

CRISPR/Cas9系统诱导DNA断裂的修复 机制研究进展

杨丽芸 陈丽娇 李善刚*

(昆明理工大学灵长类转化医学研究院, 省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室;
云南中科灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500)

摘要 近年来, 聚类规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated protein 9, Cas9)介导的基因编辑技术已广泛应用于生物学、基础医学等研究领域, 通过该技术构建的动物疾病模型推动了对发病机制的探索和基因治疗等方面的研究进展。Cas9核酸酶切割与随后的同源重组(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)共同完成基因编辑工作, 但是HDR发生的效率较低限制了其应用。因此对NHEJ和HDR修复方式的机制研究对于提高基因编辑的精准性及高效性十分重要。该文主要对CRISPR/Cas9系统应用过程中NHEJ和HDR修复系统的发生机制进行总结并结合相关研究进展进行了展望, 为高效利用CRISPR/Cas9技术的研究提供了思路。

关键词 CRISPR/Cas9; DSB; 同源重组; 非同源末端连接; 疾病模型; 基因治疗

Research Progress on Repair Mechanism of DNA Breakage Induced by CRISPR/Cas9 System

YANG Liyun, CHEN Lijiao, LI Shangang*

(Institute of Primate Translational Medicine, State Key Laboratory of Primate Biomedical Research,
Kunming University of Science and Technology; Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China)

Abstract In recent years, CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) and its associated protein Cas9 mediated gene editing technology has been widely used in biology, basic medicine and other research fields. The animal disease model constructed by this technology has promoted the research progress of pathogenesis and gene therapy. Cas9 nuclease cleavage and subsequent HDR (homology-directed repair) or NHEJ (non-homologous end joining) achieved gene editing work together, but the low efficiency of HDR restricted its application. Therefore, the mechanism of NHEJ and HDR repair is very important to improve the accuracy and efficiency of gene editing. This review summarizes the mechanism of NHEJ and HDR repair system in the application of CRISPR/Cas9 system, and prospects the related research progress, in order to provide some ideas for the efficient use of CRISPR/Cas9 technology.

Keywords CRISPR/Cas9; DSB; HDR; NHEJ; disease model; gene therapy

CRISPR/Cas9系统是在细菌、古生菌和噬菌体中发现的, 一种由向导RNA(single guide RNA,

sgRNA)介导的对DNA进行修饰的基因编辑工具。Cas9蛋白靶向切割双链DNA时会发生DNA双链断

收稿日期: 2021-09-09 接受日期: 2021-11-29

国家自然科学基金(批准号: 31960215)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15000856418, E-mail: lisg@lpbr.cn

Received: September 9, 2021 Accepted: November 29, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31960215)

*Corresponding author. Tel: +86-15000856418, E-mail: lisg@lpbr.cn

裂(double-strand breakage, DSB), DSB修复的经典途径有非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homology-directed repair, HDR)^[1], 此外, 还有替代性非同源末端连接(alternative-NHEJ, alt-NHEJ)和单链退火(single-strand annealing, SSA)^[2]等方式。其中NHEJ活跃贯穿于整个细胞周期, 但其修复常不精确、易出错; HDR是一种高保真的修复途径, 修复错误率低, 但限于哺乳动物细胞的S后期和G₂期。目前, CRISPR/Cas9技术广泛被应用于动物模型构建和基因治疗等领域, 但是NHEJ精确性不足以及HDR效率低限制了CRISPR/Cas9系统的应用发展^[1]。因此, 对HDR和NHEJ等DSB修复途径的分子机制进行研究有利于高效利用CRISPR/Cas9技术。本文主要对CRISPR/Cas9系统应用过程中细胞内NHEJ和HDR修复系统的发生机制和选择进行了综述和展望, 为更好利用CRISPR/Cas9技术的研究提供了思路。

1 CRISPR/Cas9系统的发现和主要应用进展

1.1 CRISPR/Cas9的发现和作用机制

CRISPR/Cas系统源自于细菌和古生菌的免疫机制, 以序列特异性方式靶向破坏DNA和RNA, 为细菌提供了对入侵质粒和病毒的免疫力^[3-4]。1987年CRISPR首次在大肠杆菌基因组中被发现^[5]。有研究表明除细菌和古生菌以外, 巨型噬菌体中也存在CRISPR/Cas系统^[6]。目前已发现多种类型的CRISPR/Cas系统^[7], 其中II型CRISPR/Cas9系统由于效应复合物结构简单, 特异性好且切割效率高, 是最常见且广泛应用于各个领域的基因编辑工具^[8]。它是由Cas9蛋白、crRNA(CRISPR RNA)和tracrRNA(transactivating crRNA)组成的, 在原间隔序相邻基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)序列存在的情况下, sgRNA引导Cas9蛋白切割互补和非互补链, 形成切口, 简称Cas9-DSB切口。最后, 细胞通过NHEJ或HDR对断裂的DNA进行修复, 导致碱基插入、缺失(indels)或替换^[1]。

1.2 CRISPR/Cas9系统的优势和基因编辑工具演化

在CRISPR/Cas9系统出现之前, 锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶[transcription activator-like (TAL) effector

nucleases, TALENs]是主要的基因编辑工具, 它们都通过构建不同氨基酸组合靶向特异的DNA碱基序列。ZFNs和TALENs都需要一对核酸酶才能切割一个位点, 突变率较低。CRISPR/Cas9通过特异靶向位点的sgRNA引导识别DNA序列, 可以高效快速对靶基因位点进行切割, sgRNA载体构建简单且可进行多位点编辑, 而且相比于ZFNs和TALENs, CRISPR/Cas9识别宽容度高, 平均每8个碱基就有1个靶向序列^[9]。

目前, 使用最广泛的Cas9是源自化脓性链球菌的SpCas9。其他Cas9类型有源自金黄色葡萄球菌的SaCas9^[10]、嗜热链球菌的St1Cas9^[11]、脑膜炎奈瑟菌的NmCas9^[12]、弗朗西斯菌的FnCas9^[13]和空肠弯曲杆菌的CjCas9^[14], 其中SaCas9和CjCas9的靶向性与SpCas9相当^[14-15]。2020年, 我国的研究者王永明^[16]开发出了一个新的小型CRISPR/Cas9工具, 该Cas9来源于耳氏葡萄球菌, 被命名为SauriCas9, 其编辑范围大、效率高。同年, 哈佛医学院和麻省总医院联合对Cas9进行了工程化改造, 得到不受特定PAM序列限制就可识别切割DNA的Cas9蛋白变体SpG和SpRY^[17]。2021年3月, 王永明研究组^[18]又开发了SlugCas9-HF, 其具备活性高、精准性高和编辑范围广等优点。同年9月, 季泉江团队^[19]发现仅422个氨基酸的超小型CRISPR核酸酶-AsCas12f1, 其在细菌和哺乳动物细胞中实现了高效的基因编辑。同日, KIM实验室^[20]开发出在哺乳动物细胞中的靶向性与SpCas9相当的迷你版CRISPR系统Cas12f1, 它们为开发微型精准基因编辑和治疗工具提供了新的思路。除了切割引起DSB的CRISPR/Cas9系统以外研究者还开发了不引起DSB就能实现单碱基转换的碱基编辑系统(base editing, BE)系统^[21-22], 针对mtDNA的线粒体胞嘧啶碱基编辑工具(DddA-derived cytosine base editor, DdCBE)^[23]。2019年, LIU团队^[24]又开发出一种新型精准基因编辑工具PE(primase editor), 不引起DSB且不需要供体DNA即可实现单碱基的任意插入、删除与转换。基于Cas的基因编辑工具层出不穷, 为动物疾病模型的构建和基因治疗等领域不断地注入了活力, 由Cas9切割产生的DSB介导的同源重组也为人源化动物模型的制作提供了契机。

