【小鼠大学问】体内内源基因调控之CRISPRi与CRISPRa

众所周知，CRISPR/Cas9系统可以用来操纵基因组：规律成簇的间隔短回文重复CRISPR与内切酶Cas9的组合，可以在引导RNA（gRNA）的指引下，靶向基因组中的特定区域并切割DNA，产生DNA双链断裂（DSB）。

自2013年，CRISPR/Cas9系统的应用又得到了更广泛的扩展，我们可以将Cas9带到特定的基因组位点，通过起始或停止转录来调控靶基因，达到激活或抑制基因表达的目的

从“CRISPR编辑”到“CRISPR调节”

实现这种转变的核心仍旧是Cas9，只是编辑基因组需要具有内切酶活性的Cas9蛋白，而调节基因表达时需要催化功能失活的“dead”Cas9 —— dCas9。这种突变（D10A，H840A）的Cas9蛋白虽然不能进行DNA双链的切割，但仍旧可以在gRNA的指导下与特定靶向的DNA紧紧结合。

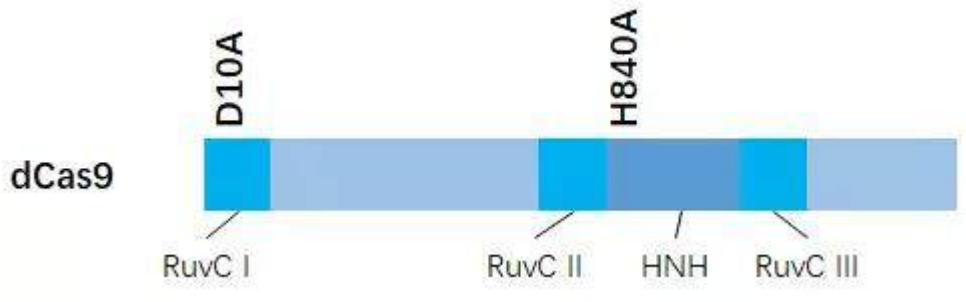


图1. dCas9结构示意图。

当使用dCas9蛋白与不同的效应结构域连接，而gRNA与我们想要抑制或激活的靶基因区域互补时，我们就可以利用CRISPR/Cas9系统来调节靶基因的表达了。

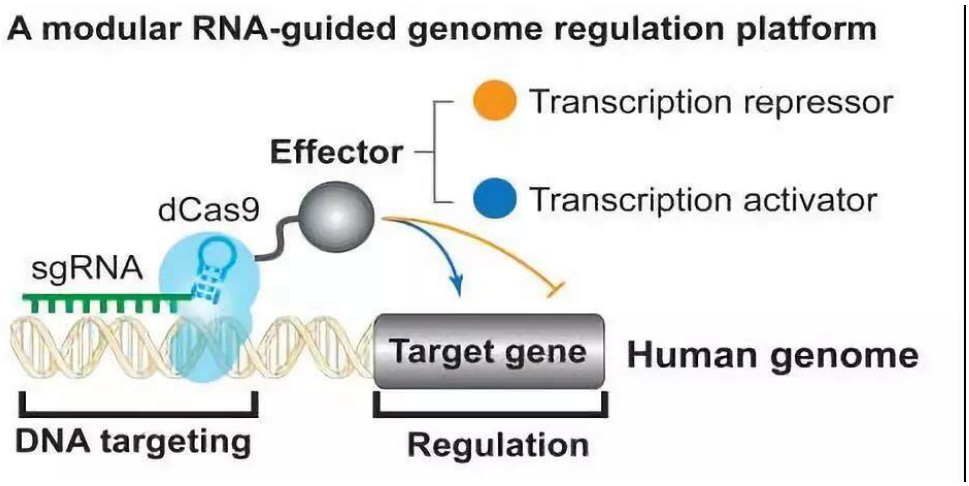
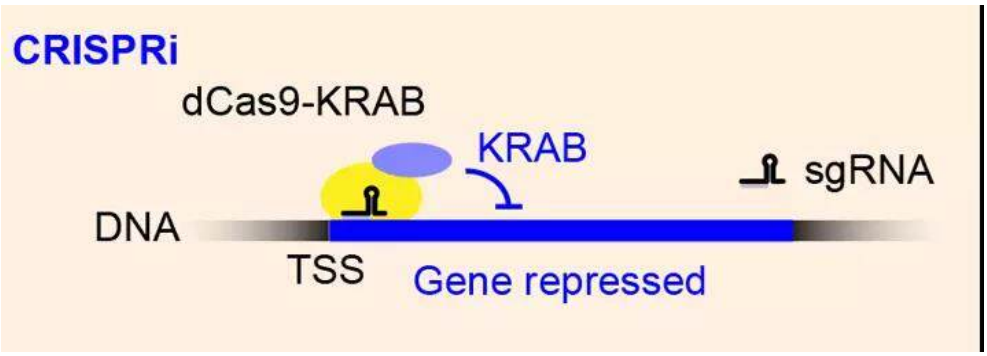


图2. dCas9介导的基因调控系统。图片来自：Cell. 2013 Jul 18; 154(2): 442-451.

CRISPRi

CRISPRi也称为CRISPR干扰 (CRISPR interference or inhibition) 。dCas9与转录抑制子连接，如KRAB（Kruppel associated box），dCas9-KRAB融合蛋白在gRNA指引下，结合到靶基因TSS位点，抑制转录起始，沉默靶基因的表达。



□3. CRISPRi□□□□□□□□□□□: ACS Chem Biol. 2018 Feb 16;13(2):406-416.

