRISPR/Cas9 在体外可以靶向性地作用于 HPV 的 E6 和 E7 的启动子区,继而有效

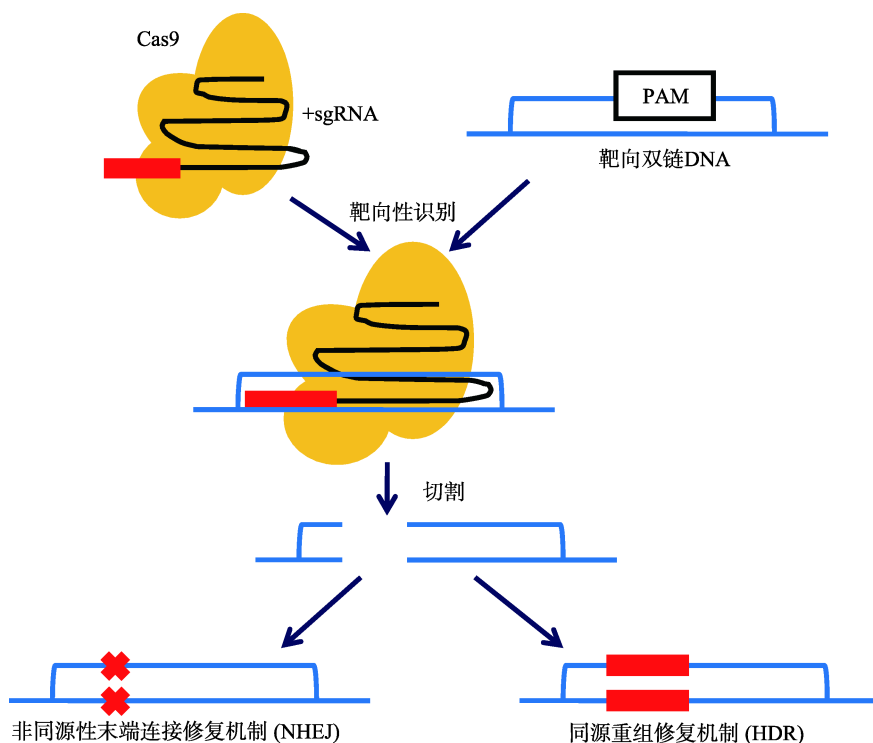


图 1 CRISPR/Cas9 靶向识别和切割机制

Fig. 1 Mechanisms of CRISPR/Cas9-directed recognition and cleavage

参考文献^[1]修改绘制。

抑制 E6 和 E7 表达的同时促进 p53 和 p21 的积累,从而降低了宫颈癌细胞在体外的增殖能力,因此 CRISPR/Cas9 为 HPV 引发的宫颈癌治疗提供了新的医疗手段。EB 病毒(Epstein-barr virus, EBV)又称人类疱疹病毒 4 型,是一种能够诱使生物体产生肿瘤的双链 DNA 病毒,目前对于 EBV 还没有行之有效的疫苗和治疗药物。Wang 等^[23]利用 CRISPR/Cas9 技术在体外对 EBV 基因组进行靶向编辑,结果表明 CRISPR/Cas9 技术可以有效减少 EBV 的病毒滴度,显著降低了 EBV 引起的成瘤效应,这一结果表明 CRISPR/Cas9 可以作为一种新的治疗手段应用于 EBV 的预防与治疗。

2 CRISPR/Cas9 技术在 HIV-1 治疗中的应用

目前,CRISPR/Cas9 技术在 HIV-1 治疗过程中能够通过靶向编辑 *CCR5* 基因座位、直接或间接清除 HIV-1 原病毒等方式最终实现将患者体内 HIV-1

