

基于类转录激活因子效应物 (TALEs) 的基因组定点操控技术

赵美威^{1,2}, 段承俐^{1,*}, 刘江^{2,*}

1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201

2. 中国科学院昆明动物研究所 中国科学院和云南省动物模型与人类疾病机理重点实验室, 云南 昆明 650223

摘要: 基于类转录激活因子效应物 (transcription activator-like effectors, TALEs) 的基因组定点操控技术能够对基因组功能体系的反向遗传操作于基因及转录水平进行精确操控。TALEs 是来源于植物病原菌—黄单胞杆菌 (*Xanthomonas* spp.) 的 DNA 结合蛋白, 其结合域通常由包含 34 个氨基酸残基的重复模块串联而成。根据编码规则, 可人为重新编排重复模块顺序使其能够识别新的 DNA 序列。该人工设计 TALEs 对基因组的定点操控 (包括转录调控和基因组编辑) 已在体外培养的人类细胞和多种模式生物中得到了成功应用, 为模式生物基因功能研究, 农作物性状改善及人类遗传性疾病治疗等开辟了新时代。

关键词: 类转录激活因子效应物; 转录调控; 基因组编辑; 双链断裂; 非同源末端连接; 同源重组

中图分类号: Q343.1 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)05-0509-10

Transcription activator-like effectors (TALEs) based genome engineering

Mei-Wei ZHAO^{1,2}, Cheng-Li DUAN^{1,*}, Jiang LIU^{2,*}

1. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms of Chinese Academy of Sciences & Yunnan Province, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: Systematic reverse-engineering of functional genome architecture requires precise modifications of gene sequences and transcription levels. The development and application of transcription activator-like effectors (TALEs) has created a wealth of genome engineering possibilities. TALEs are a class of naturally occurring DNA-binding proteins found in the plant pathogen *Xanthomonas* species. The DNA-binding domain of each TALE typically consists of tandem 34-amino acid repeat modules rearranged according to a simple cipher to target new DNA sequences. Customized TALEs can be used for a wide variety of genome engineering applications, including transcriptional modulation and genome editing. Such “genome engineering” has now been established in human cells and a number of model organisms, thus opening the door to better understanding gene function in model organisms, improving traits in crop plants and treating human genetic disorders.

Keywords: TALEs; Transcriptional modulation; Genome editing; Double-strand break; Non-homologous end joining; Homologous recombination

了解基因功能的关键在于对基因组的位点操控。人们对模式生物, 如黑腹果蝇、酵母及小鼠等的特异性基因转录及诱导突变调节在很大程度上促进了基因功能和生物学机制的研究。基因组操控首先在黑腹果蝇中通过锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 技术得以实现 (Bibikova et al, 2003; Bibikova et al, 2002)。ZFNs 是由真核生物转录因子—锌指蛋白 (zinc finger proteins, ZFPs) DNA 结合域及限制性内切酶 *FokI* 核酸酶结构域所组成的能

够对基因组进行定点编辑的融合蛋白 (Bibikova et al, 2001; Kim et al, 1996)。ZFN DNA 结合域能够使 ZFN 结合特定 DNA 序列, 并于基因组的特定位点产生双链断裂 (double-strand break, DSB), 随后, 通过细胞本身对双链断裂的修复来实现对基因组的定点编辑。经过~15 年的发展, ZFN 技术已经被成功应用于体外培养的人类细胞及多种模式生物, 甚至一期临床试验研究 (Urnov et al, 2010)。然而, 其固有的局限性也在很大程度上阻碍了 ZFN 技术

收稿日期: 2013-03-15; 接受日期: 2013-04-22

基金项目: 中国科学院昆明动物研究所青年人才项目 (Y302471081)

*通信作者 (Corresponding authors), E-mail: chengliduan@hotmail.com; liujiang@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 赵美威, 女, 硕士研究生, 研究方向为神经系统疾病基因治疗

的更广泛发展 (DeFrancesco, 2011), 例如, (1) 由于 ZFP 的氨基酸序列和它所识别的 DNA 序列之间并非一一对应, 且在自然界中无法找到能够识别三个连续核苷酸的锌指结构域, 故 ZFNs 靶位点的选择受到了很大限制; (2) 由于 ZFN 技术专利被 Sangamo BioSciences 公司所垄断, 且 ZFNs 的设计与合成技术难度很大, 因此, 对于大多数实验室而言, 该技术成本过高, 不适于广泛应用; (3) 可能由于在基因组的很多位点存在脱靶现象, 故 ZFN 技术的细胞毒性很强 (Carroll, 2008; Mani et al, 2005)。

近年来, 基于类转录激活因子效应物 (transcription activator-like effectors, TALEs) 的基因组操控技术的发展和有望弥补 ZFN 技术的局限性。TALEs 是来源于植物病原体——黄单胞杆菌 (*Xanthomonas* spp.) 的 DNA 结合蛋白, 被注入植物宿主后, 可与宿主特定基因的启动子结合, 从而调控该基因的转录, 并最终影响植物发病过程。2007 年, 首次报道了 TALEs 具有结合 DNA 的特性 (Romer et al, 2007)。两年以后, 两个独立研究组分别破译了 TALEs 识别 DNA 序列的编码法则 (Boch et al, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009)。TALEs 理论上可以识别任何 DNA 序列, 尽管该技术开发的时间相对较晚, 但是, 已经在酵母、植物、斑马鱼、大鼠和多种体外培养的人类细胞中得到了成功应用 (Sanjana et al, 2012)。研究者已经运用该技术成功上调了目的基因转录 (Geissler et al, 2011; Miller et al, 2011; Morbitzer et al, 2010; Sanjana et al, 2012; Zhang et al, 2011) 以及对基因组编辑 (Bogdanove & Voytas, 2011; DeFrancesco, 2011; Scholze & Boch, 2011; Tesson et al, 2011)。目前看来, TALEs 技术可以和 ZFNs 技术一样用于多物种的基因组定点操控, 并且在某些方面具有一定优势。

本文综述了近年来 TALEs 技术的发展和, 分类讨论了运用 TALEs 对内源基因进行转录调控和基因组编辑 (包括基因敲除和基因插入) 的策略, 并对该技术在基因组操控应用中的特异性及其相对于 ZFNs 技术的优势进行了探讨。