CRISPRi 研究案例

dCas9融合KRAB的CRISPRi系统（dCas9-KRAB）在海马神经元中能有效地靶向抑制功能基因的表达，基因沉默水平显著优于传统RNAi技术。

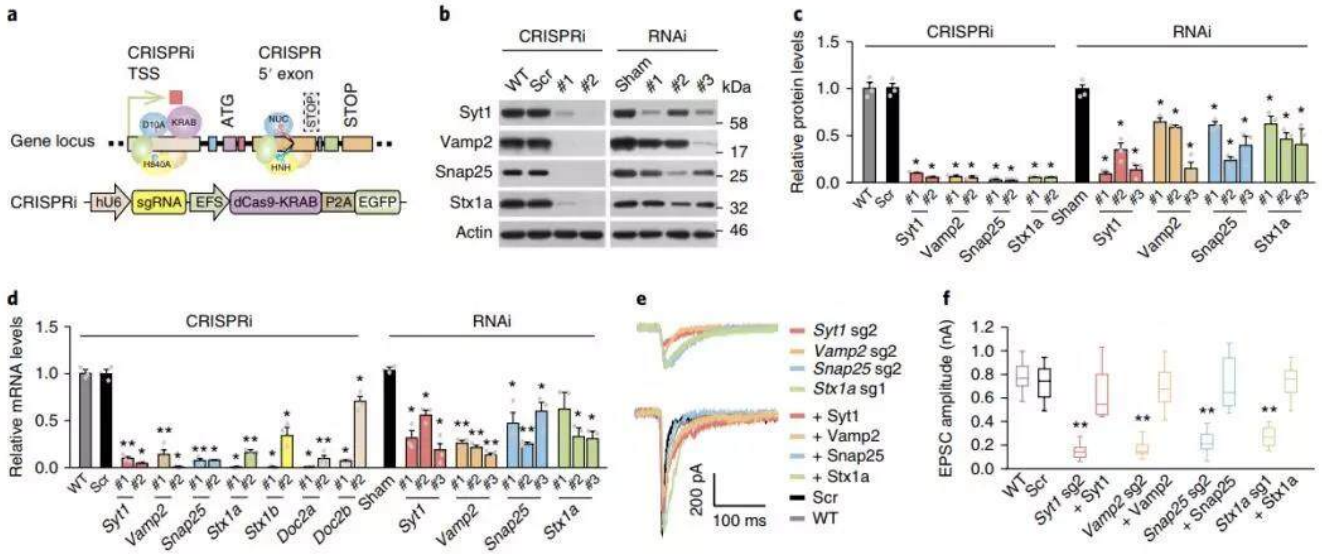


Fig1. CRISPRi efficiently inactivates gene expression in primary neurons.

