ZFNs 和 TALEs 在艾滋病基因治疗中的价值

王伟大[1],武怡鸥[2*],张 佳[1],廖端芳[3],李 凯[1]
(1. 苏州大学 药学院,江苏 苏州 215123;2. 华医网医学教育中心;3. 湖南中医药大学)

摘 要: 随着对 HIV 病毒研究的深入以及传统治疗手段的局限性,通过基因治疗达到控制甚至治愈艾滋病受到重视。CCR5(趋化因子受体 5)作为 HIV-1 进入人类白细胞的主要受体蛋白之一,其突变型 CCR5Δ32 携带者表现出一定抗 HIV-1 感染能力。本文综述两类基因工程酶 ZFNs 和 TALEs 在艾滋病基因治疗中的应用价值。

关键词: 艾滋病; CCR5; ZFNs; TALEs; 基因治疗
中图分类号:R593.32 **文献标识码:**B **文章编号:**2095-1116(2011)04-0460-03

The Potential of ZFNs and TALEs in Gene Therapy of AIDS

WANG Wei-da, WU Yi-ou, ZHANG Jia, et al
(*College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou, Jiangsu* 215123, *China*)

Abstract: Because of the better understanding of HIV biology and the limitation of conventional anti-HIV vaccine or drug development, gene therapy to HIV infection is a recent focus in AIDS research. Normal CCR5 protein is required for HIV-1 virus to enter human cells. Individuals with the mutant genotype of CCR5Δ32 are relatively resistant to HIV-1 infection. This paper reviews the application of two engineered enzymes of ZFNs and TENs in the stem cell based gene therapy to HIV-1 infection.

Key words: AIDS; CCR5; ZFNs; TALEs; gene therapy

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)属于逆转录科中的慢病毒属,带有以 RNA 为模板合成 DNA 的逆转录酶,已发现 HIV-1 和 HIV-2 两种亚型。HIV-1 是引起人类获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)的主要病原体,2002 年至今已有近 2 000 万人死于艾滋病。HIV 主要攻击辅助性 T 淋巴细胞,使被感染的细胞丧失功能或死亡,导致免疫系统紊乱和免疫缺陷。

1 CCR5 突变与 HIV-1 感染

由于 HIV 病毒的高度变异性,使疫苗研究进展缓慢和长期用药时可能出现耐药现象。因此,医学界近年开始关注 HIV 感染宿主细胞过程中不同环节的细胞因子,希望通过改变细胞因子活性而干扰 HIV 病毒的繁殖。通过采用反义核苷酸技术、siRNA 沉默技术、内抗体、基因敲除等生物技术,已确认多种参与 HIV 感染的细胞因子[1],其中尤以对 CCR5 基因研究最为广泛和深入。CCR5 基因编码的细胞膜蛋白属于 G 蛋白偶联受体蛋白家族的成员,主要在 T 细胞、巨噬细胞、树状突细胞等细胞类型表达,是 HIV-1 入侵机体细胞的主要辅助受体之一。1996 年 6 月,《Science》和《Nature》同时发表文章[2,3],表明 CCR5 是细胞膜上单核巨噬细胞亲和性的 HIV-1 的辅助受体。CCR5 具有多种变异体,其中 CCR5Δ32(缺失 32 个碱基对)突变型基因编码无生物活性的蛋白受体而干扰 HIV 进入宿主细胞,表现出一定的抗 HIV 感染能力。大量流行病学资料和实验数据表明,CCR5Δ32 突变型基因纯合子抗性

收稿日期:2011-05-16
通讯作者:李凯,电话:0512-65882091,E-mail:kaili34@yahoo.com.
*:同为第一作者.