1 类转录激活因子效应物 (TALEs)

TALEs 是由多种黄单胞杆菌所分泌的天然细菌效应物蛋白, 主要通过调控宿主植物的基因转录, 从而促进黄单胞杆菌在植物体内的繁殖和扩散。天然 TALEs 主要由位于 N 端的转运信号

(translocation signal)、位于 C 端的核定位信号 (nuclear localization signals, NLS) 和转录激活结构域 (transcriptional activation domain, AD) 以及位于中间的 DNA 结合结构域三部分组成 (iii) (Boch & Bonas, 2010; Bogdanove et al, 2010)。DNA 结合结构域由包含 33~35 (通常为 34) 个氨基酸残基的重复单元串联而成, 介导 DNA 特异识别与结合 (图 1A)。天然 TALEs 所包含的重复单元数为 1.5~33.5 (Boch & Bonas, 2010)。每个重复单元序列高度保守, 主要区别在于第 12 和第 13 位的重复可变双残基 (repeat variant di-residue, RVD)。研究发现每个重复单元的 RVD 决定了其所识别的核苷酸, 且其识别遵循一个简单法则: NI=A, HD=C, NG=T, NN=G or A (图 1a) (Boch et al, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009)。另外, 最近的研究表明 NH 作为一种 RVD 也能够高效识别 G, 且特异性高于 NN (Streubel et al, 2012)。对 TALE 蛋白晶体结构的分析发现, 每个 TALE 重复单元由一个短 α 螺旋和一个长 α 螺旋通过一个包含 RVD 的环相连形成, 第 12 位的氨基酸残基主要起稳定 RVD 环的作用, 而第 13 位的氨基酸残基决定 TALE 蛋白所识别的核苷酸, 所有的重复单元相互连接在一起形成可以镶嵌在 TALE 蛋白所识别的 DNA 的大沟中的右手超螺旋结构 (Deng et al, 2012a; Mak et al, 2012)。TALE 蛋白识别核苷酸的简单法则和其晶体结构解释了 TALEs 识别 DNA 的特异性, 且由于每个重复单元与其所识别核苷酸一一对应, 因此, 理论上可以人为设计能够识别并结合任何 DNA 序列的 TALEs 蛋白。研究还发现 RVD 为 NG 的重复单元可以特异识别并结合 5-甲基胞嘧啶 (^mC), 即 TALEs 蛋白还可以识别甲基化的核苷酸 (Deng et al, 2012b)。目前尚不明确为什么自然界中发现的 TALEs 在植物基因组中所识别的 5'端第一个碱基总是 T (Boch et al, 2009; Moscou & Bogdanove, 2009), 以及为什么串联重复的 DNA 结合域总是以半个重复单元结束, 但是, 它们对于 TALEs 的活性均至关重要 (图 1a)。因此, TALEs 所识别的 DNA 序列的长度=完整重复单元数+2。如图 1B 中的 TALE 共包含 17 个完整重复单元, 但其所识别的碱基序列应为 "TGGAAGACCGCCAGGGGT", 共 19 个碱基。总之, TALE 蛋白识别核苷酸简单法则的破译以及其晶体结构的解析已经为 TALEs 在基因组定点操控中的应用奠定了理论基础。

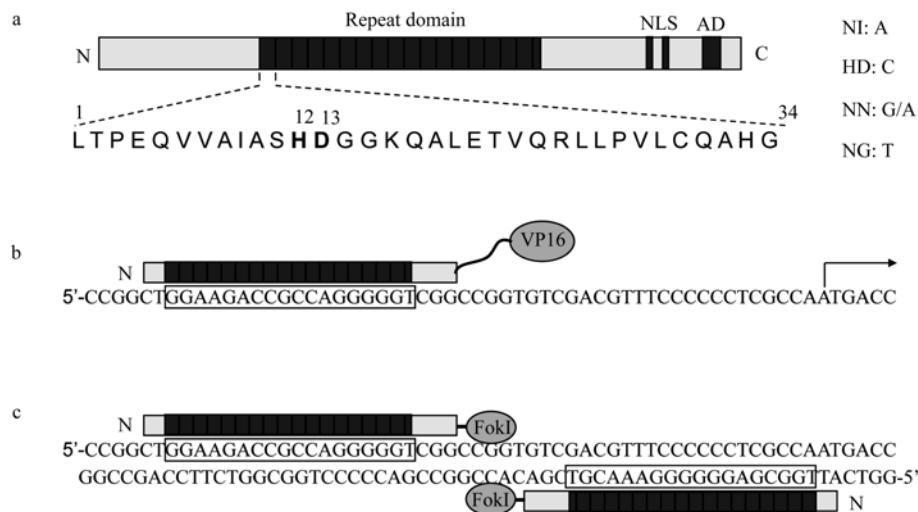


图 1 TALE 蛋白结构及其基因组操控模型

Figure 1 Structure and genome engineering model of TALE proteins

a: TALEs 由串联重复区域、核定位信号和转录激活结构域所组成，图中所显示的是来源于黄单胞杆菌的 TALE 蛋白 AvrBs3 的第一个串联重复单元结构，深色矩形代表能够识别 DNA 的串联重复单元；下方显示一个代表性重复单元的氨基酸序列，粗体标注的第 12 和第 13 位氨基酸代表能够识别特定核苷酸的 RVD；N 和 C 分别代表 N 端和 C 端；右侧显示 4 个常用 RVDs 各自所识别的核苷酸。b: 用于转录调控的 TALE 蛋白的结构，人为设计的 TALE 与转录激活结构域 VP16 相融合；下方为靶向基因启动子附近的 DNA 序列；矩形内核苷酸代表 TALE 蛋白所识别并与之结合的 DNA 序列；向右箭头代表靶向基因的转录起始位点；N 和 C 分别代表 N 端和 C 端。c: 人为设计的 TALENs 与其所识别的靶向基因核苷酸位点（矩形内碱基）的结合示意图；椭圆代表野生型 *FokI* 剪切结构域，它形成二聚体后可在目标位点产生 DSB；N 代表每个 TALEN 蛋白的 N 端。

a: TALEs contain central tandem repeats, NLS, and an AD; Shown is the sketch of the first repeat of AvrBs3 TALE protein from *Xanthomonas*; Dark rectangles indicate the central array of tandem repeats that mediate DNA recognition; A typical repeat sequence is provided below, with bold highlighting the RVD (positions 12 and 13), that determines base preference; N and C denote N and C termini; Base sequence preferences of four common RVDs [13,14] are shown on the right. b: Sketch of TALE proteins used for transcriptional modulation; The designed TALE is linked to the VP16 activation domain; The sequence at bottom shows the promoter-proximal region of the target gene; Boxed bases indicate the target site for the TALE repeat domain; The hooked arrow shows the start site of native target gene transcription; N denotes the N terminus. c: Sketch of the designed TALENs bound to their target sites (boxed bases) in the target locus; Ovals indicate the cleavage domain from wild-type *FokI*, which was the catalytic domain used for TALENs; N denotes the N terminus of each protein.