利用神经元亚群特异性的启动子条件性CRISPRi能精确控制功能基因Syt1在海马齿状回兴奋性和抑制性神经元中丧失功能而不影响Syt1在其它类型细胞中的表达。

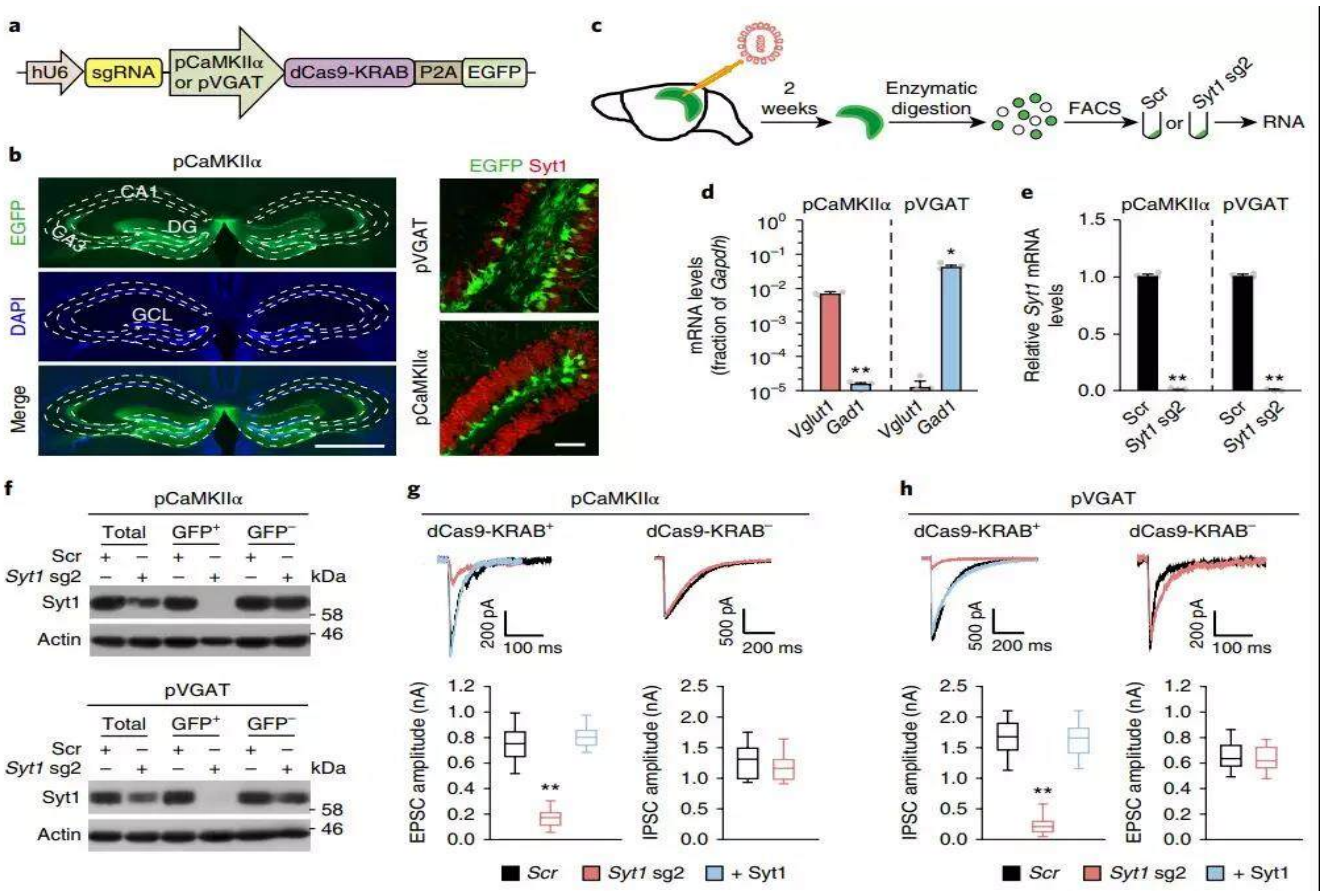


Fig2. CRISPRi-based conditional inactivation of Syt1 shifts the E-I balance of the DG.

针对Syt1及其互作蛋白网络的基因Syb2，Stx1a/b和SNAP25a的多重基因CRISPRi系统能够在小鼠脑内实现灵活多变的多基因不同组合的高效失活。

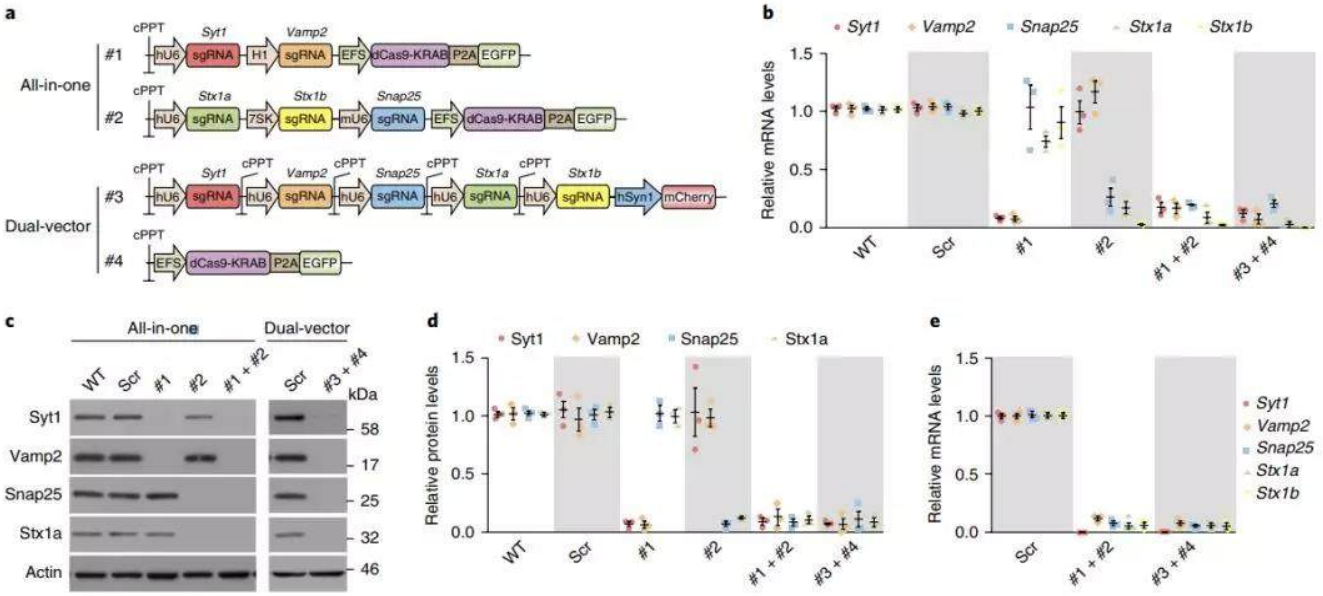


Fig3. Flexible multiplex gene silencing using CRISPRi in the mouse brain.

