



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Shepherding precision gene editing with CRISPR-Cas9 variants and adenoviral vectors

Tasca, F.

### Citation

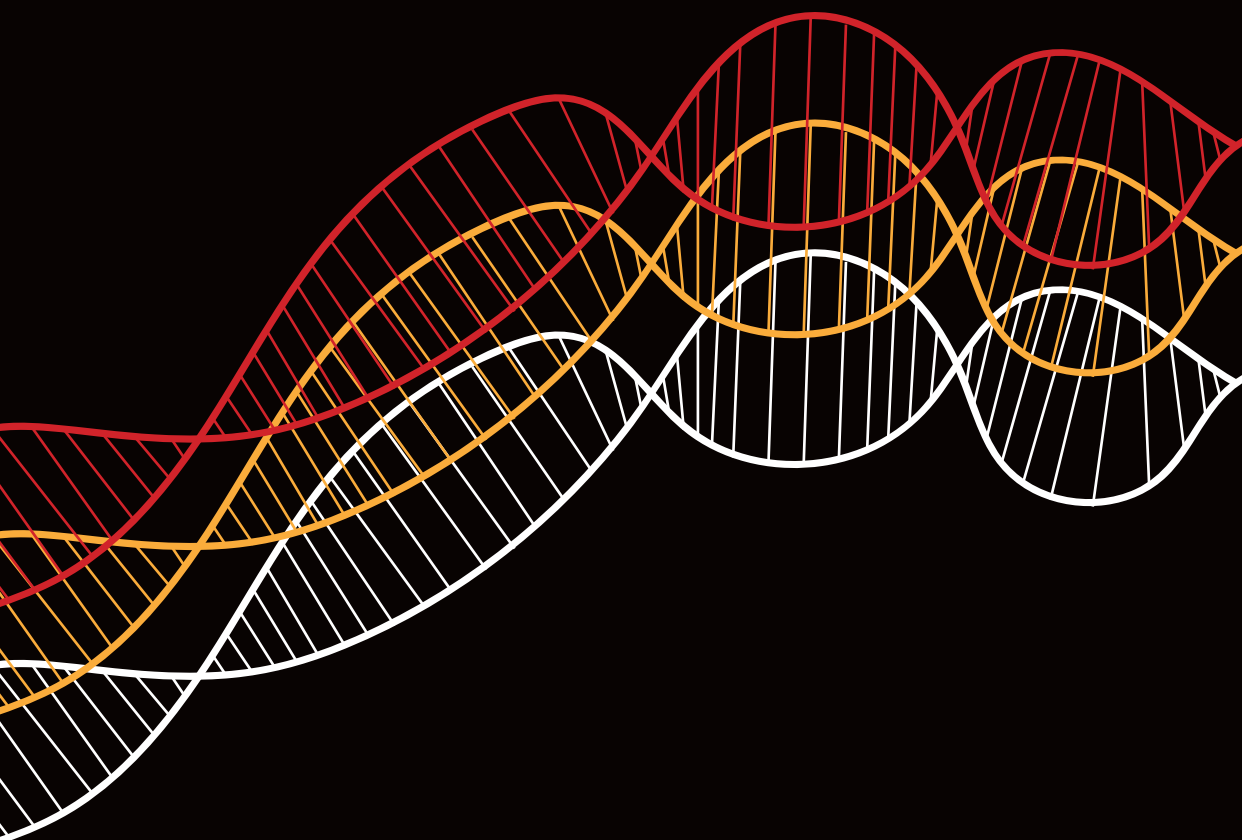
Tasca, F. (2023, June 15). *Shepherding precision gene editing with CRISPR-Cas9 variants and adenoviral vectors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3620378>