TALEs 技术要想成功应用，靶位点选择至关重要。从目前的研究结果来看，人工设计的 TALEs 所识别的 5'端第一个碱基必须为 T (Bogdanove & Voytas, 2011; Reyon et al, 2012)。此外，为了便于利用 TALEs 开展研究工作，许多实验室还建立了公开网站帮助研究人员预测和设计 TALEs 靶位点。例如：Bogdanove 和 Voytas 实验室建立的 TALE-NT 网站 (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>)、Joung 实验室建立的 ZiFiT 网站 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>) 和 Zhu 实验室建立的 idTALE 网站 (<http://idtale.kaust.edu.sa/>) 等。

TALEs 靶位点设计完成后，如何合成能够识别靶位点的 TALEs 蛋白就成为 TALE 技术中关键步骤和应用瓶颈。虽然，目前已有多种方法可解决该问题，多个生物技术公司（包括国内的公司）也已可提供 TALEs 合成服务，但是，对于大多数实验室来说，要想自己合成具有高活性的 TALEs 仍较有难度，因此，本文不深入探讨人工构建 TALEs。

2 基于 TALEs 的靶向转录调控

TALE 蛋白模块化的结构非常有利于人为设计转录因子来调控特定基因的转录。天然 TALEs 的主要功能是激活宿主易感基因的转录，从而促进病原体在宿主体内的繁殖和扩散 (Boch & Bonas, 2010; Bogdanove et al, 2010)。植物病原体黄单胞杆菌通过 III 型类注射器分泌系统将 TALEs 注入宿主细胞，然后 TALEs 被转运到细胞核，并通过 DNA 结合域与目标基因转录起始位点上游序列结合来激活目标基因转录。因此，可通过人为融合 TALEs 与转录激活结构域 (AD) 或者转录抑制结构域 (RD) 来调控内源基因转录 (Bogdanove & Voytas, 2011)。

通过融合人为设计的 TALEs 与内源转录激活结构域、来源于单纯疱疹病毒的 VP16 转录激活结构域 (图 1b) 或者 VP16 四聚体衍生物 VP64，已有多个研究组成功实现了基因转录的靶向激活 (Geissler et al, 2011; Miller et al, 2011; Morbitzer et

al, 2010; Sanjana et al, 2012; Zhang et al, 2011)。通过与转录起始位点上游序列特异性结合, TALE-ADs 可通过特异性招募转录复合体来起始基因转录。这些人工合成的 TALE-ADs 可在植物中(Geissler et al, 2011; Morbitzer et al, 2010) 及体外培养的人类细胞中起作用 (Geissler et al, 2011; Miller et al, 2011; Sanjana et al, 2012; Zhang et al, 2011), 通常可以使目的基因表达增加 20 倍以上。在相同条件下, 人为设计并合成的特异性 TALE-ADs 与 ZF-VP64 具有相似甚至更好的作用效果 (Zhang et al, 2011)。另外, 在植物中, 使用内源转录激活结构域效果优于 VP16, 但是, 在体外培养的人类细胞中, 情况却正好相反 (Geissler et al, 2011)。同样, 通过融合人为设计的 TALE 与转录抑制结构域即可特异性抑制基因转录 (Bogdanove & Voytas, 2011)。

虽然, 大多数人工合成的 TALE-ADs 具有很强的激活转录能力, 但效果却相去甚远, 即可能存在其它影响 TALEs 与 DNA 结合的因素 (Zhang et al, 2011), 例如, 每种 RVD 与 DNA 结合强弱的差别、TALEs 结合位点在基因组中的不同位置以及哺乳动物基因转录过程的复杂性等 (Boch et al, 2009; Miller et al, 2011; Scholze & Boch, 2010)。但是, 这些因素的具体影响尚不明确。另外, 由于人工合成的 TALE-ADs 以单体形式作用, 故可以预期其作用特异性低于以二聚体形式作用的 TALENs (见下文)。事实上, 首例在拟南芥中将合成 TALE-ADs 用于激活目的基因的研究中, 共合成了两个 TALE-ADs, 并预测了其在拟南芥基因组的四个可能脱靶位点, 每个脱靶位点均具两个碱基错配, 而实验证明, 仅其中一个脱靶位点的转录被激活 (Morbitzer et al, 2010)。通过改变合成 TALEs 所识别的核苷酸的序列来研究错配位点的位置和数目对 TALE 活性的影响, Zhang et al (2011) 的研究显示错配位点数目与 TALE 活性成反比。该结论与前人观察一致, 即不同错配数目, 或不同错配位置, 对 TALE 活性的影响也不同, 即使是单个位点的错配有时候也会使 TALE 完全失去活性 (Bogdanove et al, 2010)。然而, TALE 识别 DNA 的特异性最有可能是由结合位点的位置、染色质状态及错配数目共同作用决定 (Boch et al, 2009; Bogdanove & Voytas, 2011; Kay et al, 2009; Romer et al, 2009; Scholze & Boch, 2010; Zhang et al, 2011)。因此, 需要对错配数目范围、适合的结合位点位置以及染色质状态等