最新的研究在dCas9-KRAB的基础上进行优化，发现dCas9-KRAB-MeCP2能够更高效地对靶基因表达的抑制。

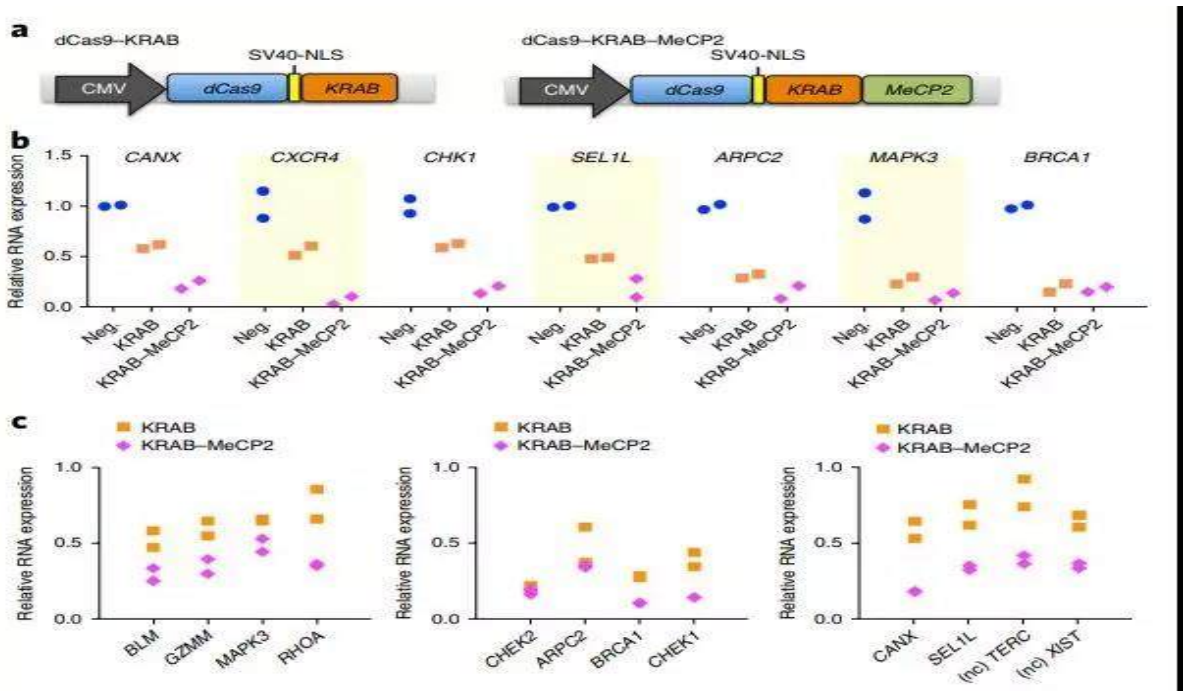


Fig4. Repression of endogenous genes by dCas9-KRAB-MeCP2.

参考文献：

Zheng Y, Shen W, Zhang J, Yang B, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain.Nat Neurosci. 2018 Mar;21(3):447-454.

Yeo NC, Chavez A, Lance-Byrne A, Chan Y，et al. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. Nat Methods. 2018 Jul 16. doi: 10.1038/s41592-018-0048-5.

CRISPRa

CRISPRa也称为CRISPR激活 (CRISPR activation) 。让dCas9与不同的转录激活子结合发挥上调靶基因表达的作用。例如，直接与单个转录激活因子（例如dCas9-VP64或dCas9-VP16）融合表达，不过单转录激活因子对靶基因地激活水平降低。为了更好地提高过表达的水平，可将多个转录激活因子共同招募到靶基因TSS位点：如多拷贝VP64与dCas9的融合、三元转录激活因子VPR（VP64-p65-Rta）融合到dCas9末端。

除了将转录激活因子直接与dCas9融合以外，还可以通过分子挂钩来招募转录激活因子到dCas9周围，如：将SunTag短肽（含多拷贝的GCN4激活招募结构域）与dCas9融合，来招募scFvGCN4-sfGFP-VP64。或利用SAM系统，将MS2发夹结构融合到gRNA上，招募激活辅助蛋白（MS2-p65-HSF1）到dCas9-VP64融合蛋白上，提高激活效率。

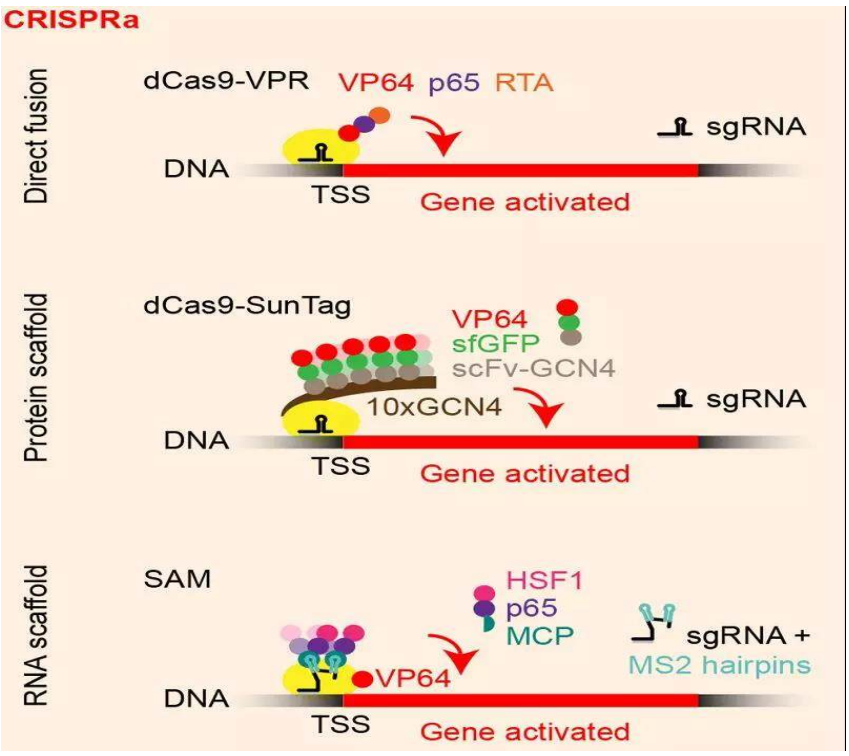


图4. CRISPRa系统示意图。图片来自: ACS Chem Biol. 2018 Feb 16;13(2):406-416.

