



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Determinants of genome editing outcomes: the impact of target and donor DNA structures

Chen, X.

Citation

Chen, X. (2018, May 16). *Determinants of genome editing outcomes: the impact of target and donor DNA structures*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62204>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62204>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/62204>

Author: Chen, X.

Title: Determinants of genome editing outcomes: the impact of target and donor DNA structures

Issue Date: 2018-05-16

Nederlandse samenvatting

Klinische behandelingen gaan over van een traditionele aanpak, zoals het toedienen van “one-fits-all” medicijnen, naar gepersonaliseerde- of precisiegeneeskunde op basis van de genetische informatie van elke patiënt. Of het nu in de context van de medische biologie in zijn geheel is of de precisiegeneeskunde in het bijzonder, het is redelijk om aan te nemen dat genoom-editing technieken een steeds grotere rol gaan spelen binnen deze gebieden door de functie van genoomsequenties te helpen ontcijferen en door de hulpmiddelen aan te bieden voor het permanent corrigeren van de onderliggende oorzaak van genetische aandoeningen - de ideale situatie die men zich voor de toekomst kan voorstellen. RNA-geleide CRISPR-Cas9-nucleasen zijn een van de belangrijkste drijvende krachten aan het worden om deze ideeën tot werkelijkheid te maken. Er zijn echter nog steeds cruciale valkuilen die moeten worden aangepakt voordat CRISPR-Cas9-nucleasen geïmplementeerd kunnen worden in therapieën die voldoen aan de eisen voor zorg. Deze knelpunten omvatten inefficiënte cellulaire afgifte van de genoom-editing reagentia, hun “off-target” DNA knipactiviteiten en de inefficiënte en / of onnauwkeurige opname van het exogene DNA in het menselijk genoom. Met het oog op het oplossen van deze problemen ontwikkelen onderzoekers verbeterde methoden voor de cellulaire afgifte van de reagentia, voeren ze het productieniveau op en, van groot belang, verbeteren ze de specificiteit van de dubbelstrengs DNA-breuk (DSB) vorming. Om te helpen bij de keuze van programmeerbare nucleaseplatforms en om hun prestaties te verbeteren, beginnen onderzoekers ook de cellulaire factoren te ontleden die de uitkomst van genoom-editing kunnen beïnvloeden, met in het bijzonder de chromatine-status van chromosomale doelwitsequenties.

Het is in deze generieke context dat ik in dit proefschrift mijn onderzoek naar een DSB-vrije genoom-editingstrategie genaamd “in trans paired nicking” beschrijf en ook de invloed van hogere-orde chromatine-conformaties op de activiteit van genoom-editingreagentia en keuze van de DNA-herstelroute, d.w.z. niet-homologe eindverbinding (NHEJ) versus homologie gerichte reparatie (HDR), aan de orde komt. Hoofdstuk 1 biedt een overzicht van het uitbreidende assortiment aan genoom-editing reagentia en de bijbehorende DNA-modificatiestrategieën, met de nadruk op programmeerbare nucleasen op basis van CRISPR-systemen. Hoofdstuk 2 laat zien dat “in trans paired nicking” genoom-editing kan resulteren in de precieze incorporatie van kleine en grote DNA-segmenten op verschillende loci in menselijke cellen, inclusief het *AAVS1* “safe harbor” locus in pluripotente stamcellen. Verschillende genoom-editingstrategieën waarbij de HDR-route werd geactiveerd door DSB's of enkelstrengs DNA-breuken (SSB's), werden parallel getest en beoordeeld op hun relatieve efficiëntie, specificiteit en nauwkeurigheid. Conventionele genoom-editing op basis van DSB-vorming op de doellocatie leverde frequent mutatiebijproducten op, vermoedelijk als gevolg van NHEJ; genoom-editing op basis van SSB-formatie

op de doellocatie was op zijn beurt inefficiënt. Bij “in trans paired nicking”, waarbij gebruik wordt gemaakt van de generatie van SSB’s op chromosomaal en plasmide donor DNA met behulp van CRISPR-Cas9 “nickases”, leidde tot een efficiënte en naadloze bewerking van het genoom zonder de aanwezigheid van NHEJ-afgeleide mutaties bij doelallelen.