1.3 CRISPR/Cas9系统在动物模型构建和基因治疗中的应用

1.3.1 基因敲除 2013年, LE等^[1]首次利用CRISPR/Cas9系统对小鼠基因进行切割, 在Cas9-DSB修

复过程中产生移码突变,获得了基因敲除小鼠。从此开启了CRISPR/Cas9基因编辑技术在动物疾病模型研究中的应用。目前,CRISPR/Cas9基因编辑技术广泛应用于猴、猪、狗、兔和羊等物种基因敲除动物疾病模型的建立^[25-29]。此外,基因敲除还用于基因治疗的研究中,研究人员通过对不同基因的在体敲除,达到了使血液中低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的表达水平降低^[15]和对I型酪氨酸血症小鼠治疗的目的^[30]。

1.3.2 基因敲入 DSB介导的基因敲入可用于获得理想动物疾病模型,也可用于纠正相关疾病。2013年,RUDOLF课题组^[31]首次利用Cas9系统将标签或荧光蛋白成功敲入到*Nanog*、*Sox2*和*Oct4*三个基因中。2016年,日本的科学家在大鼠Thy1位点成功实现了绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因敲入^[32]。2018年,我国科学家先后获得了*Oct4-GFP*基因敲入的食蟹猴、威尔逊病的基因敲入兔模型和亨廷顿舞蹈症的基因敲入猪模型^[33-35]。在基因治疗领域,2016年,WILSON实验室^[36]利用SaCas9和供体DNA模板实现了10%的新生鼠肝细胞鸟胺酸氨甲酰基转移酶(ornithine carbamoyltransferase, OTC)的修复。2019年,在新生小鼠体内成功实现了铜转运ATP酶(ATPase copper transporting beta, *Atp7b*)基因上8号外显子的替换^[37]。总的来说,CRISPR/Cas9系统介导基因敲入操作简单,仅需要Cas9核酸酶、sgRNA和供体DNA片段,即可定点敲入外源基因片段,无物种种类的限制,但是目前基因敲入的效率仍然偏低,尤其针对大片段的敲入和替换,这限制了其在人源化动物模型制作和基因治疗中的应用。

1.3.3 单碱基编辑 BE系统的出现,为动物疾病模型的建立带来了新的策略,同时也为单碱基突变的遗传病带来了新的治疗思路。利用CBE技术,2017年KIM等^[38]建立了小鼠白化病和肌营养不良疾病(duchenne muscular dystrophy, DMD)模型,随后研究者建立了白化病兔、单碱基突变DMD猪和早衰症猴等模型^[39-41]。此外,还有研究利用DdCBE靶向线粒体基因*MT-ND5*在小鼠中建立线粒体疾病模型^[42]。2018年ROSSIDIS等^[43]研究利用BE系统靶向肝脏细胞成功实现了出生前的碱基编辑基因治疗。同年,韩国首尔大学的研究者利用ABE系统纠正了DMD小鼠的肌肉中20号外

显子的一个无义突变,恢复了17%的dystrophin蛋白表达,有效改善了小鼠肌肉功能^[44]。2021年5月,MUSUNURU等^[45]利用ABE8.8在非人灵长类模型中有效降低了血液中原蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, Pcsk9)和LDL-C的水平。目前,BE系统对于单个碱基的编辑已经相对成熟,但是对长片段的操作还是需要Cas9切割介导的同源重组来实现。

2 CRISPR/Cas9系统诱导的DSB修复

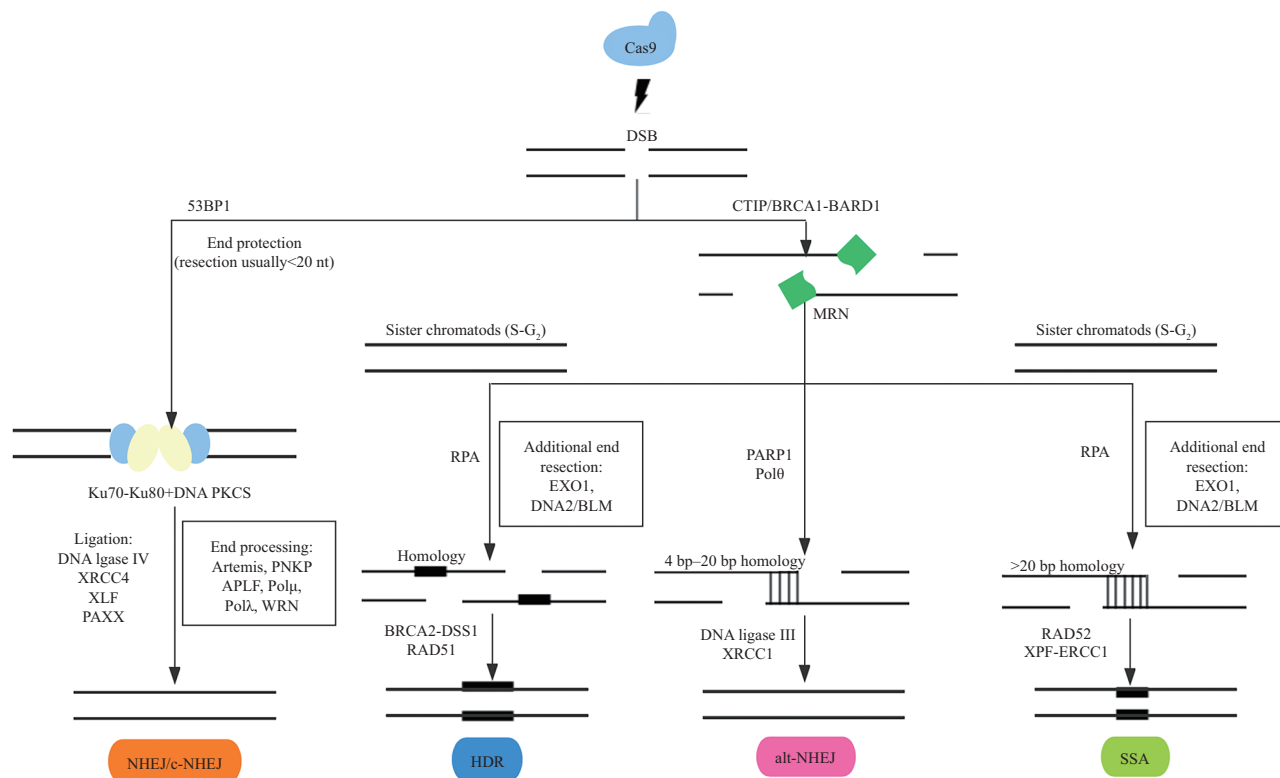
CRISPR/Cas9系统在特定位点诱导产生DSB是基因编辑中的第一步,Cas9-DSB激活细胞内修复机制才能实现基因编辑的目的^[46]。Cas9-DSB修复途径有HDR、NHEJ、alt-NHEJ和SSA,如图1所示,不同的修复途径都有特定的修复因子,但这些修复途径都是由相同的信号级联来驱动细胞对Cas9-DSB反应的^[47]。Cas9-DSB的修复是在极其复杂的核内环境中完成的,Cas9-DSB信号级联首先激发了细胞的核内反应。