在今年初的Nature Neuroscience上，一种新的CRISPRa系统被建立并应用——dCas9-SPH。将SunTag-p65-HSF1与dCas9融合，并利用Cre-loxP系统，建立了一种可受Cre诱导的dCas9-SPH转基因小鼠。

CRISPRa 研究案例

dCas9-VPR

dCas9与转录激活因子融合转录增强结果显示，融合三个转录激活因子的增强的效果明显高于融合单个转录激活因子。

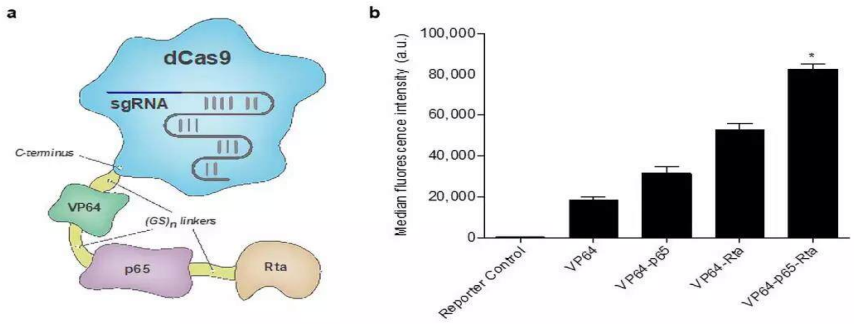


Fig1. Serial fusion of activation domains to dCas9.

VPR连接顺序是转录激活的影响因子，当顺序为VP64-p65-Rta时，转录激活效果最明显。

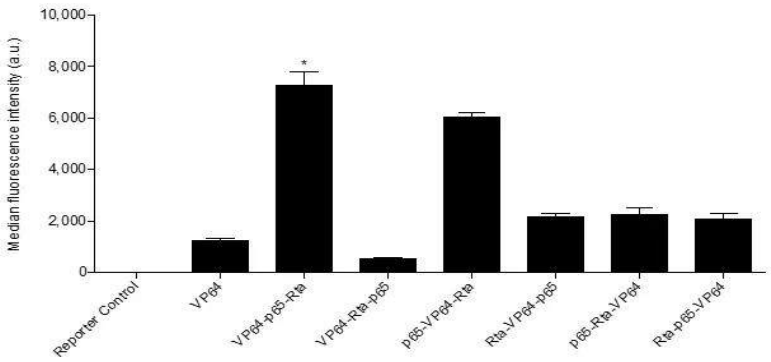


Fig2. Testing the effects of VP64, p65 and Rta order on activation.

检测人类293T细胞中的MIAT、NEUROD1、ASCL1、RHOXF2、TTN、ACTC1基因，结果显示dCas9结合转录增强子对不同的基因激活程度不同。

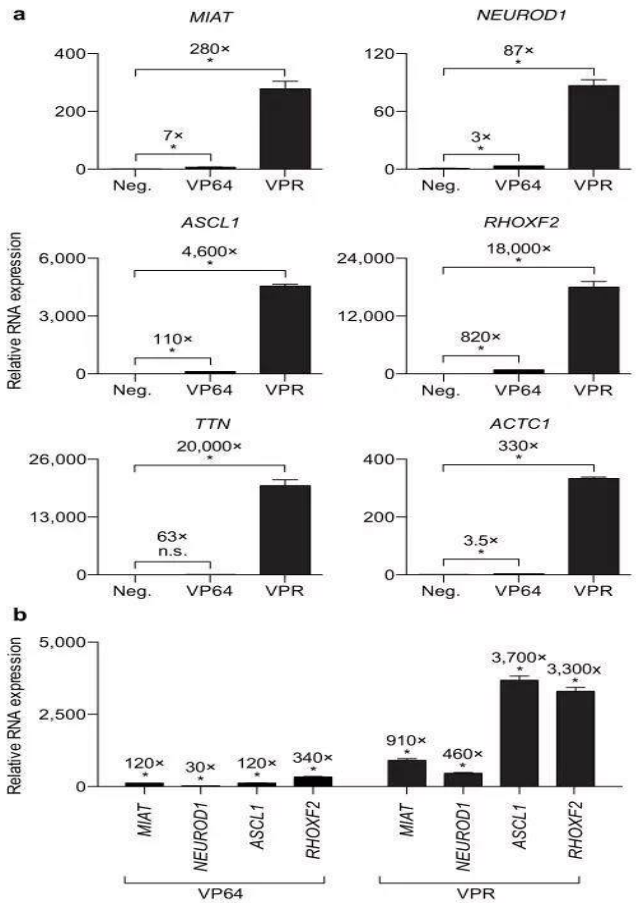


Fig3. Gene activation using VPR.

参考文献：

Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat Methods. 2015 Apr;12(4):326-8.

dCas9-SPH

将SunTag-p65-HSF1 (SPH)融合到dCas9蛋白上，分别在人和小鼠的细胞里验证了dCas9-SPH系统的高效性以及特异性。

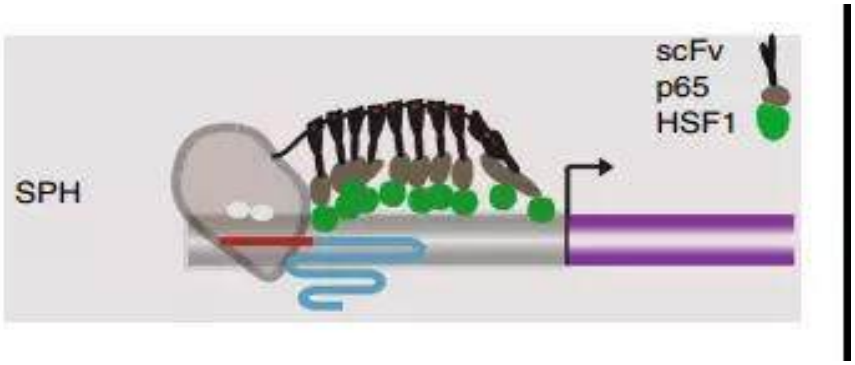


Fig1. Design of an improved activator SPH.