对 TALEs 特异性的影响进行深入研究。

3 基于 TALENs 的基因组靶向编辑

在模式生物中, 靶向编辑基因组可有效促进基因插入、敲除和矫正, 其关键在于在目标位点准确引入双链断裂 (DSB)。产生的 DSB 能够通过两个在真核细胞中高度保守的修复方式进行修复, 即非同源末端连接修复 (non-homologous end joining, NHEJ) 和同源重组修复 (homologous recombination, HR) (Urnov et al, 2010)。NHEJ 能够快速有效地重新连接断裂末端, 在该过程中会于连接位点引入小的插入或缺失, 从而造成目的基因移码突变并失去原有功能。而 HR 需要一个携带有断裂位点两端遗传信息的同源 DNA 臂来实现基因定点矫正 (少数核苷酸的改变) 或定点插入一个新基因。这两种高度保守的 DNA 损伤修复方式可被用于对体外培养细胞或模式生物进行基因组靶向编辑。要想在特定位点产生 DSB 就需要具高保真 DNA 识别和定点切割功能的蛋白, 序列特异的类转录激活因子效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs) 正好具备该功能。

与 ZFNs 相似, TALENs 亦为通过将 TALE 的 DNA 结合结构域与 *FoKI* 限制性内切酶的非特异性核酸酶结构域融合所产生的能够被用于基因组靶向编辑的蛋白 (图 1c) (Bogdanove & Voytas, 2011; Scholze & Boch, 2011)。DNA 结合结构域能够使 TALEN 与目标 DNA 序列结合, 然后 *FoKI* 切割目标 DNA 并产生 DSB。*FoKI* 需要形成二聚体以产生活性, 因此, 通常会设计两个结合位点很接近的 TALENs, 以便 *FoKI* 能够形成二聚体并在两个 TALENs 结合位点之间产生 DSB, 进而诱使细胞进行定点 NHEJ 或者 HR 修复 (Bogdanove & Voytas, 2011; DeFrancesco, 2011; Li et al, 2011; Scholze & Boch, 2011; Wood et al, 2011; Zhang et al, 2011)。该基因组编辑方式是通过在特定基因组位点引入 DSB 并诱使细胞对产生的 DSB 进行预期修复来实现的对基因组准确而有效的遗传修饰。用于引入 DSB 的 TALENs 是人工设计的序列特异核酸内切酶, 可根据需要来选择所要切割的位点。下文将分类讨论利用 TALENs 所进行的成功基因组靶向编辑及其应用。

3.1 基于非同源末端连接的基因敲除

目前, TALENs 技术在基因组编辑中最简单、

最广泛的应用为基因敲除。它利用 NHEJ 修复过程中引入的不正确插入或缺失来干扰或敲除一个基因或者一个基因组区段的功能。在过去三年里, 该技术已在很多物种以及体外培养细胞中实现了基因定点敲除。

3.1.1 在模式生物中的基因敲除

酵母是第一个成功利用 TALENs 技术实现基因定点敲除的模式生物 (Cermak et al, 2011; Christian et al, 2010; Li et al, 2011)。通过将 ZFNs 中的 DNA 识别域替换为两个研究较为透彻的天然 TALEsDNA 识别域, 即来源于胡椒的病原体 *Xanthomonas campestris* pv. 的 AvrBs3 及来源于水稻病原体 *X. oryzae* pv. *Oryzae* 的 PthXo1, 产生了能够识别和切割目标 DNA 的 TALENs。这两个 TALENs 在酵母中切割目的 DNA 的活性可通过 LacZ 的活性来检测。结果表明它们都能够有效切割目标位点, 其中 PthXo1 TALEN 的活性与 ZFN 阳性对照很接近 (Christian et al, 2010)。另一项研究开发了一种能够有效组装 TALEN 重复序列的方法, 同时, 还基于自然界中发现的 TALEs 的特性开发了可用于人工设计 TALENs 的软件 (Cermak et al, 2011)。研究者还针对 15 个目标位点制作了 30 个 TALENs, 并在酵母中检测了这 15 对 TALENs 切割目的 DNA 的能力。结果显示, 与阴性对照相比, 这 15 对 TALENs 均具显著切割目的 DNA 的活性, 其中 14 对的切割活性均不低于 ZFN 阳性对照活性的 25%。

以天然 TALE Hax3 为骨架针对新的目标位点设计并合成的 TALENs 及其在烟草叶片中的短暂表达说明, 新的 TALENs 可以在目标位点产生 DSB, 且所产生的 DSB 紧接着就会通过 NHEJ 进行修复 (Mahfouz et al, 2011)。

目前 TALEN 技术也已被成功用于大鼠基因组的靶向敲除 (Tesson et al, 2011), 这正好可以与此前运用 ZFN 技术对大鼠所进行的基因组修饰结果进行比较 (Buehr et al, 2008; Cui et al, 2011; Geurts et al, 2009; Li et al, 2008)。通过将不同剂量编码 TALENs 的核酸 (DNA 和 mRNA) 注射到单细胞大鼠胚胎中来检测其改变目的基因序列的能力。总体而言, 9.5% 的注射了 DNA 的大鼠胚胎和 58% 的注射了 mRNA 的大鼠胚胎在 *IgM* 位点发生突变。*IgM* 位点的突变比例是于注射的 TALEN 剂量相关, 最高为 75% (注射的 mRNA 浓度为 10 ng/ μ L 及 4 ng/ μ L)。另外, 经过 TALEN 技术产生的突变还可通过生殖

细胞传到下一代。与此前运用 ZFN 技术对大鼠 *IgM* 基因进行突变的结果相比 (Geurts et al, 2009), 当以 DNA 注射时, TALEN 技术和 ZFN 技术的突变比例一致 (9%)。然而, 当以 mRNA 注射时, TALEN 技术的突变比例 (59%) 要高于 ZFN 技术 (19%)。另外, 以 TALEN 技术注射的胚胎所得到的新生大鼠个体比例 (25%) 也高于 ZFN 技术 (13%)。因此, 从某种程度上来说, TALEN 技术对大鼠进行基因组编辑的应用要比 ZFN 技术更具优势 (Tesson et al, 2011)。