2.1 Cas9-DSB引起的细胞核内反应

Cas9-DSB产生后,首先启动染色质发生高度且复杂的泛素级联,染色质构象的改变是Cas9-DSB修复的关键。染色质构象的改变与组蛋白修饰和DNA甲基化的改变有关,细胞内Cas9-DSB信号首先诱导H2BK123泛素化、H3K79甲基化等一系列组蛋白修饰,能使非活化染色质模板转变为结构开放的常染色质,有利于DNA修复蛋白到达受损区域^[48]。此外,组蛋白修饰的改变可作为损伤信号招募修复蛋白^[49],还会影响DNA甲基化的改变。DNA去甲基化由TET1、TET2和TET3等将5-甲基胞嘧啶(5mC)氧化为5羟甲基胞嘧啶(5hmC)而引发,5hmC有助于开放染色质的形成,能促进DNA修复^[50]。染色质构象动态变化还与DSB修复途径的选择有关,p53结合蛋白1(p53 binding protein 1, 53BP1)和乳腺癌易感基因1(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)是控制DSB修复通路选择的蛋白因子,它们都是通过特定的染色质修饰和染色质重塑被招募到DSB位点上的DNA修复因子。53BP1的招募有利于DSB修复指向NHEJ,而BRCA1则使DSB的修复走向HDR^[51](图1)。

2.2 Cas9-DSB的修复方式及其机制

当Cas9-DSB信号驱动细胞核内染色质构象改变后,细胞启动信号级联响应Cas9-DSB,首先是共



CRISPR/Cas9系统诱导产生的DSB招募53BP1蛋白后修复指向NHEJ, 而BRCA1则使修复走向HDR、alt-NHEJ或SSA。

The DSB induced by CRISPR/Cas9 system recruits 53BP1 protein and the repair points to NHEJ, while BRCA1 leads the repair to HDR, alt-NHEJ or SSA.

图1 CRISPR/Cas9系统诱导DNA双链断裂修复方式(根据参考文献[2]修改)

Fig.1 Repair methods of DNA double strand breaks induced by CRISPR/Cas9 system (modified from reference [2])

济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM)、ATR(ATM and Rad3-related)和DNA依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)这三种磷酸肌醇-3-激酶相关蛋白激酶家族(phosphoinositide 3-kinase related protein kinases, PIKKs)被激活^[52]。ATM活化后使组蛋白H2AX的C末端S139位点磷酸化形成 γ H2AX, 启动基于染色质的信号传递修饰, 包括磷酸化、泛素化和其他转录后修饰^[49]。同时, ATM激活CHK2使细胞损伤检测点介导子(mediator of DNA damage check-point 1, MDC1)的S964位点磷酸化, 磷酸化后的MDC1先后招募E3泛素连接酶环指蛋白8(RING-finger ubiquitin ligase, RNF8)和RNF168蛋白, 泛素化组蛋白H1和组蛋白H2A/H2AX, 为随后Cas9-DSB的修复招募53BP1或BRCA1选择相应的修复方式^[53]。

2.2.1 Cas9-DSB同源重组修复 参与细胞内同源重组修复的主要成分有MRN(MRE11-RAD50-NBS1)复合体和RAD51、RAD54、BRCA1、CTIP(CTBP interacting protein)、ATM和ATR等因子^[54]。Cas9-

DSB的修复招募了BRCA1蛋白则引导细胞进行HDR修复。在细胞内BRCA1是5'端切除中最重要的中介, BRCA1-BARD1与CTIP和MRN以细胞周期依赖性的方式相互作用, BRCA1-BARD1或CTIP刺激MRE11的活性并启动DNA末端切除, 短程切除由MRN复合物完成, 进一步远程切除则通过外切酶1(EXO1)和异二聚体DNA2/Bloom综合征蛋白(DNA2/BLM)核酸酶-解旋酶复合物完成, 最终切除产生大量的ssDNA^[51]。不稳定的ssDNA迅速与复制蛋白A(replication protein A, RPA)结合形成RPA-ssDNA, 再与在BRCA2-DSS1复合物辅助下募集的重组酶RAD51结合, 在RAD51的帮助下进行同源搜寻后侵入同源染色体, 以此为模板加工产生位移环(displacement loop, D-loop)重组中间体, 之后DNA聚合酶以入侵的同源链作为模板, 从3'端延伸到DSB的另外一端, 有效地封闭受损区域^[55]。因此, DNA末端进行广泛的5'端切除是DSB选择HDR修复方式的关键, 与MRN相互作用的蛋白BRCA1-BARD1和CTIP是DNA末端切除启动的关键因子^[56]。

2.2.2 Cas9-DSB非同源末端连接修复 NHEJ/c-NHEJ途径是Cas9-DSB在一些修复元件的参与下DNA直接连接的修复过程。参与NHEJ的主要成分有Ku蛋白、DNA-PK、DNA连接酶IV、X射线修复交叉互补4(XRCC4)、XLF(XRCC4-like factor)和APLF等多个分子^[57]。

在真核生物中,由于NHEJ修复效率高,故NHEJ为DSB修复的主要途径,该途径分为多个步骤。NHEJ的第一步是DNA-PK在Ku异二聚体(KU70-KU80蛋白)的辅助下募集到DSB处,并激活DNA-PK激酶活性发挥连接断裂DNA双链的功能^[57]。DNA-PK激酶能自身磷酸化,还能磷酸化DSB附近的染色质和众多下游NHEJ因子,促进下游NHEJ因子的及时招募和激活,在LIG4-XRCC4复合物和另外两个蛋白质XLF和PAXX的相互作用下,促进部分DNA末端的正确连接。但由于断裂的DNA末端通常不是互补的,可能包含修饰过的核苷酸,因此需要在DNA末端连接之前进行加工处理。在Artemis、PNKP、APLF、Pol μ 和Pol λ 、Werner(WRN)、aprtaxin和Ku等加工酶作用下使DNA末端可连接,它们分别作用于不同的DNA末端结构,如Artemis核酸酶作用于发夹结构等;aprtaxin可去除断裂DNA 5'-末端的AMP残基;Ku加工酶可帮助切除DSB附近的碱性位点;而DNA Pol λ 和DNA Pol μ 可在断裂的3'端添加核苷酸^[51]。由于上述的末端处理的结果容易产生indels,导致移码突变或过早终止密码子的形成^[58],从而达到基因敲除的效果。