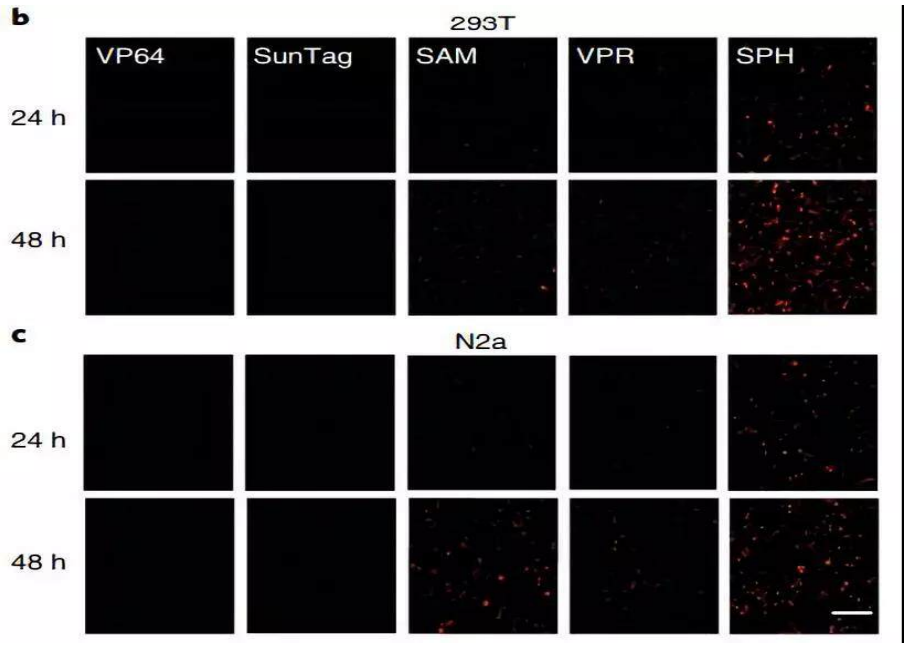


Fig2. mCherry driven by a minimal CMV promoter was activated in HEK293T and N2a cells by the indicated dCas9 activation systems.

构建受Cre重组酶调控的dCas9-SPH转基因小鼠，在dCas9-SPH小鼠的原代细胞里导入sgRNA可以激活基因和长链非编码RNA。

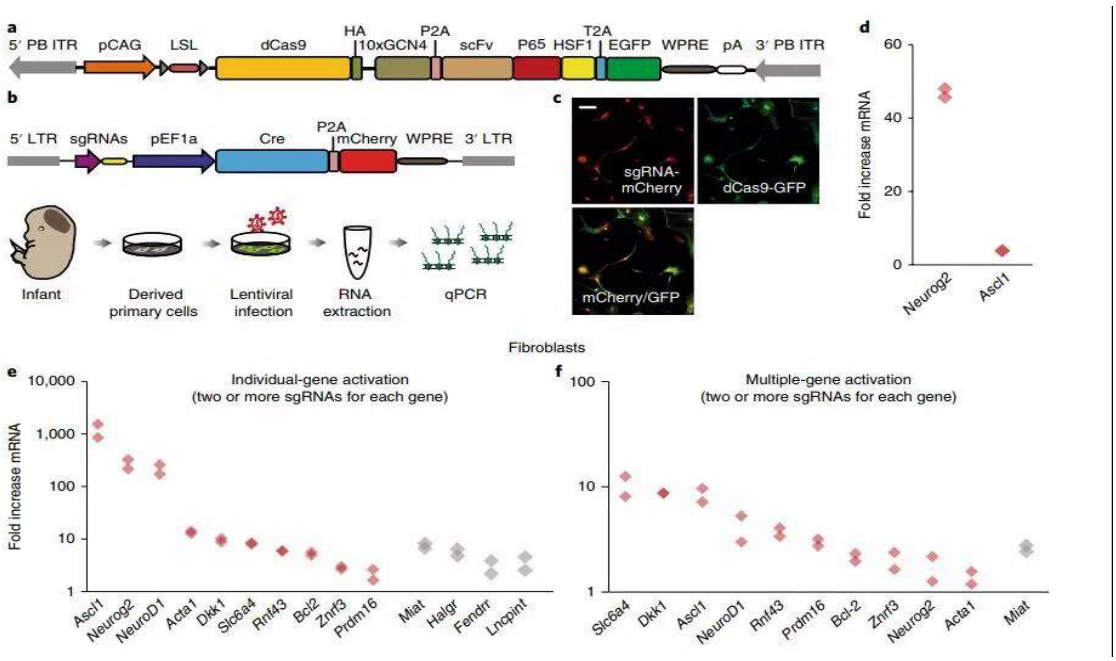


Fig3. Generation of a Cre-dependent SPH transgenic mouse and activation of genes and lncRNAs in primary cells.