约一半世界人口均靠水稻养活, 但是, 由水稻白叶枯菌 (*X. oryzae*) 所引起白叶枯病对水稻产量具有很强的破坏性。目前, 研究人员已经成功利用 TALEN 技术对白叶枯菌易感基因 *OsIIN3* 进行了修饰, 使水稻对该菌具有了抗性 (Li et al, 2012)。白叶枯菌能够利用自身的 TALEs AvrXa7 或者 PthXo3, 来激活水稻 *OsIIN3* 基因表达, 从而可以利用水稻细胞里的糖分来满足白叶枯菌自身的营养需求 (Antony et al, 2010; Chen et al, 2012)。*OsIIN3* 基因的启动子区有一个天然 TALE AvrXa7 的结合位点, 该位点与另一个天然 TALE PthXo3 的结合位点相重叠。研究人员针对这两个天然 TALEs 结合位点的重叠区域设计了 TALENs, 既可以阻止白叶枯菌的 TALEs AvrXa7 和 PthXo3 结合 *OsIIN3* 基因的启动子区, 又不会影响 *OsIIN3* 基因的正常功能, 编码 TALENs 的质粒可通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 转入到水稻胚胎细胞中。实验证明 TALENs 修饰的 *OsIIN3* 基因不能够再被白叶枯菌自身的 TALEs AvrXa7 或者 PthXo3 所诱导 (Li et al, 2012)。

迄今为止, TALEN 技术在斑马鱼基因组编辑中的应用最为成功。为检测 TALENs 在斑马鱼体细胞中的活性以及比较 TALENs 和 ZFNs 在基因编辑中的效率, 研究人员针对斑马鱼的两个内源基因, *gria3a* 和 *hey2*, 分别设计了 3 对和 1 对 TALENs。结果显示这 4 对 TALENs 都能够在目标位点有效引入突变, 频率为 11%~33%。该频率与在同样位点用 ZFNs 所得到的频率相差不大。但是, 该研究并未证明由 TALENs 所引入的突变是否可遗传 (Sander et al, 2011)。另一个研究组发展了可以组装任意数目 TALE 重复单元的方法, 即“分单元组装 (unit assembly)”, 并证明该方法合成的 TALENs 可在斑马鱼基因组中有效产生可遗传变异 (Huang et al,

2011)。一年后,TALEN技术在斑马鱼基因组编辑中的应用得到了进一步完善和简化(Dahlem et al, 2012)。研究人员还发展了基于Golden Gate克隆来快速组装TALE重复单元的方法(Cermak et al, 2011)。同时,另一个研究组发展了能够有效、灵敏检测由TALENs所引入的突变频率的方法,及高分辨率溶解分析(high resolution melt analysis)。使用该方法,所有注射了TALEN mRNA的斑马鱼胚胎均可在目标位点引入突变,~90%的胚胎能够发育成携带新突变的成体。基因组上的很多位点都能够用这种方法引入突变,包括靠近端粒的*gol*基因及一些不表达的基因位点(Dahlem et al, 2012)。使用经改造的Goldy TALEN骨架和斑马鱼递送系统,改进的TALEN技术可在斑马鱼体细胞和生殖细胞中高效引入定点突变。某些位点的突变频率~100%,且其中某些个体的两个等位基因均可被引入突变(Bedell et al, 2012)。

3.1.2 体外培养人类细胞中的基因敲除

目前,已在多种体外培养人类细胞中运用TALEN技术实现了基因定点敲除(Cermak et al, 2011; Miller et al, 2011; Mussolino et al, 2011; Reyon et al, 2012; Sanjana et al, 2012)。如前所述,Cermak et al (2011)开发了能够有效组装TALEN重复单元的方法,同时还基于自然界TALEs的特性开发了用于人工设计TALENs的软件。为了验证用这套方法所设计并合成的TALENs在人类细胞中的作用效果,他们针对人*HPRT1*基因设计合成了一对TALEN,并用于人胚胎肾细胞(HEK293T)以检测其在目的基因上引入定点突变的效果。结果表明,这对TALEN能够在目的基因上通过对染色体上断裂位点的不准确NHEJ修复方式有效引入突变,共检测到17种独立突变类型,包括位于两个TALEN之间的突变范围在1~27 bp的替换和缺失。通过体外对天然TALE蛋白AvrBs4的大批突变型活性检验,Mussolino et al (2011)建立了能够高效剪切目的DNA的TALEN骨架,并基于此合成了针对*CCR5*和*IL2RG*两个基因的TALENs。这两个基因亦为此前在人HEK293T细胞中运用ZFN技术进行基因组编辑的位点,结果显示,~45%的细胞在目标位点被成功引入突变。TALEN技术在引入突变的效率方面与ZFN技术相差不大,但细胞毒性显著降低。Miller et al (2011)也构建了能够在人K562细胞中有效改变内源基因*NTF3*和*CCR5*序列的TALEN

骨架。首先,以柑橘黄单胞杆菌(*Xanthomonas axonopodis pathovar citri*)来源的几个天然TALEs的结构建立了TALE骨架结构,然后,根据所构建的TALE骨架结构针对*NTF3*基因设计一对TALEN,并将其在人K562细胞中表达来检测其在目标位点进行基因修饰的效果。结果观察到~9%的细胞在目标位点发生基因突变,在NHEJ修复过程中,TALENs还可在K562细胞的*NTF3*基因位点引入寡核苷酸双链。他们还在另外一个内源基因*CCR5*证明了TALENs介导的基因修饰,并共针对*CCR5*基因设计了4对TALENs。结果发现,这4对TALENs都能够在K562细胞的*CCR5*位点有效引入突变,突变频率>20%。Sanjana et al (2012)利用分级链接原理建立了能够快速构建TALEs的方法,该方法可在一周内完成TALENs的构建,且可同时构建针对多个位点的TALENs。他们还建立了在哺乳动物细胞内检测所构建TALENs是否具有活性的方法,并使用该方法设计合成了针对人*AAVS1*基因的TALENs,检测发现其能够在人293FT细胞中对3.6%的细胞进行定点基因编辑。紧接着,Reyon et al (2012)也建立了基于固相连接可自动化控制的高通量构建TALENs的方法,被称为FLASH系统。对于组装大量TALENs来说,FLASH系统既快速又经济。他们在人U2OS细胞中使用eGFP报告系统检测了用FLASH系统组装的48对TALENs的活性。结果显示,这48对TALENs都能够在目标位点进行有效基因编辑。他们还用FLASH系统针对96个可能与癌症或者表观遗传调控相关的人类内源基因组装了TALENs,在U2OS细胞中检测发现其中84对TALENs能够在目标位点有效引入突变。以上结果显示,FLASH系统可以使TALEN技术成为有效、快速、高通量的基因组编辑工具,且在目前技术条件下,这是ZFN技术所无法实现的。