2.2.3 Cas9-DSB替代性末端连接 alt-NHEJ途径为c-NHEJ的备份机制,包括微同源末端连接(MMEJ)^[59]。参与alt-NHEJ通路主要是PARP1、DNA连接酶I、DNA连接酶III、XRCC1和MRN等蛋白^[57]。

当c-NHEJ的关键蛋白缺陷时细胞就会启动alt-NHEJ来修复DSB^[60]。PARP1为alt-NHEJ的关键蛋白,当细胞内发生DSB时,感受器PARP1募集alt-NHEJ的修复因子至DNA断裂点,Mre11与CTIP等因子参与末端碱基切除,DNA连接酶III作为连接酶与XRCC1共同作用参与末端连接,最后由DNA连接酶I和DNA连接酶III等因子介导DSB连接^[57]。alt-NHEJ通常在对DSB位点15~100个核苷酸处进行DNA的5'端切除,暴露出的4~20 bp微同源序列有助于断裂末端的重新连接^[2]。PARP1还能招募Pol θ ,Pol θ 可以替代RPA稳定3'-ssDNA长链尾巴的退火,利用退火部分

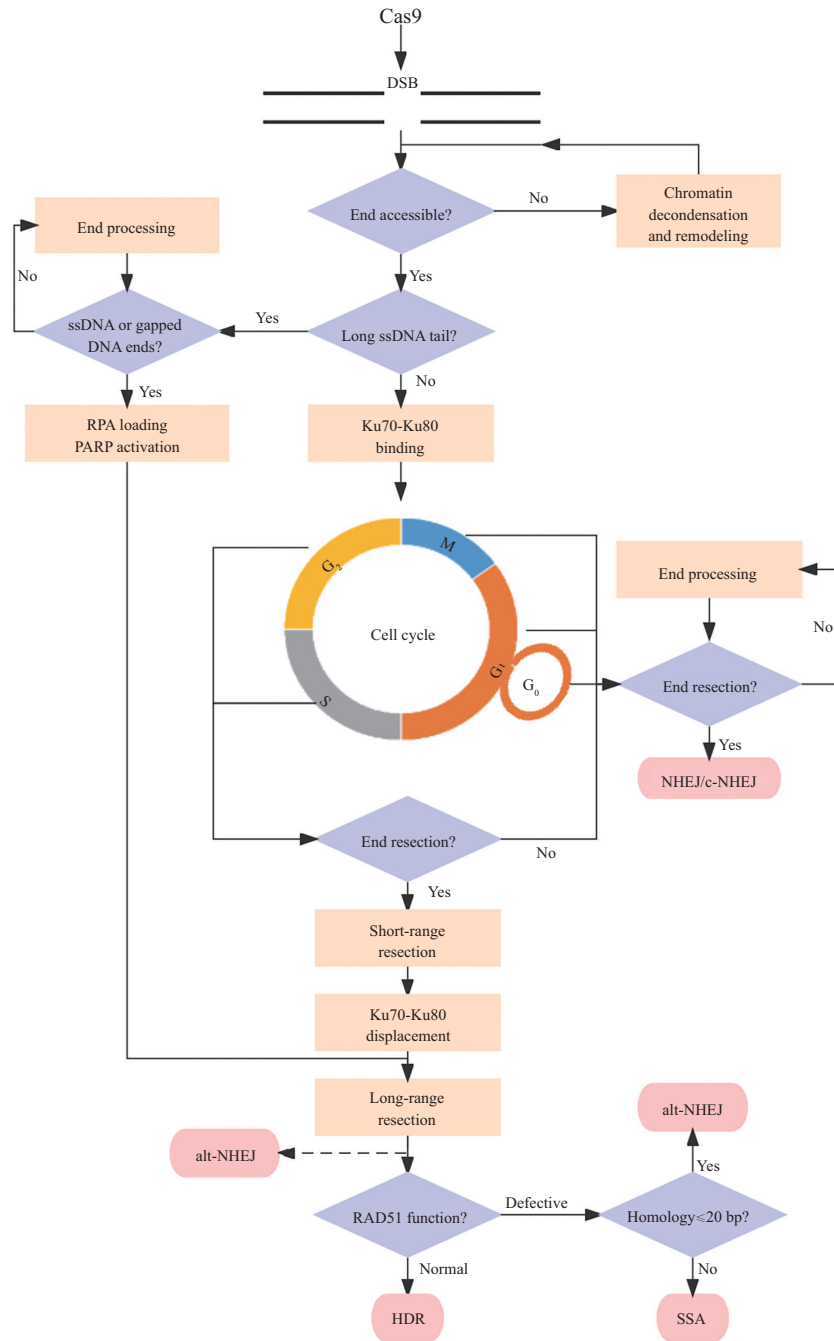
作为模板延伸DNA链的3'端以加强断裂末端之间的结合。当退火后的微同源片段嵌入到3'-ssDNA长链尾巴时,非同源的3'-ssDNA尾巴需要在Pol θ 结合前切除,因此,XPF-ERCC1核酸酶、Artemis和APLF等核酸酶在alt-NHEJ过程中被利用,这些核酸酶去除非同源的3'-单链DNA(3'-ssDNA)尾巴,为Pol θ 结合奠定基础。最近有研究报告了使用CRISPR/Cas9进行的基于alt-NHEJ的靶点整合的相对高频率^[61-62]。然而,alt-NHEJ与NHEJ有一些相关的技术缺点:在DNA插入位点的5'和3'连接处存在indels问题^[63]。

2.2.4 Cas9-DSB单链退火修复 SSA和alt-NHEJ一样也需要切除DNA的5'端,但切除的范围更大,因为SSA的启动需要3'-ssDNA尾巴有二十五到几百个核苷酸长的同源序列,这种同源序列通常存在于DNA分子的双链重复序列^[2]。SSA的末端切除由MRN和CTIP启动切除产生3'-ssDNA尾巴,并由EXO1和DNA2/BLM等酶进行广泛末端切除产生具有更长同源序列的3'-ssDNA尾巴。接着,ssDNA与RPA形成RPA-ssDNA复合物,但与HDR不同,SSA的最后一步依赖于RAD52介导退火连接两个具有长同源序列的3'-ssDNA末端,若3'-ssDNA末端存在非同源序列,将由XPF-ERCC1内切酶切除^[64]。由于SSA途径在退火配对前常涉及广泛末端切除,因此,SSA导致大的DNA片段缺失,会丢失部分的遗传信息,为易出错的修复过程^[65]。有研究认为绝大部分的哺乳动物基因组由重复序列组成,所以SSA可能是HDR的重要替代途径^[66],也可能是动物模型制备过程中大片段缺失的机制之一。