通过向dCas9-SPH转基因小鼠脑部定点注射靶向三个转录因子（ANN）Ascl1，Neurog2、Neurod1的AAV-sgRNA，结果显示ANN转录因子显著上调，星形胶质细胞可以直接被转化为功能性神经元。

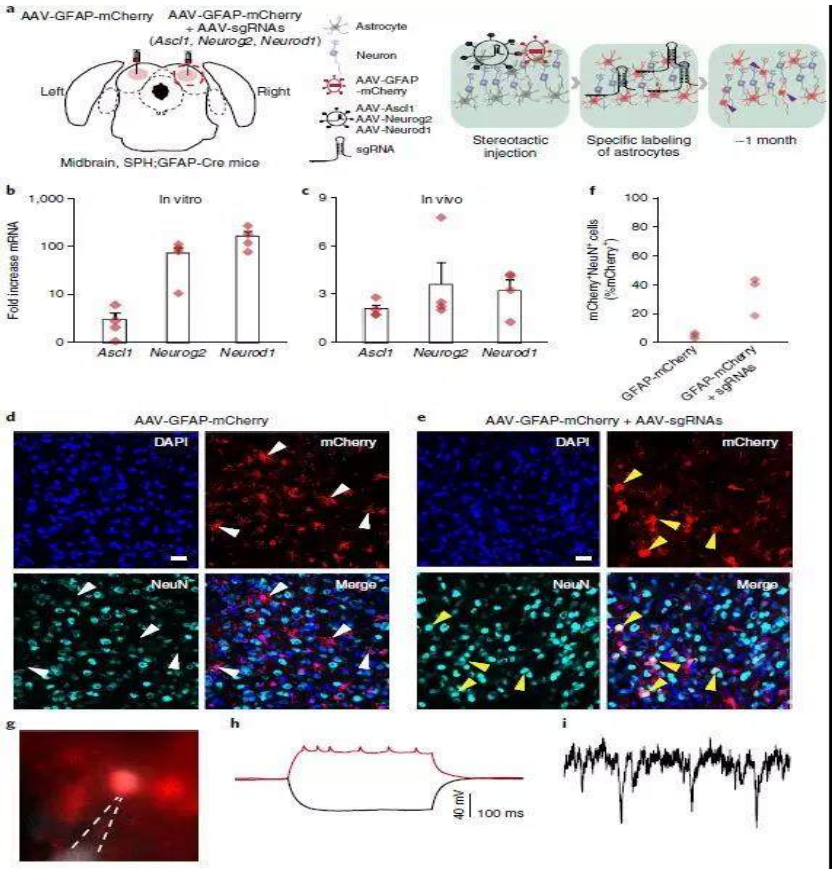


Fig4. SPH-based targeted activations convert astrocytes into functional neurons in vivo.

向dCas9-SPH转基因小鼠脑部定点注射靶向多个基因以及长链非编码RNA的AAV-sgRNA阵列，可实现多个

基因在神经元内的同时激活。

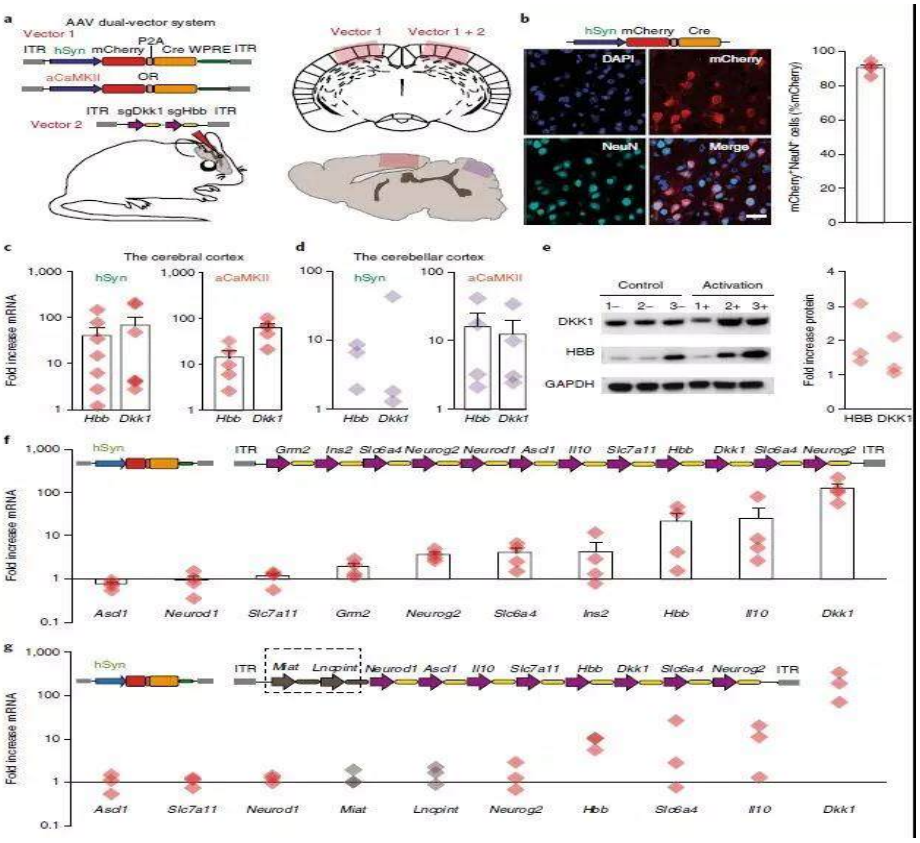


Fig5. Complex transcriptional activation in the intact brain using a single sgRNA array.