Version: Publisher's Version

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

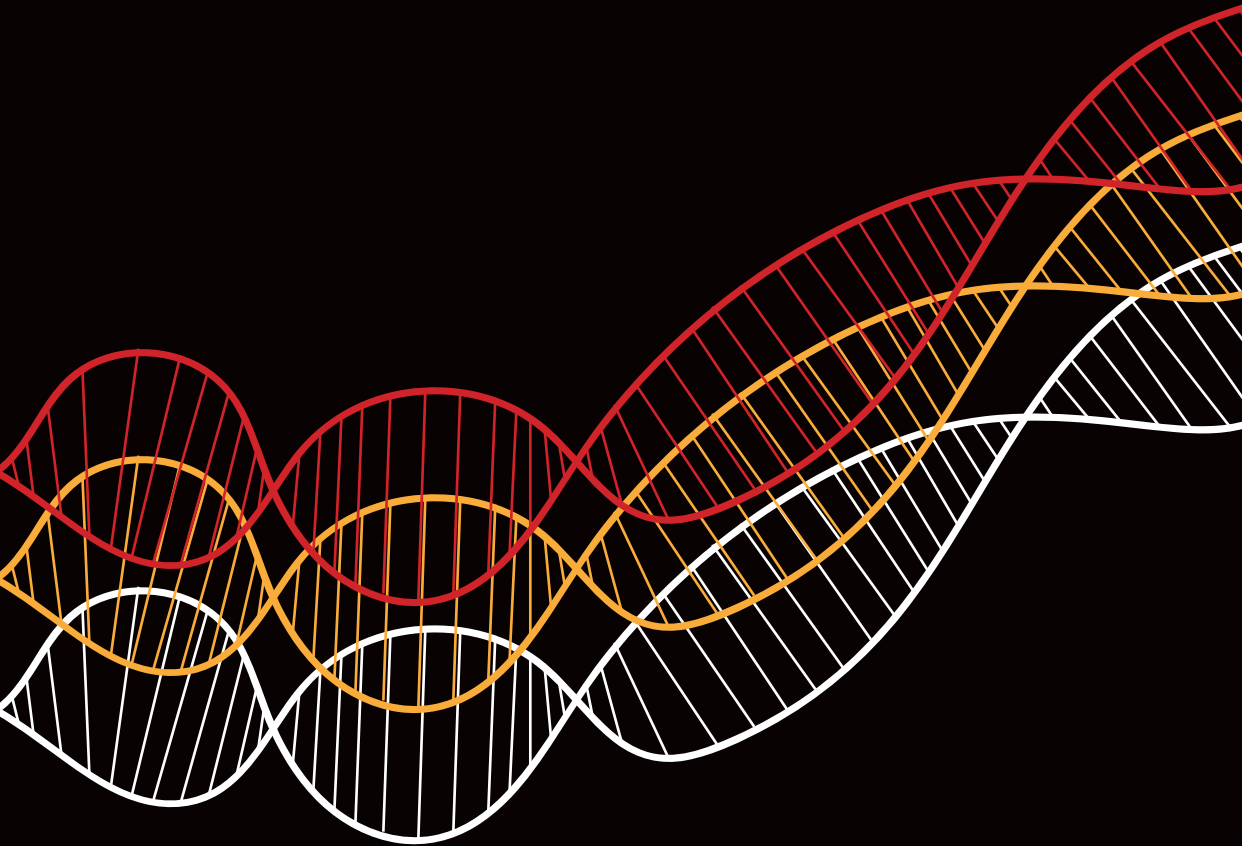
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3620378>