彻底根除(图 2)。

2.1 CRISPR/Cas9 靶向编辑 *CCR5* 基因座位

HIV-1 侵染 CD4⁺T 细胞表面时需要与细胞表面的 CD4⁺受体和 CCR5/CXCR4 共受体结合^[24],如果纯合子个体 *CCR5* 基因缺失 32 bp 碱基后(*CCR5*Δ32)既具备天然抵御 R5-tropic HIV-1 的能力。因此,美国辉瑞公司(Maraviroc)研制的 *CCR5* 拮抗剂可以有效阻断 HIV-1 与 *CCR5* 结合,继而有效防止 CD4⁺T 细胞感染 HIV-1^[25,26]。已有成功案例表明向 HIV 阳性患者异体移植 *CCR5*Δ32 造血干细胞能够彻底清除 HIV-1^[27]。但是这一治疗手段很难被推广,主要由于携带纯合子 *CCR5*Δ32 基因的人群数量极少,并且寻找到主要组织相容性复合体匹配的“捐赠”者更是困难,而且目前骨髓移植成功率较低^[28,29]。同时,辉瑞公司研制的 *CCR5* 拮抗剂价格昂贵并且药物作用时间短。因此,鉴于 HIV-1 原病毒长期潜伏于宿主细胞且很难被清除的特性,以及纯合子 *CCR5*Δ32 基因个体具备天然抵御 R5-tropic HIV-1 能力的特点。

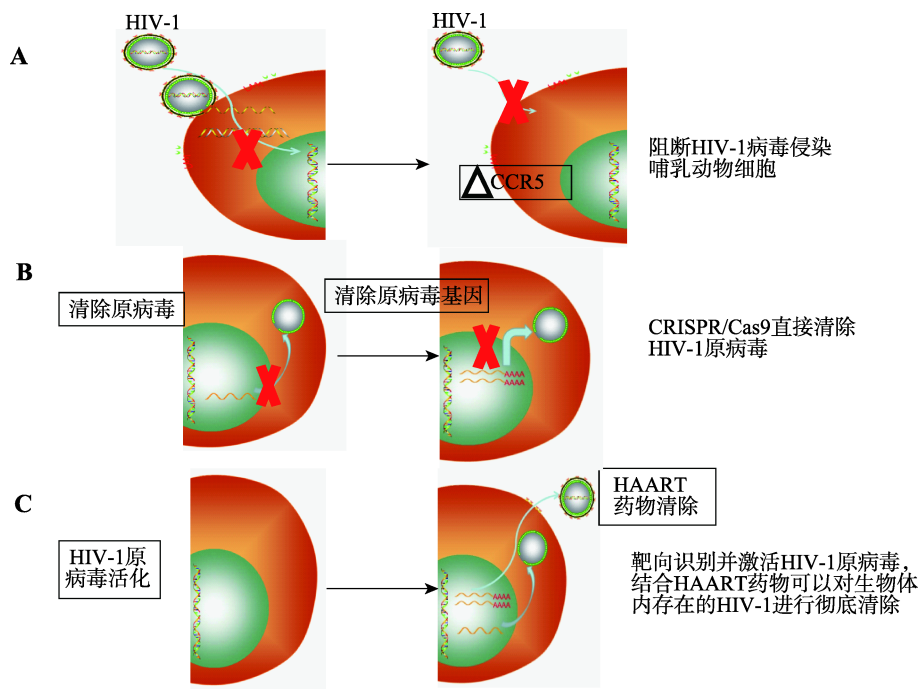


图 2 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术针对 HIV-1 感染疾病的不同治疗策略

Fig. 2 Different therapeutic approaches against HIV using CRISPR/Cas9 gene editing technology

A: CRISPR/Cas9 能够改造哺乳动物造血干细胞产生 *CCR5*Δ32 突变型干细胞,进而阻止 HIV-1 侵染细胞;B: CRISPR/Cas9 能够靶向作用于 HIV-1 原病毒 LTR 区,进而直接清除存在于哺乳动物体内的 HIV-1 原病毒;C: CRISPR/Cas9 能够靶向识别并且激活存在于动物体内的 HIV-1 原病毒,结合 HAART 药物最终对 HIV-1 彻底清除。参考文献^[1]修改绘制。

Holt 等^[30]已经成功将 *CCR5*-specific ZFN 转入 $CD34^+$ 造血干细胞与 $CD4^+$ T 细胞后, 将这两种细胞“种植”于小鼠体内随即利用 HIV-1 感染小鼠, 结果显示 $\Delta CCR5$ 细胞表现出较强的抵御 HIV-1 病毒的能力, 并且经过基因编辑后的小鼠明显较未处理的小鼠存活时间增长。在临床研究方面, Tebas 等^[31]利用腺病毒载体在体外将 *CCR5*-specific ZFN 导入来源于 14 名 HIV-1 患者的 $CD4^+$ T 细胞, 随即将 *CCR5*-specific ZFN $CD4^+$ T 细胞分别“注入”相应患者体内。跟踪检测结果显示, 42 个月之后经基因修饰的 T 细胞依然能够在患者体内存在, 并且患者体内的 HIV-1 呈明显减少趋势。因此, 利用基因治疗手段诱使 *CCR5* 基因突变的方法在临床上治疗 HIV-1 拥有相当大的应用前景。