参考文献：

Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, et al. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. Nat Neurosci. 2018 Mar;21(3):440-446.

CRISPR调节基因组的应用

- 基因表达降低（Knockdown）：适用于编码和非编码基因。可与CRISPR-KO或RNAi互补。
- 基因过表达（Overexpression）：适用于编码和非编码基因。可实现基因在内源环境中过表达。
- 基因定位：dCas9与荧光蛋白融合表达，可以对靶基因所在的染色体定位进行示踪。
- 诱导iPS：可利用CRISPRi来诱导iPS，或大规模筛选细胞全能性相关基因。
- 高通量遗传筛选：可以利用CRISPRi/CRISPRa找到肿瘤细胞中的调节通路或易感基因、鉴定组织发育或细胞分化中的重要基因。

CRISPR调节基因组的优势

- dCas9介导的基因调控是可逆的，不会永久性地修饰基因组DNA。
- CRISPRi/CRISPRa复合物必须在转录起始位点附近才能发挥作用，因此降低了脱靶效应。
- 设计多条gRNAs可同时对多个靶基因进行调控。
- CRISPRi的作用类似于RNAi，但又不同于RNAi。RNAi针对成熟的RNA，而CRISPRi则是在DNA水平阻止转录的起始。因此，与RNAi相比，可靶向lncRNA、microRNA、反向转录产物、细胞核内的转录本等，是研究非蛋白编码基因的有力工具。

CRISPR调节基因组的局限性

- PAM序列在一定程度上限制了结合靶序列的数量。
- 染色体状态和修饰可能会影响dCas9-gRNA与DNA的结合。
- 哺乳动物细胞中，不同基因的CRISPRi/CRISPRa的效率差异性较大。
- 当靶基因的靶序列与其它基因重叠，或受双向启动子调节时，CRISPRi/CRISPRa的调控可能会影响到周边的基因表达。

dCas9介导的体内基因沉默/激活工具小鼠来啦！

南模生物dCas9系列工具鼠，可帮助研究者实现多靶点、可逆、内源蛋白编码基因以及长链非编码RNA的调控。

CRISPRi 工具鼠

- **CAG-LSL-KRAB-dCas9**

品系全名：C57BL/6J-Gt(ROSA)26Sorem1(CAG-LSL-KRAB-dCas9-IRES-EGFP)Smoc

目录号：NM-KI-18007

品系描述：将CAG-LSL-2xKRAB-dCas9-IRES-EGFP-WPRE-pA定点插入到小鼠Rosa26基因中，建立受Cre表达诱导的CRISPRi基因表达调控工具小鼠。与Cre工具鼠交配后，在Cre表达的细胞内，可通过gRNA靶向并沉默目的基因。

CRISPRa 工具鼠

- **CAG-LSL-dCas9-VPR**

品系全名：C57BL/6J-Gt(ROSA)26Sorem1(CAG-LSL-dCas9-VPR-IRES-EGFP-WPRE-pA)Smoc

目录号：NM-KI-18004

品系描述：将CAG-LoxP-STOP-LoxP-dCas9-VP64-p65-Rta-IRES-EGFP-WPRE-polyA结构插入到Rosa26基因中，建立受Cre表达诱导的CRISPRa基因表达调控工具小鼠。与Cre工具鼠交配后，在Cre表达的细胞内，可通过gRNA靶向并增强目的基因的表达。

- **TRE3G-dCas9-VPR**

品系全名：C57BL/6J-Col1a1em1(TRE3G-dCas9-VPR-eGFP-pA)Smoc

目录号：NM-KI-00123

品系描述：将TRE3G-dCas9-VP64-p65-Rta-eGFP-pA四环素调控表达dCas9激活元件插入到安全位点Col1a1位点中。与rtTA工具鼠交配后，可在强力霉素dox诱导下在rtTA表达的细胞中，通过gRNA靶向并增强目的基因的表达。

- **CAG-LSL-dCas9-SPH**

品系全名：C57BL/6-Tg(CAG-LSL-dCas9-SPH)Smoc

目录号：NM-TG-00025

品系描述：通过piggyBac转座子系统建立CAG-LSL-dCas9-HA-SunTag-p65-HSF1-EGFP-WPRE-polyA转基因小鼠。dCas9-SPH的表达受Cre重组酶调控，与Cre工具鼠交配后，在Cre表达的细胞内，可通

过gRNA靶向并增强目的基因的表达。

参考文献

Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell. 2013 Feb 28;152(5):1173-83.

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell. 2013 Jul 18;154(2):442-51.

Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. Cell Res. 2013 Oct;23(10):1163-71.

Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, Weissman JS, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. Cell. 2014 Oct 23;159(3):635-46.

Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat Methods. 2015 Apr;12(4):326-8.

Zalatan JG, Lee ME, Almeida R, Gilbert LA, et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. Cell. 2015 Jan 15;160(1-2):339-50.

Zheng Y, Shen W, Zhang J, Yang B, et al. CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain.Nat Neurosci. 2018 Mar;21(3):447-454.

Yeo NC, Chavez A, Lance-Byrne A, Chan Y，et al. An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. Nat Methods. 2018 Jul 16. doi: 10.1038/s41592-018-0048-5.

Zhou H, Liu J, Zhou C, Gao N, et al. In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. Nat Neurosci. 2018 Mar;21(3):440-446.

Kampmann M. CRISPRi and CRISPRa Screens in Mammalian Cells for Precision Biology and Medicine. ACS Chem Biol. 2018 Feb 16;13(2):406-416.