3 CRISPR/Cas9诱导的DSB修复机制的选择

3.1 Cas9-DSB修复机制选择与细胞周期

基于Cas9-DSB修复实现特定基因编辑目的是基因编辑的重要手段之一,DSB修复途径选择的机制研究对于提高基因编辑效率有重要意义^[67]。DSB修复途径的选择与细胞周期有关,DSB修复方式的选择如图2所示。NHEJ不需要序列同源性,在有丝分裂细胞周期的所有阶段都具有活性,而HDR需要广泛的序列同源性,在减数分裂、有丝分裂S后期和G₂期起作用^[68]。当DNA复制之后,一个相同的DNA序列可以作为无错误DSB修复的模板存在于细胞核中,HDR途径和NHEJ途径在有



DNA双链断裂修复途径选择的决策点用蓝色框表示, 蛋白结合及末端加工等修复活动以橙色框表示, 修复途径以红色框表示。
The decision node for the choice of DNA double strand break repair pathway is represented by blue boxes, and the activity is represented by orange boxes, and the repair pathway is represented by red boxes.

图2 CRISPR/Cas9介导DNA双链断裂修复方式的选择(根据参考文献[72]修改)
Fig.2 Choice of repair methods for DNA double strand breaks (modified from reference [72])

丝分裂S后期和G₂期都可对DSB进行修复, 但细胞会优先选择修复精确率高的HDR修复, 其机制是由于CYREN是NHEJ的细胞周期特异性抑制剂, CYREN与Ku二聚体相互作用, 抑制NHEJ修复促进HDR修复^[69-71]。当NHEJ和HDR这两种主要途径受到损害时, 细胞会启动SSA和alt-NHEJ修复

途径, SSA和alt-NHEJ都需要DNA末端切除, 所以它们在细胞S期和G₂期是活跃的^[2,72]。

3.2 体细胞中Cas9-DSB修复方式的选择

DSB修复方式选择由NHEJ关键因子(53BP1)或HDR关键因子(BRCA1)激活时引起的复杂分子相互作用网络所决定, 53BP1和BRCA1为相互拮抗的关

系, 它们都招募许多额外的因子到达突变点^[73]。有丝分裂是哺乳动物体细胞增殖的主要方式, 体细胞中DSB的修复主要依赖NHEJ途径, 只有处于S期、G₂期的部分增殖细胞倾向于选择精确度高的HDR途径, 但是处于S期、G₂期的增殖细胞DSB修复途径的选择还取决于DNA末端切除。53BP1是修复方式选择的关键调节因子, 它诱导Ku二聚体与DNA末端结合抑制DNA末端切除后启动NHEJ修复, 当DNA末端切除后则促进HDR修复的进行^[74]。DNA末端的结构也是影响其切除的重要因素, 如ssDNA长链尾巴与Ku二聚体结合较弱, 而平末端或微凹的DNA末端与Ku二聚体结合较好; ssDNA或有间隙的DNA末端直接激活PARP1, 并可能通过Ku二聚体逃避末端识别, 支持Ku二聚体的置换从而促进DNA末端长片段切除, 最终细胞会选择更为精确的HDR修复, 而alt-NHEJ和SSA这两个途径, 也可以机会性地作用于ssDNA末端, 导致染色体重排以进行DSB修复^[72]。所以CRISPR/Cas9切割产生平末端DSB切口引导修复走向NHEJ, 黏性末端DSB切口则倾向于HDR修复。

3.3 早期胚胎中Cas9-DSB修复方式的选择

为了维持生殖系统基因组完整性, 配子和受精卵采用了不同的DNA损伤修复系统。一般来说, 选择使用NHEJ或HDR修复DSB取决于细胞周期。当DNA复制完成, 姐妹染色单体可作为修复模板时, DSB的修复倾向于HDR, 在M期和G₁期早期HDR机制下调, 从而偏向NHEJ诱导的基因组编辑。然而在ICSI时将CRISPR/Cas9导入MII卵母细胞, 并没有观察到HDR效率的降低, 可能是卵裂阶段的M期和有丝分裂M期的DNA修复反应的不同, 也可能是DSB发生在细胞周期的M期或G₁期, 而HDR修复随后发生在细胞周期的S期或G₂期^[75]。2013年, 李劲松研究员^[76]发现了小鼠胚胎可以利用内源野生型等位基因为模板进行修复, 加入外源DNA模板后并不能显著提高HDR修复效率, 证明了利用内源野生型等位基因为模板的HDR在CRISPR/Cas9介导的小鼠胚胎修复中起到了主导性作用。2019年, WOLF教授等^[77]探讨了早期胚胎中DSB的修复, 其中利用外源ssODN模板的HDR修复效率仅占1%~5%, 而利用内源野生型等位基因为模板的修复效率达到64%。2021年, 冯国平教授等^[78]在利用CRISPR/Cas9进行小鼠胚胎基因敲入的研究中获得了高效率的纯合基

因敲入小鼠, 这一工作进一步肯定了利用内源野生型等位基因为模板的HDR在小鼠早期胚胎的DSB修复中起到主导作用, 而RAD51是此过程中的重要因子之一。

利用CRISPR/Cas9系统对受精卵进行注射等研究主要用来构建动物疾病模型及基因治疗。以NHEJ进行修复主要产生基因敲除的结果, 而以HDR进行修复可以进行基因敲入, 常用的HDR修复模板其上下游各包含500 bp以上的同源序列, 中间包含需要替换的序列。然而, HDR通常效率相对较低, 限制了它的应用。为了解决HDR的不足, 许多研究利用多种供体作为修复的模板, 这些模板中最简单的是同源臂小于100 bp的单链寡脱氧核苷酸(ssODNs), 其修复途径通常被称为单链模板修复(SSTR), 这一过程包含HDR(模板的精确集成)和NHEJ(形成indels)的修复结果, 这种方法通常比传统的HDR获得更高的整合率^[79]。在基因治疗方面, 可利用CRISPR-Cas9技术修复有害的基因突变, 但是其主要的局限性在于NHEJ途径会引入indels, HDR修复效率低。在杂合子突变治疗中, 基因转换也备受关注, 基因转换是将供体序列单向转换至高度同源的受体序列中而不需要外源模板的过程, 正常情况下基因转换常发生在减数分裂非交叉重组时期, 被DSB修复机制激活, 进而导致完整的同源序列复制到DSB区域, 已有研究证明在早期胚胎中CRISPR/Cas9诱导的突变基因MYBPC3的基因转换修复效率达到64%^[75]。

