



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Sculpting the genome and beyond: novel tools for DNA and RNA targeting

Zhao, Z.

Citation

Zhao, Z. (2023, June 15). *Sculpting the genome and beyond: novel tools for DNA and RNA targeting*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3620427>

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/1887/3620427>

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

Nederlandse Samenvatting

In het afgelopen decennium heeft de revolutionaire CRISPR-Cas gen-editing-technologie aanzienlijke vooruitgang geboekt en het begrip van genetische mechanismen vergroot. De ontwikkeling van verschillende op CRISPR-Cas gebaseerde editing technieken heeft ons in staat gesteld om niet alleen DNA, maar ook RNA te manipuleren, wat de reikwijdte van potentiële toepassingen heeft vergroot. Bovendien hebben innovaties in CRISPR-systemen zowel DSB-afhankelijke als -onafhankelijke methoden van genbewerking vergemakkelijkt, wat heeft geleid tot een verbeterde nauwkeurigheid en veiligheid en nieuwe mogelijkheden voor innovatieve therapeutische benaderingen en onderzoek naar genetische ziektes. Dit proefschrift beschrijft nieuwe iteraties van CRISPR-Cas-componenten en hoe deze de toepassing van genoom en RNA editing verbreden.

Hoofdstuk 1 geeft een uitgebreid overzicht van verschillende Klasse 2 CRISPR-nucleasen, waaronder Cas9 (type II), Cas12 (type V) en Cas13 (type VI), evenals gentechnologieën die niet afhankelijk zijn van dubbelstrengs DNA breken, zoals 'base editing' en 'prime editing'.

In **Hoofdstuk 2** is een precieze genetische modificatie techniek ontwikkeld met behulp van een kort dubbelstrengs DNA (dsDNA) reparatie template genaamd 'Ligation-Assisted Homologous Recombination (LAHR). LAHR vertoont een vergelijkbare gen correctie efficiëntie als genetische modificatie met behulp van het enkelstrengs oligo-deoxyribonucleotide (ssODN)-gemedieerde homology-directed-repair (HDR) mechanisme voor zowel exogene genen als endogene genen. We laten zien dat het LAHR-proces is gebaseerd op een combinatie van zowel HDR als micro-homologie gemedieerde end-joining (MMEJ) mechanismen.

Hoofdstuk 3 presenteert een overzicht van de basisprincipes van prime editing en beschrijft hoe de lage gen modificatie efficiëntie de belangrijkste belemmering is voor brede toepassing van deze technologieën. Verschillende strategieën worden besproken om dit probleem aan te pakken en potentiële therapeutische toepassingen worden beschreven. Vervolgens is in **Hoofdstuk 4** de 'prime editor' systematisch opnieuw ontworpen om de efficiëntie te vergroten met als resultaat een meer dan tweevoudige toename in genetische modificatie efficiëntie vergeleken met het momenteel gebruikte variant (PE2). Dit proces omvatte optimalisatie van de RT lo-

catie op de Cas9 nickase, aanpassing van de lengte van de linker tussen de RT en de nCas9, het toevoegen van een 7 kD DNA bindend domein en verfijning van de positionering van het 7 kD DNA bindende domein en verschillende NLS-sequenties.

In **Hoofdstuk 5** van dit proefschrift hebben we onderzoek gedaan naar tegenstrijdige bevindingen met betrekking tot de RNA knipactiviteiten van Cas13a in menselijke cellen. Sommige onderzoekers meldden een zeer specifieke doelwit-RNA verlagende activiteit, terwijl anderen zogenaamde aspecifieke RNA knipactiviteit en daaruit voortvloeiende celtoxiciteit vonden. Uit ons onderzoek blijkt dat de aspecifieke knipactiviteit afhankelijk is van het gebruikte Cas13 ortholoog, alsmede het doelwit-RNA, het celtype en vooral van de expressieniveaus van het doelwit-RNA. Daarnaast hebben we deze aspecifieke RNA knip activiteit geanalyseerd met behulp van Nanopore-sequencing en vastgesteld dat LbuCas13a knipplekken in zowel het doelwit-RNA als het omstander RNA zeer specifiek zijn, meestal voorkomend in uracil bevattende enkelstrengs RNA lussen van stem-lus structuren. We hebben aangetoond dat Cas13a apoptose door activatie van het aangeboren immuunsysteem wordt veroorzaakt. Tenslotte tonen we aan dat de aspecifieke activiteit van Cas13a kan worden ingezet als cel selectie-instrument met mogelijke toepassingen in de behandeling van kanker.

Samenvattend benadrukt ons onderzoek de mogelijkheden om de verschillende CRISPR-Cas gen editing technologieën verder te verbeteren. Ontwikkeling van CRISPR-technologieën met hoge bewerking efficiëntie, lage off-target effecten en efficiënte toepassingsmethoden ligt aan de horizon en zal nieuwe therapeutische toepassingen mogelijk maken.