3.2 基于同源重组的基因组编辑

TALEN技术的另一个重要应用是当其在基因组上产生双链断裂以后,可激发同源重组修复方式修复断裂双链,并在该过程中,于双链断裂位置插入一个外源DNA片段。这种基于同源重组的基因组编辑方式除了需要有位点特异的TALENs外,还需要一个携带有断裂位点两端遗传信息的同源DNA臂来实现对一个内源基因的定点矫正(少数核苷酸的变化)或者在一个特定的内源位点插入一个

新基因。

基于同源重组的TALEN基因组编辑技术已在酵母、斑马鱼、体外培养人类细胞以及人多能干细胞中得到了实现 (Bedell et al, 2012; Hockemeyer et al, 2011; Li et al, 2011; Miller et al, 2011)。将一对TALENs在酵母细胞内表达后, 目标位点产生DSB, 紧接着通过HR对目标位点进行基因组编辑的效率与ZFNs技术相差不大 (Li et al, 2011)。Bedell et al (2012) 改进了TALEN系统, 并基于该系统, 在斑马鱼基因组中成功使用一个DNA寡核苷酸单链通过HR方式准确将目标位点DNA序列进行了编辑, 同时, 还进一步证明该编辑可通过生殖细胞传递到下一代。Miller et al (2011) 为证明所建立的TALEN骨架能够通过HR进行基因组编辑, 从24对TALEN中选取通过NHEJ进行基因组编辑时活性最高的两对来进行验证, 将这两对TALEN和一个能够在目标位点插入46 bp核苷酸的供体DNA片段转入K562细胞, 观察到多至16%的等位基因在目标位点插入了46 bp的供体DNA片段。在人多能干细胞中进行定点基因组编辑是充分发挥其潜能的前提, 为检测TALEN技术对人胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 和诱导式多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC) 进行基因组编辑的效率, Hockemeyer et al (2009, 2011) 针对3个内源基因*PPP1R12C*, *OCT4* 和 *PITX3* 设计了TALENs, 这3个基因此前也用ZFNs进行过基因编辑。TALEN的表达质粒和包含了同源序列的供体质粒通过电穿孔法被转入到ESCs和iPSCs中。共检测5个基因组位点, 结果显示, 在*OCT4* 的第一个外显子上, 67%~100%的细胞在目标位点插入了目的DNA片段, 在*OCT4* 的终止密码子位点为2%~46%, 在*PPP1R12C*位点为~50%, 在*PITX3* 基因 (该基因在人多能干细胞中不表达) 的起始密码子位点为1%~13%, 在*PITX3* 基因的终止密码子位点为19%~23%。这些效率跟此前用ZFNs对同样位点进行基因编辑的效率很相近 (Hockemeyer et al, 2009)。值得注意的是, 无论是在多能干细胞中还是在已分化细胞中, TALEN和ZFN技术都能够在*PPP1R12C*得到很高的转基因效率 (Hockemeyer et al, 2011)。总之, 这些研究说明TALEN技术是进行基于同源重组的基因组定点编辑的有效工具。

虽然用ZFN技术进行基于同源重组的基因定点矫正已在体外培养人类细胞、黑腹果蝇和植物中得到了实现 (Urnov et al, 2010), 但是, 运用TALEN

技术进行基因定点矫正目前还没有报道。这种方式是通过TALENs在基因组上的特定位点产生DSB, 然后再通过供体DNA片段在目标位点上进行单个或少数碱基的矫正。该技术可以通过对一些关键位点进行点突变来进行基因功能和遗传性疾病的研究。类似研究已经由ZFN技术得到了实现 (Urnov et al, 2010)。基于TALEN技术的基因定点矫正也应该能像ZFN技术一样有效, 但需要在将来的研究中进行验证。

3.3 TALEN 技术在基因组编辑应用中的特异性及其优势

核酸酶的特异性对TALENs的广泛应用至关重要。通常来说, 非特异剪切 (脱靶效应) 会降低目标位点的基因修饰, 并导致细胞毒性。一个脱靶位点的存在就可能对整个基因编辑的失败, 若用于疾病治疗, 则可能会产生严重副作用。可能由于在基因组上存在多个脱靶位点而导致的细胞毒性, ZFN技术的发展和已受到了很大制约 (Carroll, 2008; Mani et al, 2005)。相比之下, TALENs对于其所识别DNA序列的碱基变化具有高度敏感性, 3~4个碱基突变即可阻止TALENs与DNA的结合 (Boch et al, 2009; Morbitzer et al, 2010; Zhang et al, 2011), 即对于TALENs而言, 脱靶效应可能很有限。事实上, 已有很多针对TALENs脱靶效应的研究, 且大部分研究显示TALENs比ZFNs具有更高的特异性和更小的细胞毒性。

脱靶效应部分是由TALE蛋白的DNA结合域与DNA的非特异性结合所导致, 部分是由*FokI* 核酸内切酶的非特异切割所导致。首先, 要保证TALENs能够有效剪切目的DNA, 两个TALENs结合位点之间需要有合适的间隔距离以便*FokI* 能够形成二聚体, 该间隔距离也将影响TALE蛋白与DNA的非特异性结合。根据不同TALEN骨架结构, 已经报道的合适间隔距离为6~40 bp, 但是, 所有这些TALEN骨架结构的最佳间隔距离为10~30 bp (Christian et al, 2010; Li et al, 2011; Miller et al, 2011; Mussolino et al, 2011)。有功能的间隔距离长度范围表明, 在保证*FokI* 能够形成二聚体的情况下, 设计TALEN蛋白所识别的DNA序列时具有一定的灵活性。根据Bogdanove & Voytas (2011) 的评论, 一个包含最短DNA结合结构域和最佳TALE蛋白与*FokI* 之间连接距离的TALEN骨架的间隔距离范围也较小, 从而能够提高其特异性。然而, 通过系统