4 提高Cas9-DSB介导的HDR在基因编辑中的效率研究

CRISPR/Cas9介导的基因编辑的效率取决于Cas9-DSB的修复途径。由于NHEJ修复机制的随机性和HDR修复的低效, 因此不容易得到目标基因位点编辑正确的动物模型。提高DSB修复精确性及效率的关键在于对HDR和NHEJ修复途径的调节选择^[80]。增强HDR效率的方法有改变同源供体序列, 如改变双链质粒供体中不同的同源臂长度、使用长寡核苷酸形式的单链DNA供体分子、使用rAAV生成的单链DNA供体分子和通过设计的切割位点在体内线性化供体分子, 也可以提高HDR介导的基因插入效率^[80], 还可以将Cas9蛋白、sgRNA和ssDNA结合构建成RNP-ssDNA复合物以提高HDR效率^[81]。此外, 还可以通过以下几种方式

来增强HDR活性。

4.1 抑制NHEJ途径的关键因子增强HDR效率

当CRISPR/Cas9诱导产生DSB信号时,处于S期和G₂期的细胞首先会尝试用HDR来进行DSB修复,在NHEJ和HDR同时发生时,抑制NHEJ途径的关键因子可导致DSB修复走向HDR途径^[82]。DNA连接酶IV是NHEJ最后一步连接的关键蛋白,也是抑制NHEJ的潜在靶点^[83]。SCR7是DNA连接酶IV的小分子抑制剂,2015年,有研究成功地利用SCR7抑制NHEJ,从而增加CRISPR/Cas9介导的HDR频率。MARUYAMA等^[84]发现,SCR7处理将哺乳动物细胞的基因敲入效率提高了2~19倍,将CRISPR/Cas9和SCR7共同注射到受精卵中可提高HDR介导的敲入效率。也有研究使用SCR7来提高精确基因修饰的频率^[85-86]。除小分子抑制剂外,还可通过其他方法阻断DNA连接酶IV活性,如shRNA介导的基因沉默和通过蛋白体去降解DNA连接酶IV也可以提高哺乳动物细胞中HDR的效率^[86]。此外,还可以通过抑制NHEJ途径上游的关键因子来提高HDR途径效率,有研究通过Ku特异性siRNA下调Ku70和Ku80的表达,使猪成纤维细胞中CRISPR/Cas9介导的HDR的频率显著增加^[87]。通过化学抑制剂NU7441和KU-0060648抑制DNA-PK,导致HEK-293T细胞中Cas9-DSB的HDR修复途径效率增加2倍^[88]。考虑到NHEJ对维持基因组的稳定性的重要性,抑制这种修复途径可能会导致DSB在细胞中不能及时修复,最终导致细胞死亡^[82]或晚期胚胎致死^[89]。因此,需要仔细评估这些抑制剂在活体使用中的安全性。

4.2 增强HDR关键因子的活性提高HDR效率

HDR激动剂被认为是临床上更安全的选择,RAD51是HDR途径中的核心蛋白,主要参与链交换和同源搜索。RS-1是RAD51的化学激动剂,它可以增强RAD51的结合活性。PINDER等^[90]首次表明,RS-1处理可使HEK-293A细胞中Cas9刺激的HDR增加3~6倍,还成功应用于人类多能干细胞中CRISPR/Cas9介导的敲入^[91]。而RecA作为RAD51同源物,它通过定向富集增加DNA模板的拷贝数从而有效地提高HDR效率,CAI等^[92]研究表明,在体内和体外Cas9/RecA系统的HDR效率更高。KURIHARA等^[93]表明,RAD51的过表达能使神经前体细胞敲入效率提高约2倍。除

了HDR激动剂外,SHAO等^[94]研究表明,yRAD52或yRAD52-Cas9融合蛋白的过度表达增加了HEK-293T和猪PK15细胞的HDR频率,能使利用单链供体寡核苷酸(SSODN)为模板的鸡细胞中的HDR增加3倍^[95]。同时,TRAN等^[96]发现,CTIP、RAD52和MRE11在与Cas9融合时都可以将精确编辑效率提高2倍。此外,YU等^[97]还发现了小分子L755507和Brefeldin A能将大片段敲入效率提高2~3倍,还能将点突变效率增加9倍。

4.3 通过调控53BP1和BRCA1蛋白来增强HDR效率

53BP1是NHEJ和HDR之间修复选择的关键调节因子。CANNY等^[98]发现53BP1抑制剂(i53)通过阻断53BP1和H4K20ME2之间的相互作用并抑制53BP1在DSB处的积累而起作用,它在不同的人源细胞和小鼠细胞中使Cas9介导的HDR提高了5.6倍。而mdn53BP1通过竞争性抑制53BP1向DSB的招募来提高Cas9介导的HDR在HEK-293T细胞中的活性^[99]。最近,NAMBIAR等^[100]研究发现了DNA损伤反应(DDR)因子RAD18是Cas9诱导的HDR的一种有效增强子,RAD18以比53BP1更高的亲和力结合H2AK15Ub,从而抑制53BP1向DSB的募集来增强HDR效率。关于HDR途径的关键蛋白BRCA1,PINDER等^[90]表明,过度表达野生型BRCA1或其重组变体(BRCA1K1702M, BRCA1M1775R)的细胞也表现出Cas9诱导HDR的增加。

4.4 诱导Cas9活性与细胞周期同步来增加HDR效率

由于HDR途径发生在细胞S期和G₂期,将Cas9-DSB的形成限制在S/G₂期,使Cas9-DSB的形成与细胞周期同步可提高HDR效率。可通过添加细胞周期阻滞药物如Nocodazole、ABT751或RO-3306使Cas9-DSB的形成与细胞周期同步。将Nocodazole与预装配Cas9 RNP复合物的直接递送相结合,与非同步化细胞相比,经Nocodazole处理的HEK-293T细胞中Cas9介导的HDR增加了1.38倍,且对人原代成纤维细胞和胚胎干细胞中Cas9介导的HDR的增加也有效^[101]。ABT751显示出与Nocodazole相同的生物学功能,在IPSCs中提高6倍的靶向效率^[102]。LOMOVA等^[103]报道,经RO-3306(CDK1抑制剂)处理的人类造血干细胞

中HDR的比率增加。WIENERT等^[104]发现一种新型的靶向CDC7的小分子XL413, 它能使细胞周期短暂停滞在S期, 使HDR的效率提高3.5倍。由于它们存在潜在毒性, 所以它们在体内使用存在局限性。

5 总结与展望

利用CRISPR技术构建的大动物疾病模型能够推动对发病机制的探索和基因治疗等方面的研究进展。HDR介导的精确基因编辑技术为科学家提供了一种可以精确修饰基因组DNA的工具。提高这个工具的效率将有助于基因编辑技术应用于各个领域, 减少非特异性基因编辑事件, 提高基因靶向的安全性, 最终促进人类疾病模型建立和基因治疗研究的发展。

参考文献 (References)