In overeenstemming met het initiële homologe recombinatiemodel dat door Holliday in 1964 werd voorgesteld, is het mogelijk dat de gecoördineerde generatie van SSB’s op doel- en donor- DNA- substraten de uitvoeren van HDR-stappen vergemakkelijkt, bijv. reciproke enkelstrengs DNA-invasie door beide samenwerkende partners. Verdere onderzoeken om de spelers en mechanismen die betrokken zijn bij nick-geïnduceerde HDR-routes te achterhalen zijn nodig, bijvoorbeeld door onbevooroordeelde bibliotheek screening of gerichte knock-out van kandidaat-genen die betrokken zijn bij het DNA herstel mechanisme. Het beoordelen van het potentieel van “in trans-paired nicking” voor het labellen van endogene eiwitten, met als doel het live volgen van levende cellen, en het bewerken van multi-kopie genen of genen met overlappende sequenties is vanuit een praktisch oogpunt interessant. Daarnaast is het de moeite waard om te bepalen of “in trans-paired nicking” compatibel is met Cas9-orthologen en zeer specifieke Cas9-varianten om, respectievelijk, de veelzijdigheid uit te breiden en de nauwkeurigheid te verbeteren. Toegegeven, een mogelijk nadeel van de “in trans-paired nicking” strategie zou de ongeschiktheid voor genetische modificatie van rustende cellen kunnen zijn, vanwege het ontbreken van de actieve, gebruikelijke, HDR-machinerie. Vandaar dat alternatieve strategieën die efficiënte en niet-mutagene genoom-editing in post-mitotische cellen kunnen bewerkstelligen gevraagd zijn en dus enthousiast moeten worden nagestreefd. Hoofdstuk 3 beschrijft experimenten die zijn ontworpen om, op een kwantitatieve manier, de impact te bepalen van chromatine status op de prestaties van genoom-editingreagentia, in het bijzonder van programmeerbare nucleasen op basis van componenten van *S. pyogenes* CRISPR-Cas9 nucleasen en *Xanthomonas sp.* transcriptie activator-like effector (TALE) eiwitten. Voor deze experimenten werden complementaire “gain-of-function” en “loss-of-function” cellulaire modellen gegenereerd om de doelgen-knock-out levels, tot stand gekomen door de werking van verschillende CRISPR-Cas9-nucleasen en TALE-nucleasen (TALENs) bij euchromatin versus heterochromatine, te volgen.

In deze menselijke cel-systemen gaan reporter doelwitallelen over van compact heterochromatine naar ontspannen euchromatine via de doxycycline afhankelijke werking van een tTR-KRAB fusie-eiwit waarvan het effectordomein, Krüppel-geassocieerde box (KRAB), onder andere de heterochromatine-assemblerende factoren KAP-1 en HP-1 rekruteert. De met deze reportersystemen gegenereerde gegevens, gepresenteerd in hoofdstuk 3, tonen aan dat TALEN’s en CRISPR-Cas9-nucleasen beide aanzienlijk worden belemmerd door KRAB-geïnduceerde heterochromatine

in levende cellen, de eerste meer dan de laatstgenoemde. Deze bevinding is intrigerend met het oog op het feit dat, in tegenstelling tot TALE-eiwitten, *S. pyogenes* CRISPR-Cas9-nucleasen niet zijn geëvolueerd om genomisch DNA in de kernen van eukaryote cellen te benaderen en te knippen. Het moet echter worden opgemerkt dat RNA-geleide nucleasen van andere prokaryotische CRISPR-systemen meer worden belemmerd door de eukaryote context van doelsequenties, in het bijzonder bij heterochromatische gebieden, dan die afgeleid van *S. pyogenes* CRISPR-Cas9-componenten. De in hoofdstuk 4 vermelde experimentele gegevens, verkregen bij gebruik van dezelfde cellulaire modellen als in hoofdstuk 3, tonen inderdaad aan dat *S. aureus* CRISPR-Cas9-nucleasen significant meer worden beïnvloed door gesloten chromatine dan hun *S. pyogenes* tegenhangers. Of deze differentiële “chromatinebarrière” het gevolg is van de verschillende “protospacer adjacent motifs” van deze nucleasen, de conformationele energiedrempels voor ATP-onafhankelijke helicase-activering of andere downstream processen die leiden tot het knippen van DNA verdient verder onderzoek. Zoals reeds eerder vermeld, is een bekende tekortkoming van RNA-geleide nucleasen hun off-target activiteit. Om dit probleem rechtstreeks aan te pakken, zijn onderzoekers actief bezig met het ontwikkelen van nieuwe reagentia en het onderzoeken van nieuwe strategieën om de specificiteit van genoom-editing protocollen te verbeteren.

Deze pogingen resulteerden in een verbetering van doellocatie herkenning door RNA-geleide nucleasen via het rationeel construeren van hoog-specifieke Cas9-varianten, het gebruik van offset-RNA-geleide “nickase”-paren en het ontwerpen van ingekorte gRNA's (Tru-gRNA's) waarvan de kortere DNA-hybridiserende spacersequenties vaak productieve DNA-binding van volledig complementaire doelsequenties bevorderen. De in hoofdstuk 3 en hoofdstuk 4 gepresenteerde resultaten laten zien dat al deze hoog-specificiteit RNA-geleide nucleasplatforms lijden, alhoewel in verschillende mate, wanneer hun doelwitsequenties zijn ingebed in door KRAB geïnduceerd heterochromatine. Heterochromatine lijkt een grotere impact te hebben op platforms met hoge specificiteit dan op conventionele RNA-geleide nucleasen, met uitzondering van de Tru-gRNA's. Toekomstige studies moeten proberen vast te stellen of niet alleen on-target maar ook off-target profielen van programmeerbare nucleasen veranderen door verschillende epigenomen, zoals die die kenmerkend zijn voor specifieke celtypen en celdifferentiatiestadia.