CRISPR/Cas9 诱使 *CCR5* 基因突变的能力强于 ZFN 和 TALEN 技术, 主要是由于单链 sgRNA 更容易对 *CCR5* 基因进行识别, 并且具有更强地靶向识别特异性。Cho 等^[32]将含有靶向结合 *CCR5* 的 sgRNA 和 Cas9 的真核表达质粒转染入 $CD4^+$ T 细胞后发现 CRISPR/Cas9 对 *CCR5* 基因具有较强的抑制活性。Ye 等^[12]将 TALEN 与 CRISPR/Cas9 协同导入 piggyBac 转座子能够分泌并产生 *CCR5* $\Delta 32$ 缺失的 iPSCs。经基因修饰的 iPSCs 能够分泌出具有天然抵御 HIV-1 能力的单核细胞和巨噬细胞。Wang 等^[33]将偶联 *CCR5* 靶向 sgRNAs 的 Cas9 利用慢病毒载体直接转入经改造后的 $CD4^+$ T 细胞后发现, *CCR5* 基因依然能够在 T 细胞系中稳定表达并能够产生强烈的细胞毒副作用。其原因在于 *CCR5* 基因座位与 *CCR2* 基因座位较近, *CCR5* 靶向 sgRNAs 脱靶后极有可能与 *CCR2* 结合, *CCR2* 失活后不能抵御外源 DNA 入侵, 所以产生较强的细胞毒性。因此, 利用 CRISPR/Cas9 靶向编辑 *CCR5* 基因座位的方法治疗 HIV-1 还需要对 CRISPR/Cas9 进行进一步“改造”来减少脱靶几率。

2.2 CRISPR/Cas9 直接清除 HIV-1 原病毒

目前, HAART 治疗艾滋病的弊端在于无法清除终生伴随患者的 HIV-1 原病毒。Siliciano 等^[34-36]发现在 HIV-1 患者持续接受 HAART 药物治疗 60 年之后, 在患者 $CD4^+$ T 细胞中仍然能够检测到 HIV-1 原病毒的存在。因此, 需要新的治疗方法直接作用于 HIV-1 原病毒基因靶点清除原病毒。

为了能够直接灭活或删除 HIV-1 原病毒 DNA, Hauber 等^[37-39]设计了一种命名为 Tre-recombinases 的核酸酶, 这种核酸酶在体外能够作用于原病毒 LTR (Long terminal repeat) 区进而达到灭活原病毒的目的。此外, Buchholz 等^[38]还发现 Tre-recombinases 被整合到慢病毒载体后能够有效进入 $CD4^+$ T 细胞和 $CD33^+$ 造血干细胞中, 直接作用于原病毒 LTR 区的 TAR (Transactivation response element) 序列, 继而对原病毒进行灭活, 并且整个过程基本不对宿主细胞产生任何毒副作用。Qu 等^[40]同时发现, 经过定向改造后的 ZEN 同样能够作用于 HIV-1 原病毒 LTR 区的 TAR 序列, 最终达到彻底清除 HIV-1 原病毒的目的。目前, Tre-recombinases 和 ZEN 遇到的共同问题是操作复杂与费用昂贵。

Ebina 等^[41,42]近期发现 CRISPR/Cas9 基因编辑技术能够有效利用其 sgRNAs 靶向作用于 HIV-1 原病毒 LTR 区, 对 HIV-1 原病毒进行有效清除。他们还发现在感染 HIV-1 的细胞中使用携带 2 个 sgRNAs 的 CRISPR/Cas9 系统可以明显抑制病毒复制与再生效率, 并且证明 CRISPR/Cas9 可以识别病毒基因组的多个位点。此外, Ebina 等^[42]通过大量实验表明, CRISPR/Cas9 在清除小神经胶质和 T 细胞系 HIV-1 原病毒的过程中, 伴随着抑制病毒基因引起的 TNF- α 、HDAC 等的活化反应, 从而能够抵抗 HIV-1 病毒的再次感染。同时, CRISPR/Cas9 能够在细胞中长期“共存”不被细胞所降解清除, 从而使细胞免受 HIV-1 侵袭。Belmonte 等^[43]发现 Cas9 被导入人源造血干细胞, 造血干细胞能够分化成正常并且具有抗 HIV-1 活性的单核细胞和巨噬细胞。这些发现都为 CRISPR/Cas9 技术能够真正应用于临床治疗积累了大量的实验数据。