大于杂合子。因此,通过遗传学手段干扰 CCR5 表达或表达出无生物活性的蛋白质以抑制或延缓 HIV 入侵宿主细胞,为艾滋病防治的一条新思路[4]。

2 基因工程酶在基因治疗中的应用价值

目前可用于 CCR5 基因体外改造的有效酶类主要为锌指蛋白或转录激活因子样效应子等与核酸酶 FokI 的催化结构域相结合所构成的杂合酶蛋白。人体细胞基因同源重组效率较低,保证了遗传的稳定性但同时也限制了体外基因改造的效率。虽然干细胞和骨髓移植已有效用于白血病的治疗,但利用造血干细胞基因工程改造治疗的基因治疗仍进展缓慢。近年来,通过利用锌指蛋白或转录激活因子样效应子等与核酸酶 FokI 的催化结构域相结合所构成的杂合酶蛋白,具有对从低等到高等细胞基因组进行特异切割的效应。这种对基因组 DNA 的特异性切割,能使细胞的同源重组和异源重组效率增加数百倍至数千倍,为干细胞的体外基因工程改造,包括基因突变和基因敲入或敲除提供了实用化的工具。

锌指蛋白核酸酶(zinc finger nucleases,ZFNs)是一类经人工改造的核酸内切酶,由两部分组成,包括一个 DNA 结合域和限制性内切酶 Fok1 酶切区域。DNA 结合域通常由 3 ~4 个锌指蛋白串联而成,锌指蛋白为可识别靶 DNA 序列的蛋白结构域,因能够络合一个锌离子而得名。每个锌指蛋白可特异性识别并结合三联体碱基,多个锌指蛋白串联则可识别一段特异性碱基序列并与之结合,限制性内切酶则发挥其剪切功能,在 DNA 结合区域进行定点切割,形成双链定点断裂。在真核细胞中,当形成双链断裂后,细胞通过定向同源重组或(accurate homologous recombination)或非同源末端链接(non-homologous end joining)修复机制重新形成 DNA 双链结构。因此,在引入外源基因的条件下,利用锌指蛋白核酸酶则可实现高效定向同源重组目的[5]。利用锌指蛋白核酸酶技术,还可为定点突变以及基因沉默等领域提供更方便、更有效的技术支持。目前锌指蛋白核酸酶技术已广泛应用于转基因技术、基因治疗等领域[6,7]。

ZFNs 与 DNA 的识别特异性和亲和力是检验其工作效率的重要指标。ZFNs 识别序列越长,其特异性也相应增加,然而 Yuka Shimizu 等人的实验结果证明,ZFNs 的锌指蛋白数量与其切割效率密切相关,当锌指蛋白数量为 3 ~4 个时,ZFNs 活性最优,而当锌指蛋白串联数量增加至 5 ~6 个时,ZFNs 的切割效率显著降低,但并未检测出明显的细胞毒性和抑制 DNA 同源重组以及改变锌指蛋白核酸酶结合序列。由于 ZFNs 对基因组的非特异性识别或亲和力不足产生非特异性切割或切割效率降低,可能导致细胞毒性而限制 ZFNs 的应用。因此,设计并鉴定高特异性、高亲和力的 ZFNs 已成为人们热点研究方向。

3 CCR5-相关干细胞基因治疗现状

CCR5Δ32 突变型基因因具有抗 HIV 感染能力而受到广泛重视。2008 年 Carl H June 等[8]在《Nature biotechnology》报道利用锌指蛋白核酸酶技术将 CCR5Δ32 突变型基因同源重组至 T 淋巴细胞,并通过小鼠实验证明该重组细胞具有一定抗 HIV 感染能力。2010 年,德国学者 Kristina Allers 等[9]在《Blood》报导 1 例利用 CCR5Δ32 基因型骨髓移植治愈一名伴有白血病的 HIV 患者,各项指标均达到临床治愈标准,这是迄今为止唯一报道成功治愈 HIV 患者的案例。有关该病人 HIV 检测转阴的消息,先后于 2009 年在《新英格兰医学杂志》和 2010 年在《血液》等医学期刊和众多新闻媒体报道。针对《血液》杂志的个案报道,在 2011 年 1 月与该文相链接的 e-letter[10]中指出,德国学者的临床研究,证实了本文作者发表于 2005 年《南华大学学报》的治疗方案的异体骨髓移植方案,表明突变 CCR5 基因异体骨髓移植在 HIV 感染治疗中的里程碑意义。