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



# Chapter 7

## Nederlandse Samenvatting





## Nederlandse samenvatting

Genoom-aanpassing (GE) technieken gebaseerd op homologe-afhankelijk en homologe-onafhankelijk DNA-reparatie die geactiveerd kunnen worden door nucleasen, zoals bijvoorbeeld RNA-geleide nucleasen (RGNs) van het CRISPR-Cas systeem, laten specifieke modificaties in chromosomale sequenties in levende cellen toe, dit kan zowel een base-pair of gehele transgenen zijn. Deze technieken hebben al bewezen dat ze een uitstekende potentie hebben in veel verschillende velden, van basis onderzoek tot toegepaste biotechnologie, biomedische onderzoek, en medicijnen. Echter, het continue streven naar verdere verbetering van de effectiviteit en specificiteit van GE technieken is vereist, vooral als er gekeken wordt naar het gebruik in een klinische setting. Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2**, is de sleutel tot het verbeteren van de mogelijke kandidaten voor gen en cel therapieën het gebruiken van de meest vergevorderde GE technieken en strategieën in stam cellen. Daarom is het essentieel om bezorgsystemen te implementeren die het toelaten om de laatste-generatie GE technieken in moeilijk om te transferten doel cellen (bijvoorbeeld humane somatische cellen en induceerbare pluripotente stam cellen, hiPSCs) te kunnen introduceren in een efficiënte, veelzijdige, en niet toxische manier.

In deze context wordt in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** de hoge capaciteit adenovirale vectoren deeltjes (AdVPs), gebaseerd op gemodificeerde programmeerbare nucleasen en/of donor DNA sequenties gevoelig voor specifieke DNA-reparatiemechanismen, onderzocht als vervoerders voor GE technieken. De veelzijdigheid van dit levering platform helpt in het testen van nieuwe GE mogelijkheden in verschillende stam- en voorlopercellen met therapeutische potentiaal, met onder andere hiPSCs en spiervoorlopercellen. Om specifiek te zijn, de strategieën waren gemaakt om de genetische afwijking leidend tot Duchenne spierdystrofie (DMD) te corrigeren. DMD is een fatale X-chromosoom gebonden spier ziekte veroorzaakt door een grote range van verlies-van-functie mutaties in het grootste eiwit-coderende gen in het humane genoom (de ~2,4 Mb dystrofine-coderende *DMD*-gen). Tot op heden, focussen DMD-gerichte gen therapieën zich voornamelijk op de over expressie van micro-dystrofines na AdV bezorging of het *in situ* maken van Becker-like dystrofines na het inbrengen van RGN.

**Hoofdstuk 3** draagt bij aan het GE-veld door het gebruik van AdVPs multiplexing GE strategieën gericht op het herstel van de DMD leesraam dat uiteindelijk leidt tot expressie van Becker-achtige dystrofines. De onderzochte multiplex strategie was gebaseerd op de gecoördineerde formatie van dubbelstrengs DNA-breuken (DSBs) door RGN-paren die waren ontworpen voor het verwijderen van versturende sequenties in het DMD leesraam in Duchenne patiënten-afgeleide myoblasten. Ongecoördineerde activiteit van onafhankelijk werkende RGNs heeft aangetoond, hier en in eerder onderzoek, te werken op verschillende efficiëntie niveaus en om substantiële hoeveelheden onbedoelde genomische modificaties te genereren. Deze studie heeft ontdekt dat, door het gebruik van AdVPs om geforceerd RGN heterodimeren aan te leveren samen met hun gids-RNAs, dat de frequentie en nauwkeurigheid

van de bedoelde DNA deleties beter zijn in vergelijking met die zijn verkregen door verschillende componenten apart aan te leveren. Het gebruik van de geforceerde aanpak is een goed voorteken voor de verbetering van GE-toepassingen, waar het op een nauwkeurige en efficiënte manier genereren van gerichte DNA deleties noodzakelijk is.