2.3 CRISPR/Cas9 介导活化 HIV-1 原病毒

在 Ebina 等^[41,42]发现 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以直接清除 HIV-1 原病毒的同时, Konermann 等^[1]提出经过“改造后”的 CRISPR/Cas9 可以作为一种协同药物, 协同 HAART 药物彻底根除 HIV-1。截止到目前, 临床上治疗 HIV-1 感染后正处于“潜伏”期患者的主要方法为诱使 HIV-1 原病毒活化, 活化后的 HIV-1 能够进行病毒复制, 进而直接侵染宿主细胞和免疫系统, 随后利用 HAART 药物对活化的

HIV-1 进行彻底清除。但是,该治疗方法存在相当大的弊端在于 HAART 药物对 HIV-1 原病毒不具有靶向性,因此无法确定处于“潜伏”期细胞中 HIV-1 原病毒的数量以及是否被彻底激活并被清除^[44,45]。近期, Siliciano 等^[46]提出哺乳细胞中存在处于“潜伏”期 HIV-1 原病毒的数量远远超出最初的预计值,所以利用目前常规方法很难将 HIV-1 原病毒彻底根除。因此,临床上急需寻找一种靶向性激活 HIV-1 原病毒,并结合 HAART 最终根除 HIV-1 的药物。

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术经“改造”后可以靶向识别 HIV-1 原病毒,并能够有效激活 HIV-1。“改造”后的 CRISPR/Cas9 包含一个失活的 Cas9 (dCas9)、sgRNA 和一个疱疹病毒转录激活结构域(VP16)或者 4 个疱疹病毒转录激活结构域(VP64)。VP16 和 VP64 能够显著提高靶基因的表达效率。经过“改造”后的 CRISPR/Cas9 识别靶基因的能力得到显著增强^[47]。随后, Maeder 等^[48]对这一技术进行了进一步完善,他们在 dCas9 上添加了多个非重叠并针对同一启动子的 sgRNAs,同时添加了多拷贝的 dCas9-VP64 融合蛋白质。dCas9-VP64 融合蛋白质与命名为 SunTag 的多肽支架结合,通过 SunTag 可以大量招募来源不同的抗体融合蛋白质,进而将这些抗体融合蛋白质连接于 dCas9 的启动子区域。Konermann 等^[49]对 dCas9 与 sgRNAs 进行互作晶体解析后发现,将 sgRNAs 与经过修饰的配体结合能够促进 dCas9 招募疱疹病毒转录激活结构域。随后, Konermann 等^[49]运用一个短的能够与 RNA 结合的短发卡核酸适配子与以二聚体形式存在的 MS2 噬菌体外壳蛋白结合,进而形成了一个协同 dCas9 招募疱疹病毒转录激活结构域的激活调节系统,以期提高 CRISPR/Cas9 对 HIV-1 原病毒的识别与活化效率。因此,经过“改造”后的 CRISPR/Cas9 可以利用其 sgRNA 靶向识别 HIV-1 原病毒 5' LTR 启动子区的转录起始位点 (Transcriptional start site, TSS), TSS 上游-200 bp 至 +1 bp 为 sgRNA 识别的“hotspots”区域,继而可以完全激活 HIV-1 原病毒,然后利用 HAART 药物完成对 HIV-1 的彻底清除^[49,50]。