4 展　望

除锌指蛋白酶外,近期有研究发现植物病原体中的一种转录激活子样效应因子(transcription activator-like effector,TALE)表现出 DNA 结合特异性,为科学家研发出更简易的新型基因组靶向修饰技术带来了希望。与 ZFNs 相似的是,TALEs 也是由 12 个或以上特异性识别 DNA 的串联“蛋白模块”和两侧的 N-末端及 C-末端序列组成。每个“蛋白模块”包含 34 个氨基酸,第 12 和 13 位残基是靶向识别的关键位点,被称作重复可变的 di-residues (RVDs)位点。然而不同于每个锌指蛋白识别特异性的三联体碱基,TALEs 上的每个 RVDs 仅能识别一个碱基。尽管已在植物和酵母中证实了 TALEs 的 DNA 特异

性识别特性,然而研究人员一直都未曾在哺乳动物细胞中利用 TALEs 靶向特异的内源基因。近日来自 Sangamo BioSciences 公司和哈佛大学的两个研究小组分别利用 TALEs 技术进行了基因组靶向修饰相关研究,两篇研究论文发表在同一期的《Nature Biotechnology》杂志上[11,12]。由 Edward Rebar 领导的研究小组将带有不同 C-末端 TALE 的截短片段连接到核酸酶 FokI 的催化结构域上。当研究人员将构建的 TALE 核酸酶靶向内源性的人类 NTF3 和 CCR5 基因时,证实 TALE 核酸酶能够特异性地对这些基因片段进行剪切。

上述两类人工重组酶在基因突变、基因敲除和基因敲进等方面的巨大优势,因而在工农业和生物医药中均具有广泛的应用前景。就基于 CCR5 的干细胞基因治疗而言,由于异体骨髓干细胞移植受到含突变型骨髓来源稀少、配对困难和需要长期使用免疫抑制剂等因素的限制,自体造血干细胞体外 CCR5 基因改造成为 HIV-1 感染和艾滋病治疗的更为实用和应用范围更广的新选择。根据目前为数不多的研究报道,TALEs 由于每一单元识别的碱基个数较 ZFNs 短,具有设计简便和相对易于获得位点识别特异性更高的人工重组酶。无论是用于物种改造还是基因治疗,避免上述人工重组酶的非靶点切割,是相关研究中的关键。与至今尚无成功先例的 HIV 疫苗研究相比,新的生物技术的进步和合理运用,必将使有如 HIV 感染之类的不治之症一个又一个得到治愈,从而促进个体化治疗从概念向医疗实践的逐步转化。

参考文献:

[1] Li K, Zhang J, Wu YO, et al. Therapeutic potential of RNA interference against cellular targets of HIV infection [J]. Mol Biotech, 2007, 37: 225-236.

[2] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor[J]. Science, 1996, 272: 872-877.

[3] Samson M, Libea F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection of Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene[J]. Nature, 1996, 382: 722-725.

[4] 陈玲琳,廖端芳,李 凯,等. CCR5 与艾滋病的防治[J]. 南华大学学报(医学版), 2005, 33: 166, 170.

[5] 钟 强,赵书红. 锌指蛋白核酸酶的作用原理及其应用[J]. 遗传, 2011, 33: 123-130.

[6] Whyte JJ, Zhao JG, Wells KV, et al. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs[J]. Mol Reprod Dev, 2011, 78: 2.

[7] Sylwia W, Anna O, Shamim HR, et al. Targeted genome editing in pluripotent stem cells using zinc-finger nucleases[J]. Methods, 2011, 53: 339-346.

[8] Perez EE, Wang JB, June CH, et al. Establishment of HIV-1 resistence in CD4 + T cells by genome editing using zinc finger nucleases [J]. Nature biotechonology, 2008, 26: 808-816.

[9] Kristina Allers, Gero Hütter, Christoph Loddenkemper, et al. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Δ32/Δ32 stem cell transplantation[J]. Blood, 2011, 117: 2791-2799.

[10] Li K, Zhang J, Xiao L, et al. Gene therapy: hope for HIV infection cure[J]. Blood, 2011, 117: 2791-2799doi: 10.1182/blood-2010-09-309591.

[11] Rebar EJ, Miller JC, Tan S, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29: 135-136.

[12] Zhang F, Cong L Lodato S, et al. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29: 149-153.

(此文编辑 蒋湘莲)