- [1] LE C, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-23.
- [2] CHANG H, PANNUNZIO N R, ADACHI N, et al. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(8): 495-506.
- [3] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-70.
- [4] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-12.
- [5] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-33.
- [6] AL-SHAYEB B, SACHDEVA R, CHEN L X, et al. Clades of huge phage from across Earth's ecosystems [J]. *Nature*, 2020, 578(7795): 425-31.
- [7] KOONIN E V, MAKAROVA K S, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2017, doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
- [8] ISHINO Y, KRUPOVIC M, FORTERRE P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology [J]. *J Bacteriol*, 2018, 200(7): e00580-17.
- [9] LEE J, CHUNG J H, KIM H M, et al. Designed nucleases for targeted genome editing [J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(2): 448-62.
- [10] YIN H, XUE W, ANDERSON D G. CRISPR-Cas: a tool for cancer research and therapeutics [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, 16(5): 281-95.
- [11] MULLER M, LEE C M, GASUNAS G, et al. *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 636-44.
- [12] LEE C M, CRADICK T J, BAO G. The neisseria meningitidis CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(3): 645-54.
- [13] MUROVEC J, PIRC Z, YANG B. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(8): 917-26.
- [14] KIM E, KOO T, PARK S W, et al. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni* [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms14500.
- [15] RAN F A, CONG L, YAN W X, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 186-91.
- [16] HU Z, WANG S, ZHANG C, et al. A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus Auricularis* (SauriCas9) expands the DNA targeting scope [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18(3): e3000686.
- [17] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-6.
- [18] HU Z, ZHANG C, WANG S, et al. Discovery and engineering of small SlugCas9 with broad targeting range and high specificity and activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(7): 4008-19.
- [19] WU Z, ZHANG Y, YU H, et al. Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(11): 1132-8.
- [20] KIM D Y, LEE J M, SU B M, et al. Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(1): 94-102.
- [21] 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 [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [22] GAUDELIN 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 [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [23] MOK B Y, MORAES M, ZENG J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing [J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-7.
- [24] ANZALONE A V, RANDOLPH P B, DAVIS J R, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-57.
- [25] NIU Y, SHEN B, CUI Y, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos [J]. *Cell*, 2014, 156(4): 836-43.
- [26] YAN Q, ZHANG Q, YANG H, et al. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system [J]. *Cell Regen*, 2014, 3(1): 12.
- [27] HAI T, TENG F, GUO R, et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res*, 2014, 24(3): 372-5.
- [28] WANG X, YU H, LEI A, et al. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep13878.
- [29] ZOU Q, WANG X, LIU Y, et al. Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(6): 580-3.
- [30] PANKOWICZ F P, BARZI M, LEGRAS X, et al. Reprogram-

- ming metabolic pathways *in vivo* with CRISPR/Cas9 genome editing to treat hereditary tyrosinaemia [J]. *Nat Commun*, 2016, doi: 10.1038/ncomms12642.
- [31] YANG H, WANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-9.
- [32] YOSHIMI K, KUNIHITO Y, KANEKO T, et al. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes [J]. *Nat Commun*, 2016, doi: 10.1038/ncomms10431.
- [33] CUI Y, NIU Y, ZHOU J, et al. Generation of a precise Oct4-hrGFP knockin cynomolgus monkey model via CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination [J]. *Cell Res*, 2018, 28(3): 383-6.
- [34] JIANG W, LIU L, CHANG Q, et al. Production of wilson disease model rabbits with homology-directed precision point mutations in the ATP7B gene using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1332.
- [35] YAN S, TU Z, LIU Z, et al. A huntingtin knockin pig model recapitulates features of selective neurodegeneration in huntington's disease [J]. *Cell*, 2018, 173(4): 989-1002, e13.
- [36] YANG Y, WANG L, BELL P, et al. A dual AAV system enables the Cas9-mediated correction of a metabolic liver disease in newborn mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(3): 334-8.
- [37] LIU L, CAO J, CHANG Q, et al. *In vivo* exon replacement in mouse *Atp7b* gene by CRISPR/Cas9 system [J]. *Hum Gene Ther*, 2019, 30(9): 1079-92.
- [38] KIM K, RYU S M, KIM S T, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5): 435-7.
- [39] LIU Z, CHEN M, CHEN S, et al. Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2717.
- [40] XIE J, GE W, LI N, et al. Efficient base editing for multiple genes and loci in pigs using base editors [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2852.
- [41] WANG F, ZHANG W, YANG Q, et al. Generation of a Hutchinson—Gilford progeria syndrome monkey model by base editing [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(11): 809-24.
- [42] LEE H, LEE S, BAEK G, et al. Mitochondrial DNA editing in mice with DddA-TALE fusion deaminases [J]. *Nat Commun*. 2021, 12(1): 1190.
- [43] ROSSIDIS A C, STRATIGIS J D, CHADWICK A C, et al. In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes [J]. *Nat Med*, 2018, 24(10): 1513-8.
- [44] RYU S M, KOO T, KIM K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536-9.
- [45] MUSUNURU K, CHADWICK A C, MIZOGUCHI T, et al. In vivo CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 429-34.
- [46] PENG Y, CLARK K J, CAMPBELL J M, et al. Making designer mutants in model organisms [J]. *Development*, 2014, 141(21): 4042-54.
- [47] YANG H, REN S, YU S, et al. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6461.
- [48] YUN M, WU J, WORKMAN J L, et al. Readers of histone modifications [J]. *Cell Res*, 2011, 21(4): 564-78.
- [49] SCULLY R, XIE A. Double strand break repair functions of histone H2AX [J]. *Mutat Res*, 2013, 750(1/2): 5-14.
- [50] KAFER G R, LI X, HORII T, et al. 5-Hydroxymethylcytosine marks sites of DNA damage and promotes genome stability [J]. *Cell Rep*, 2016, 14(6): 1283-92.
- [51] ALEKSANDROV R, HRISTOVA R, STOYNOV S, et al. The chromatin response to double-strand DNA breaks and their repair [J]. *Cells*, 2020, 9(8): 1853.
- [52] BLACKFORD A N, JACKSON S P. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 801-17.
- [53] NOWSHEEN S, AZIZ K, AZIZ A, et al. L3MBTL2 orchestrates ubiquitin signalling by dictating the sequential recruitment of RNF8 and RNF168 after DNA damage [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(4): 455-64.
- [54] KREJCI L, ALTMANNOVA V, SPIREK M, et al. Homologous recombination and its regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(13): 5795-818.
- [55] INANO S, SATO K, KATSUKI Y, et al. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(5): 622-34.
- [56] SIZEMORE S T, MIAO W, WANG Y, et al. Pyruvate kinase M2 regulates homologous recombination-mediated DNA double-strand break repair [J]. *Cell Res*, 2018, 28(11): 1090-102.
- [57] CUI Y, DONG H, MA Y, et al. Strategies for applying nonhomologous end joining-mediated genome editing in prokaryotes [J]. *ACS Synth Biol*, 2019, 8(10): 2194-202.
- [58] HISANO Y, SAKUMA T, NAKADE S, et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep08841.
- [59] SHEN H, STRUNKS G D, KLEMANN B J, et al. CRISPR/Cas9-induced double-strand break repair in arabidopsis nonhomologous end-joining mutants [J]. *G3*, 2017, 7(1): 193-202.
- [60] BOBOILA C, JANKOVIC M, YAN C T, et al. Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(7): 3034-9.
- [61] NAKADE S, TSUBOTA T, SAKANE Y, et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9 [J]. *Nat Commun*, 2014, doi: 10.1038/ncomms6560.
- [62] SAKUMA T, NAKADE S, SAKANE Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCH systems [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(1): 118-33.
- [63] LEE S H, KIM S, HUR J K. CRISPR and target-specific DNA endonucleases for efficient DNA knock-in in eukaryotic genomes [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(11): 943-52.
- [64] SYMINGTON L S. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016, 51(3): 195-212.
- [65] CECCALDI R, RONDINELLI B, D'ANDREA A D. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(1): 52-64.
- [66] SREEJITH R, ZACHARY K, ROBERT E, et al. Single-strand annealing between inverted DNA repeats: pathway choice, par-