设计和检测不同识别位点长度 TALENs 的活性后,并未发现 TALENs 识别位点长度与其细胞毒性之间存在负相关 (Reyon et al, 2012)。在以 EGFP 为报告基因的实验中,较短的 TALENs 和较长的 TALENs 具有同样的剪切活性,但是,较短的 TALENs 通常具有较强的细胞毒性。这可能是由于较短的 TALENs 更可能与非特异性位点结合。这些发现提示,通过合成更长的 TALENs (例如包含 14.5~19.5 个重复单元)也许可以把 TALENs 的细胞毒性降到最低,但该假说需要进一步验证。其次,重复单元组成可能也会影响 TALENs 特异性。这是因为同一个核苷酸对不同 RVD 的偏好性有差别,而且不同 RVDs 与其所识别的核苷酸之间的相对亲和力和力也不同。研究提示一个 TALE 蛋白中应该包含几个(如 3~4 个)被适当隔开的亲和力较强的 RVDs 来保其完整活性 (Streubel et al, 2012)。如果需要提高 G 的特异性,应该选择 NH 或者 NK 作为 RVDs,但是,如果要提高 TALEs 的整体效率,就应该选择 NN 作为 G 的 RVDs。如果一个 TALE 蛋白主要由亲和力较弱的 RVDs (如 NI、NG 或者 NK) 组成,设计时就需要更加小心,尽量使它也包含一些亲和力较强的 RVDs (如 HD 或 NN) (Streubel et al, 2012)。另外,由于 *FokI* 要形成二聚体才具有活性,所以要剪切双链 DNA 就需要有两个结合位点彼此接近的 TALENs。也就是说,TALENs 必须是在成对的时候才具有活性,这就使得 TALENs 在通常情况下都应该具有很高的特异性。然而,当在一个细胞中表达两个 TALENs 的时候,通过 *FokI* 的结合能够使两个 TALENs 形成同源和异源二聚体,但是,只有异源二聚体才具有我们需要的特异性。因此,同源二聚体的存在增加了 TALENs 进行非特异性剪切的可能。为此,已有研究组对 *FokI* 进行了改造,使得只有 *FokI* 的异源二聚体才具有剪切活性,在一定程度上降低了 TALENs 的脱靶效应 (Doyon et al, 2011; Miller et al, 2007)。

虽然 TALENs 的脱靶效应还没有经过全面研究,但是,即使和野生型 *FokI* 融合,TALENs 的细胞毒性相对于 ZFNs 来说可能较低。将四个酵母菌株分别用 TALENs 或者 ZFNs 处理以后进行全基因组序列分析,仅发现了少数几个可能是偶发的突变位点 (Li et al, 2011)。Miller et al (2011) 通过捕获 TALENs 所结合的 DNA 片段发现所捕获的 DNA 序列与 TALENs 的识别序列一致。人干细胞通过

TALEN 技术进行基因组编辑以后,研究人员检测了 19 个最可能的 TALENs 脱靶位点,发现其中的 17 个都没有发生任何变化,剩下的两个位点的突变率比靶位点分别低 169 及 1140 倍。也就是说,即使有少数脱靶位点,TALENs 在该位点的剪切效率也非常低 (Hockemeyer et al, 2011)。比较 TALEN 和 ZFN 技术在人 *CCR5* 基因位点上的编辑效率发现,TALENs 的细胞毒性显著低于 ZFNs,TALENs 具有更高的特异性 (Mussolino et al, 2011)。在斑马鱼中进行的基因可遗传敲除实验表明,9 个可能的脱靶位点突变率并没有高于对照组 (Huang et al, 2011),TALENs 所表现的毒性与 ZFNs 并没有显著差异 (Sander et al, 2011),且脱靶效应发生的频率非常低,不会对目的基因功能研究产生影响 (Dahlem et al, 2012)。大鼠实验中的 9 个可能的脱靶位点中,只有一个检测到突变 (Tesson et al, 2011)。通过不断完善检测 TALENs 脱靶效应的技术,也许会发现更多的脱靶位点 (Gabriel et al, 2011; Pattanayak et al, 2011)。就像最近用 ZFNs 在人多能干细胞中 (Yusa et al, 2011) 以及用 TALENs 在酵母中 (Li et al, 2011) 所做的基因修饰研究一样,全外显子组或者全基因组测序将是检测脱靶位点的有效方法。

4 结 论

TALE 蛋白模块化结构与一一对应 DNA 识别法为在哺乳动物细胞和模式生物中进行位点特异的转录调控和基因组编辑提供了极具吸引力的解决方案。这种序列特异的 DNA 结合蛋白能够特异性与目的 DNA 结合,而且对于大多数实验室来说,可以用经济的分子生物学技术在短短几天内合成所需要的 TALE 蛋白。尽管如此,TALE 蛋白的更广泛应用仍需对很多问题进一步深入研究。包括 TALE 蛋白与 ZF 蛋白相比具有哪些优势、TALE 蛋白与 DNA 特异性结合的机制、造成 TALE 蛋白脱靶效应的因素以及在体内 TALE 蛋白与甲基化的 DNA 的亲合性如何等。TALENs 能否像 ZFNs 一样能够被有效用于临床实验也需要进一步研究。从作用机制上来说,需要特别关注表观遗传修饰、染色质结构以及其他一些 DNA 结合蛋白的存在是否会影响 TALEs 的功能和特异性,TALEs 与 DNA 结合的调控机制目前也不清楚。对 TALEs 与 DNA 相互作用的分子基础的深入研究将有助于提高

TALEs 在应用上的准确性、特异性和效率。由于 TALEs 能够有效地将转录激活因子 (如 VP16) 固定在特定内源基因的启动子上来激活目标基因转录, 因此, 其它的一些功能性分子, 如重组酶和表

观遗传修饰酶, 也应该同样可用于对特定位点进行基因组操控。总之, 基于 TALEs 的基因组操控技术将为科研人员、临床医师和技术人员提供一种全新的、程序化的和精确的基因组操控技术。

参考文献:

- Antony G, Zhou J, Huang S, Li T, Liu B, White F, Yang B. 2010. Rice xa13 recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene Os-11N3. *The Plant Cell*, **22** (11) : 3864-3876.
- Bedell VM, Wang Y, Campbell JM, Poshusta TL, Starker CG, Krug li RG, Tan W, Penheiter SG, Ma AC, Leung AY, Fahrenkrug SC, Carlson DF, Voytas DF, Clark KJ, Essner JJ, Ekker SC. 2012. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature*, **491** (7422) : 114-118.
- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, **161** (3) : 1169-1175.
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, **300** (5620) : 764.
- Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, Chandrasegaran S. 2001. Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Molecular and Cellular Biology*, **21** (1) : 289-297.
- Boch J, Bonas U. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology*, **48**(1) : 419-436.
- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, **326** (5959) : 1509-1512.
- Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, **333** (6051) : 1843-1846.
- Bogdanove AJ, Schornack S, Lahaye T. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **13** (4) : 394-401.
- Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL, Smith A. 2008. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, **135** (7) : 1287-1298.
- Carroll D. 2008. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy*, **15** (22) : 1463-1468.
- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, **39** (12) : e82.
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science*, **335** (6065) : 207-211.
- Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, **186** (2) : 757-761.
- Cui XX, Ji D, Fisher DA, Wu YM, Briner DM, Weinstein EJ. 2011. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, **29** (1) : 64-67.
- Dahlem TJ, Hoshijima K, Juryneć MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, Weis AM, Voytas DF, Grunwald DJ. 2012. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genetics*, **8** (8) : e1002861.
- DeFrancesco L. 2011. Move over ZFNs. *Nature Biotechnology*, **29** (8) : 681-684.
- Deng D, Yan C, Pan X, Mahfouz M, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N. 2012a. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, **335** (6069) : 720-723.
- Deng D, Yin P, Yan CY, Pan XJ, Gong XQ, Qi SQ, Xie T, Mahfouz M, Zhu JK, Yan N, Shi YG. 2012b. Recognition of methylated DNA by TAL effectors. *Cell Research*, **22** (10) : 1502-1504.
- Doyon Y, Vo TD, Mendel MC, Greenberg SG, Wang J, Xia DF, Miller JC, Urnov FD, Gregory PD, Holmes MC. 2011. Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures. *Nature Methods*, **8** (1) : 74-79.
- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, Miller JC, Genovese P, Kaeppl C, Nowrouzi A, Bartholomae CC, Wang J, Friedman G, Holmes MC, Gregory PD, Glimm H, Schmidt M, Naldini L, von Kalle C. 2011. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nature Biotechnology*, **29** (9) : 816-823.
- Geissler R, Scholze H, Hahn S, Streubel J, Bonas U, Behrens SE, Boch J. 2011. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS One*, **6** (5) : e19509.
- Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Menoret S, Anegón I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, **325** (5939) : 433.
- Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, Katibah GE, Amora R, Boydston EA, Zeitler B, Meng X, Miller JC, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, **27** (9) : 851-857.
- Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassady JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitler B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature Biotechnology*, **29** (8) : 731-734.
- Huang P, Xiao A, Zhou MG, Zhu ZY, Lin S, Zhang B. 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nature Biotechnology*, **29** (8) : 699-700.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Wieduwild R, Bonas U. 2009. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors

- AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *The Plant Journal*, **59** (6) : 859-871.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93** (3) : 1156-1160.
- Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF, Ying QL. 2008. Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, **135**(7): 1299-1310.
- Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature Biotechnology*, **30** (5) : 390-392.
- Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. 2011. TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Research*, **39** (1) : 359-372.
- Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, Wibowo A, Fang X, Zhu JK. 2011. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** (6) : 2623-2628.
- Mak AN, Bradley P, Cernadas RA, Bogdanove AJ, Stoddard BL. 2012. The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*, **335** (6069) : 716-719.
- Mani M, Smith J, Kandavelou K, Berg JM, Chandrasegaran S. 2005. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **334** (4) : 1191-1197.
- Miller JC, Holmes MC, Wang JB, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ. 2007. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, **25** (7) : 778-785.
- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ. 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, **29** (2) : 143-148.
- Morbitzer R, Romer P, Boch J, Lahaye T. 2010. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107** (50) : 21617-21622.
- Moscou MJ, Bogdanove AJ. 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, **326** (5959) : 1501.
- Mussolino C, Morbitzer R, Lutge F, Dannemann N, Lahaye T, Cathomen T. 2011. A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Research*, **39** (21) : 9283-9293.
- Pattanayak V, Ramirez CL, Joung JK, Liu DR. 2011. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature Methods*, **8** (9) : 765-770.
- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, **30** (5) : 460-465.
- Romer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T. 2007. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, **318** (5850) : 645-648.
- Romer P, Strauss T, Hahn S, Scholze H, Morbitzer R, Grau J, Bonas U, Lahaye T. 2009. Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant Physiology*, **150** (4) : 1697-1712.
- Sander JD, Cade L, Khayter C, Reyon D, Peterson RT, Joung JK, Yeh JR. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, **29** (8) : 697-698.
- Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols*, **7** (1) : 171-192.
- Scholze H, Boch J. 2010. TAL effector-DNA specificity. *Virulence*, **1** (5) : 428-432.
- Scholze H, Boch J. 2011. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, **14** (1) : 47-53.
- Streubel J, Blücher C, Landgraf A, Boch J. 2012. TAL effector RVD specificities and efficiencies. *Nature Biotechnology*, **30** (7) : 593-595.
- Tesson L, Usal C, Ménoret S, Leung E, Niles BJ, Remy S, Santiago Y, Vincent AI, Meng X, Zhang L, Gregory PD, Anegón I, Cost GJ. 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nature Biotechnology*, **29** (8) : 695-696.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, **11** (9) : 636-646.
- Wood AJ, Lo TW, Zeitler B, Pickle CS, Ralston EJ, Lee AH, Amora R, Miller JC, Leung E, Meng X, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Meyer BJ. 2011. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, **333** (6040) : 307.
- Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, Varela I, Liu PQ, Paschon DE, Miranda E, Ordonez A, Hannan NR, Rouhani FJ, Darce S, Alexander G, Marciniak SJ, Fusaki N, Hasegawa M, Holmes MC, Di Santo JP, Lomas DA, Bradley A, Vallier L. 2011. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*, **478** (7369) : 391-394.
- Zhang F, Cong L, Lodato S, Kosuri S, Church GM, Arlotta P. 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature Biotechnology*, **29** (2) : 149-153.