**Hoofdstuk 4** borduurt voor op het onderzoek dat beschreven is in **Hoofdstuk 3** door het AdVP platform verder te gebruiken om, in dit geval, homologie-afhankelijke DNA-herstelprocessen te rekruteren om langdurige complemetatie van DMD-veroorzakende mutaties te bereiken onafhankelijk van de type of locatie, namelijk via plaats specifieke chromosomale insertie van transgenen die de volledige lengte, dus volledig functioneel, dwarsgestreepte spier-specifieke isovorm van dystrofine (427 kDa) tot expressie brengt. De onderzochte AdVP-gebaseerde GE strategieën bevatten de levering van donor DNA-templates vatbaar voor homologe recombinatie (HR) of homologe-gemedieerde eindverbinding (HMEJ) en is gemaakt om de DNA integratie in de veel voorkomend gebruikte “veilige haven” locus *AAVS1* op 19q13.42 te plaatsen. Over het algemeen was er gevonden dat de HMEJ-gebaseerde GE strategieën leiden tot hogere frequentie van on-target integraties dan die van HR-gebaseerde GE in HeLa cellen en myoblasten. De efficiëntie van de HMEJ- en HR-gebaseerde GE strategieën waren vergelijkbaar in hiPSC, maar interessant genoeg kon de gen targeting niveaus onder p53-remmende omstandigheden gered worden specifiek in getransduceerde iPSC met HMEJ donors. In conclusie, de beschreven AdVP methodes maken het onderzoek en de toepassing van verschillende gen knock-in approaches mogelijk in moeilijk te transfereren cellen, ongeacht van het CRISPR complex en de grootte van de transgenen.

Samenvattend, het werk besproken in **Hoofdstuk 3** en **Hoofdstuk 4** ondersteund het gebruik van AdVPs voor de ontwikkeling van effectieve en breed toepasbare gen therapie gebaseerd op programmeerbare nucleasen, inclusief die met de *ex vivo* correctie en autologe transplantatie van stem-/voorlopercellen. Desalniettemin, hebben beide studies ook nadelen aan het licht gebracht van het gebruik van op DSB gebaseerde GE-strategieën in de vorm van on-target en off-target ongewenste aanpassingen en daarom is het noodzakelijk om GE-resultaten zorgvuldig te onderzoeken bij het toepassen van dergelijke strategieën. Bovendien ondersteunen de gegevens gepresenteerd in **Hoofdstuk 4** verder dat de programmeerbare nucleasen-gemedieerde GE strategieën voornamelijk minder efficiënt werkzaam zijn in stam cellen, waarschijnlijk door de DSB-getriggerde p53-afhankelijke cel cyclus stilstand en apoptose reactie. Door de bijproducten die ontstaan bij de programmeerbare nucleasen-gemedieerde GE, zorgen recente ontwikkelingen op het gebied van genomische technologie voor de vooruitgang van chromosomaal snijden naar chromosomaal niet-snijdende benadering op basis van “nicking” van Cas9-varianten.

Om verder te gaan met dit onderzoek, is in **Hoofdstuk 5** het voordeel van het gebruik van DSB-vrije GE strategieën onderzocht om vooral op gevoelige genomische regio's en cellen te richten. *In trans* gepaarde nicking, een strategie dat gebaseerd is op het gelijktijdig

vormen van enkelstrengs DNA-breuken (SSBs) op donor en acceptor DNA door CRISPR-Cas9 nickases, is succesvol in het introduceren van grote DNA segmenten efficiënt en precies op loci geassocieerd met haploïnsufficiëntie vooral in verschillende humane cellen, inclusief hiPSCs. Deze SSB-gebaseerde GE strategie zorgt ervoor dat grote- en kleine-schaal mutagene evenementen veroorzaakt door DSB gemedend zijn en zorgt vormelijk voor het behoud van cellulaire genotype en fenotypes. De accurate en specifieke manier van *in trans* gepaarde nicking kan voornamelijk behulpzaam zijn in editing van stam cellen, waar een precieze en voorspelbare genetische interventie essentieel is.

In conclusie, het nauwlettend volgen van op DSB-gebaseerde GE technieken en verdere vooruitgang naar DSB-vrije GE strategieën zal steeds belangrijker worden voor onderzoek naar translationele gen therapieën. In deze context, zal het afstemmen van AdVPs voor het testen van een precieze GE-benadering in therapeutisch relevante cellen ervoor kunnen zorgen dat deuren geopend worden naar de ontwikkeling van nieuwe therapeutische mogelijkheden die de grondoorzaken van (mono)genetische ziektes zoals DMD zullen aanpakken.