- icipating proteins, and genome destabilizing consequences [J]. *PLoS Genet*, 2018, 14(8): e1007543.
- [67] SHRIVASTAV M, DE HARO L P, NICKOLOFF J A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice [J]. *Cell Res*, 2008, 18(1): 134-47.
- [68] COOPER T J, WARDELL K, GARCIA V, et al. Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 329(1): 124-31.
- [69] HUSTEDT N, DUROCHER D. The control of DNA repair by the cell cycle [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 19(1): 1-9.
- [70] BERGS J W, KRAWCZYK P M, BOROVSKI T, et al. Inhibition of homologous recombination by hyperthermia shunts early double strand break repair to non-homologous end-joining [J]. *DNA Repair*, 2013, 12(1): 38-45.
- [71] ARNOULT N, CORREIA A, MA J, et al. Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN [J]. *Nature*, 2017, 549(7673): 548-52.
- [72] SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, et al. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(11): 698-714.
- [73] ANUCHINA A A, LAVROV A V, SMIRNIKHINA S A. TIRR: a potential front runner in HDR race-hypotheses and perspectives [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(3): 2371-9.
- [74] BUNTING S F, NUSSENZWEIG A. End-joining, translocations and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(7): 443-54.
- [75] MA H, MARTI-GUTIERREZ N, PARK S W, et al. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos [J]. *Nature*, 2017, 548(7668): 413-9.
- [76] WU Y, LIANG D, WANG Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-62.
- [77] WOLF D P, MITALIPOV P A, MITALIPOV S M. Principles of and strategies for germline gene therapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 890-7.
- [78] WILDE J J, AIDA T, DEL ROSARIO R C H, et al. Efficient embryonic homozygous gene conversion via RAD51-enhanced interhomolog repair [J]. *Cell*, 2021, 184(12): 3267-80, e18.
- [79] ZACHARY W J, CAMPBELL J M, GABRIEL M G, et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(11): 663-77.
- [80] PAWELCZAK K S, GAVANDE N S, VANDERVERE-CAROLZZA P S, et al. Modulating DNA repair pathways to improve precision genome engineering [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2): 389-96.
- [81] CARLSON-STEVERMER J, ABDEEN A A, KOHLENBERG L, et al. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1711.
- [82] VARTAK S V, RAGHAVAN S C. Inhibition of nonhomologous end joining to increase the specificity of CRISPR/Cas9 genome editing [J]. *FEBS J*, 2016, 282(22): 4289-94.
- [83] LIEBER M R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. *Annu Rev Biochem*, 2010, 79(1): 181-211.
- [84] MARUYAMA T, DOUGAN S K, TRUTTMANN M C, et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 538-42.
- [85] SINGH P, SCHIMENTI J C, BOLCUN-FILAS E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications [J]. *Genetics*, 2015, 199(1): 1-15.
- [86] CHU V T, WEBER T, WEFERS B, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 543-8.
- [87] LI G, LIU D, ZHANG X, et al. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, doi: 10.1016/j.biocel.2018.04.011.
- [88] ROBERT F, BARBEAU M, THIER S, et al. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing [J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 93.
- [89] FRANK K, SEKIGUCHI J, SEIDL K, et al. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV [J]. *Nature*, 1998, 396(6707): 173-7.
- [90] JORDAN P, JAYME S, GRAHAM D. Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(19): 9379-92.
- [91] JAYAVARADHAN R, PILLIS D M, MALIK P. A versatile tool for the quantification of CRISPR/Cas9-induced genome editing events in human hematopoietic cell lines and hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 102-10.
- [92] CAI Y, CHENG T, YAO Y, et al. In vivo genome editing rescues photoreceptor degeneration via a Cas9/RecA-mediated homology-directed repair pathway [J]. *Sci Adv*, 5(4): eaav3335.
- [93] KURIHARA T, KOUYAMA-SUZUKI E, SATOGA M, et al. DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(3): 621-8.
- [94] SHAO S, REN C, LIU Z, et al. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, doi: 10.1016/j.biocel.2017.09.012.
- [95] LING W, YANG L, GUO Y, et al. Enhancing targeted genomic DNA editing in chicken cells using the CRISPR/Cas9 system [J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169768.
- [96] TRAN N T, BASHIR S, LI X, et al. Enhancement of precise gene editing by the association of Cas9 with homologous recombination factors [J]. *Front Genet*, 2019, doi: 10.3389/fgene.2019.00365.
- [97] YU C, LIU Y, MA T, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(2): 142-7.
- [98] CANNY M D, MOATTI N, WAN L C K, et al. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR-Cas9 genome-editing efficiency [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(1): 95-102.
- [99] PAULSEN B S, MANDAL P K, FROCK R L, et al. Ectopic expression of RAD52 and dn53BP1 improves homology-directed repair during CRISPR-Cas9 genome editing [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(11): 878-88.
- [100] NAMBIAR T S, BILLON P, DIEDENHOFEN G, et al. Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engi-

- neered RAD18 variant [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3395.
- [101] LIN S, STAAHL B T, ALLA R K, et al. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery [J]. *eLife*, 2014, doi: 10.7554/eLife.04766.
- [102] YANG D, SCAVUZZO M A, CHMIELOWIEC J, et al. Enrichment of G₂/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep21264.
- [103] LOMOVA A, CLARK D N, CAMPO-FERNANDEZ B, et al. Improving gene editing outcomes in human hematopoietic stem and progenitor cells by temporal control of DNA repair [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(2): 284-94.
- [104] WIENERT B, NGUYEN D N, GUENTHER A, et al. Timed inhibition of CDC7 increases CRISPR-Cas9 mediated templated repair [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2109.