3 展 望

CRISPR/Cas9 基因组编辑技术能够方便、快捷

地对目的基因组进行有效编辑。在人类疾病治疗上, CRISPR/Cas9 技术的出现为 HIV-1、癌症等难以攻克 的疾病治疗方面提供了新的医疗手段。对 HIV-1 型 艾滋病的治疗, CRISPR/Cas9 技术通过改造哺乳动 物造血干细胞产生 CCR5Δ32 突变型干细胞,实现阻 断 HIV-1 病毒侵染哺乳动物细胞; CRISPR/Cas9 还 能够靶向作用于 HIV-1 原病毒 LTR 区,进而彻底清 除存在于哺乳动物体内的 HIV-1 原病毒;同时, CRISPR/Cas9 基因组编辑技术可以经“改造”后靶向 识别并激活 HIV-1 原病毒,结合 HAART 药物对生 物体内存在的 HIV-1 彻底清除(图 2)。目前, CRISPR/Cas9 对 HIV-1 的治疗还只限于理论研究层 面,并没有真正应用于临床治疗,而且 CRISPR/Cas9 的安全性及稳定性仍需要进一步鉴定,sgRNAs 的脱 靶原因及脱靶率需要深入分析,安全、快速、有效 地将 CRISPR/Cas9 转入细胞内所选择载体需要反复 斟酌。尽管如此, CRISPR/Cas9 终将在未来彻底根 除 HIV/AIDS 过程中发挥不可替代的作用。

致 谢

诚挚地感谢辽宁师范大学生命科学学院刘欣教 授在文章修改过程中给予的帮助。

参考文献(References):

- [1] Saayman S, Ali SA, Morris KV, Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(6): 819-830. [DOI]
- [2] Yin LJ, Hu SQ, Guo F. The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(5): 412-418.
殷利眷, 胡斯奇, 郭斐. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在病毒感染疾病治疗中的应用. *遗传*, 2015, 37(5): 412-418. [DOI]
- [3] Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405. [DOI]
- [4] Cai M, Yang Y. Targeted genome editing tools for disease modeling and gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(1): 2-9. [DOI]
- [5] DiGiusto DL, Krishnan A, Li LJ, Li HT, Li S, Rao A, Mi S, Yam P, Stinson S, Kalos M, Alvarnas J, Lacey SF, Yee JK, Li MJ, Couture L, Hsu D, Forman SJ, Rossi JJ, Zaia JA. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34⁺ cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci Transl Med*,

- 2010, 2(36): 36RA43. [DOI]
- [6] Hao YZ, Teng ZP, Zeng Y. HIV gene therapy overview and the latest developments. *Chinese J Exp Clin Virol*, 2013, 27(2): 156–158.
郝彦哲, 滕智平, 曾毅. HIV 基因治疗概况及最新进展. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27(2): 156–158. [DOI]
- [7] Tian YR, Jiao YM, Zhang T, Wu H. Recent progress in the gene therapies against HIV-1. *J Cap Med Univ*, 2014, 35(1): 101–107.
田雅茹, 焦艳梅, 张彤, 吴昊. 抗 HIV-1 基因治疗新进展. *首都医科大学学报*, 2014, 35(1): 101–107. [DOI]
- [8] Chung J, Scherer LJ, Gu A, Gardner AM, Torres-Coronado M, Epps EW, DiGiusto DL, Rossi JJ. Optimized lentiviral vectors for HIV gene therapy: multiplexed expression of small RNAs and inclusion of MGMT^{P140K} drug resistance gene. *Mol Ther*, 2014, 22(5): 952–963. [DOI]
- [9] Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733–740. [DOI]
- [10] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174–182. [DOI]
- [11] Strong CL, Guerra HP, Mathew KR, Roy N, Simpson LR, Schiller MR. Damaging the integrated HIV proviral DNA with TALENs. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125652. [DOI]
- [12] Ye L, Wang JM, Beyer AI, Teque F, Cradick TJ, Qi ZX, Chang JC, Bao G, Muench MO, Yu JW, Levy JA, Kan YW. 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): 9591–9596. [DOI]
- [13] Yi G, Choi JG, Bharaj P, Abraham S, Dang Y, Kafri T, Alozie O, Manjunath MN, Shankar P. CCR5 gene editing of resting CD4⁺ T cells by transient ZFN expression from HIV envelope pseudotyped nonintegrating lentivirus confers HIV-1 resistance in humanized mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e198. [DOI]
- [14] Ru RN, Yao YC, Yu SL, Yin BP, Xu WW, Zhao ST, Qin L, Chen XP. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells by penetrating TALENs. *Cell Regen (Lond)*, 2013, 2(1): 5. [DOI]
- [15] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [16] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [17] Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*, 2013, 2: e00471. [DOI]
- [18] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826. [DOI]
- [19] Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu ZR, Brar GA, Torres SE, Stern-Ginossar N, Brandman O, Whitehead EH, Doudna JA, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 2013, 154(2): 442–451. [DOI]
- [20] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173–1183. [DOI]
- [21] Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates *in vivo*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e186. [DOI]
- [22] Zhen S, Hua L, Takahashi Y, Narita S, Liu YH, Li Y. *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. [DOI]
- [23] Wang JB, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(36): 13157–13162. [DOI]
- [24] Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1α, and MIP-1β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*, 1995, 270(5243): 1811–1815. [DOI]
- [25] Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med*, 1997, 3(3): 252–253. [DOI]
- [26] Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müssig A, Allers K, Schneider T, Hofmann J, Kücherer C, Blau O, Blau IW, Hofmann WK, Thiel E. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N Engl J Med*, 2009, 360(7): 692–698. [DOI]
- [27] Hütter G, Thiel E. Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient no.2. *AIDS*, 2011, 25(2): 273–274. [DOI]
- [28] Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*, 1997, 3(3): 338–340. [DOI]
- [29] Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial back-

- ground, and quantified risk. *Mol Med*, 1997, 3(1): 23–36. [DOI]
- [30] Holt N, Wang JB, Kim K, Friedman G, Wang XC, Taupin V, Crooks GM, Kohn DB, Gregory PD, Holmes MC, Cannon PM. Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(8): 839–847. [DOI]
- [31] Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang WT, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*, 2014, 370(10): 901–910. [DOI]
- [32] Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 230–232. [DOI]
- [33] Wang WM, Ye CBH, Liu JJ, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. 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. [DOI]
- [34] Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu YF, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 977–979. [DOI]
- [35] Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, Thakore PI, Glass KA, Ousterout DG, Leong KW, Guilak F, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 973–976. [DOI]
- [36] Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med*, 2003, 9(6): 727–728. [DOI]
- [37] Sarkar I, Hauber I, Hauber J, Buchholz F. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science*, 2007, 316(5833): 1912–1915. [DOI]
- [38] Buchholz F, Hauber J. *In vitro* evolution and analysis of HIV-1 LTR-specific recombinases. *Methods*, 2011, 53(1): 102–109. [DOI]
- [39] Mariyanna L, Priyadarshini P, Hofmann-Sieber H, Krepstakies M, Walz N, Grundhoff A, Buchholz F, Hildt E, Hauber J. Excision of HIV-1 proviral DNA by recombinant cell permeable tre-recombinase. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31576. [DOI]
- [40] Qu XY, Wang PF, Ding DL, Li L, Wang HB, Ma L, Zhou X, Liu SH, Lin SG, Wang XH, Zhang GM, Liu SJ, Liu L, Wang JH, Zhang F, Lu DR, Zhu HZ. Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(16): 7771–7782. [DOI]
- [41] Hu WH, Kaminski R, Yang F, Zhang YG, Cosentino L, Li F, Luo B, Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Karn J, Mo XM, Khalili K. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461–11466. [DOI]
- [42] Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep*, 2013, 3: 2510. [DOI]
- [43] Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, Suzuki K, Xu R, Hishida T, Chang CJ, Esteban CR, Young J, Izpisua Belmonte JC. Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun*, 2015, 6: 6413. [DOI]
- [44] Shirakawa K, Chavez L, Hakre S, Calvanese V, Verdin E. Reactivation of latent HIV by histone deacetylase inhibitors. *Trends Microbiol*, 2013, 21(6): 277–285. [DOI]
- [45] Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, Crooks AM, Parker DC, Anderson EM, Kearney MF, Strain MC, Richman DD, Hudgens MG, Bosch RJ, Coffin JM, Eron JJ, Hazuda DJ, Margolis DM. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature*, 2012, 487(7408): 482–485. [DOI]
- [46] Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, Lai J, Blankson JN, Siliciano JD, Siliciano RF. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*, 2013, 155(3): 540–551. [DOI]
- [47] Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, Yang LH, Church GM. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 833–838. [DOI]
- [48] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, Vale RD. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159(3): 635–646. [DOI]
- [49] Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517(7536): 583–588. [DOI]
- [50] Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, Villalta JE, Chen YW, Whitehead EH, Guimaraes C, Panning B, Ploegh HL, Bassik MC, Qi LS, Kampmann M, Weissman JS. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. *Cell*, 2014, 159(3): 647–661. [DOI]