



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Soft genome editing based on CRISPR nickases: it takes one break to tango

Wang, Q.

Citation

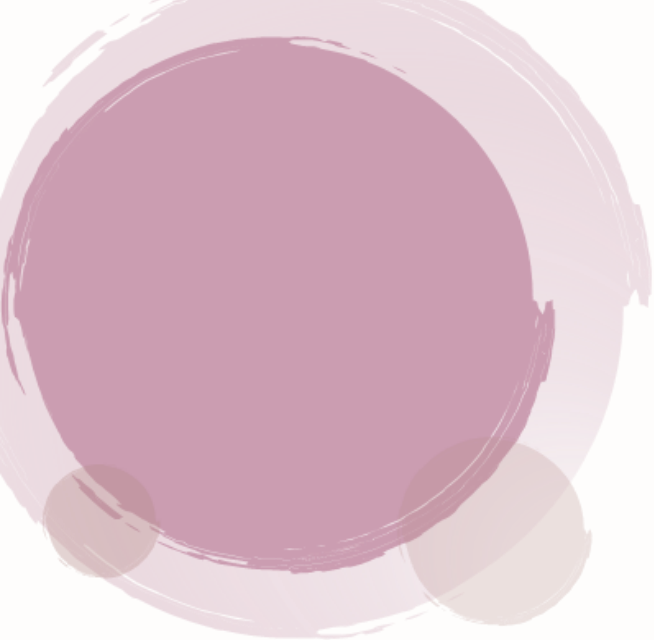
Wang, Q. (2024, June 26). *Soft genome editing based on CRISPR nickases: it takes one break to tango*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3765882>

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/1887/3765882>

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



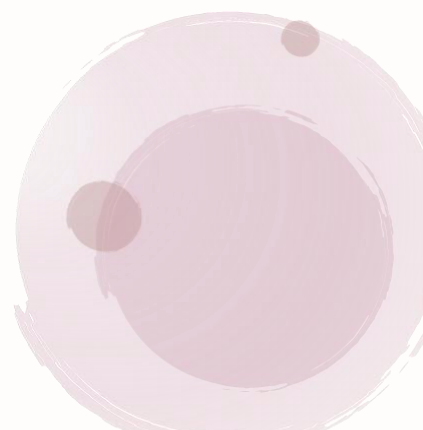
Addendum

Nederlandese Samenvatting / 214

List of Publications / 218

Curriculum Vitae / 220

Acknowledgments / 221



Nederlandse Samenvatting

Technologieën voor genoombewerking maken het mogelijk om in *vitro* en *in vivo* specifieke genetische veranderingen aan te brengen in de enorme genomen van levende eukaryotische cellen. Als zodanig hebben deze technologieën een steeds grotere impact op zowel de fundamentele als de toegepaste wetenschap. In het kader van de menselijke gezondheid is het uiteindelijke doel om deze technieken te vertalen naar therapeutisch relevante toepassingen, waaronder (i) het permanent *ex vivo* of *in vivo* corrigeren van mutaties die geassocieerd zijn met erfelijke ziekten, (ii) het verstoren van de replicatie van infectieuze agentia, en (iii) het verbeteren van de werkzaamheid en veiligheid van kankerimmunotherapieën die gebruik maken van genetisch gemodificeerde T-lymfocyten of natuurlijke killercellen als gewapende ‘levende geneesmiddelen’. Ondanks de opmerkelijke vooruitgang die de afgelopen twintig jaar is geboekt op het gebied van de ontwikkeling van genoombewerkingstools en -strategieën, een trend die is bevorderd na de introductie in 2013 van RNA-gidsnucleasen (RGNs), zijn er verschillende al lang bestaande knelpunten die de toepassing van deze technologieën in effectieve en veilige gen- en celtherapieën beperken. Deze knelpunten omvatten grote en kleine mutagene gebeurtenissen (stochastisch of anderszins), off-target activiteiten, activering van DNA-schaderespons en ineffectieve cellulaire afgifte van de grote en meerdere reagentia die nodig zijn om de beoogde chromosomale modificatie(s) in de juiste celtypen, weefsels of organen te bewerkstelligen.

Doorgaans omvatten genoombewerkingsprotocollen de aflevering van op doelsequenties afgestemde designernucleasen (bijv. CRISPR-Cas9-gebaseerde RGNs) die, na gerichte dubbelstrengs DNA-breuk (DSB) vorming en daaropvolgende activering van endogene DNA-reparatieroutes, specifieke chromosomale DNA veranderingen opleveren. Met het oog op plaatsspecifieke chromosomale toevoeging van exogene genetische informatie (gentargeting of knock-in), wordt de toelevering van designernucleasen gecombineerd met die van surrogaatdonor-DNA-herstellende sjablonen, waarvan homologie met genomische doelsequenties hen vatbaar maakt voor nauwkeurige homologiegerichte DNA-reparatieprocessen (HDR). Maar in plaats van HDR-gemedieerde genoombewerking worden door designernuclease geïnduceerde DSBs vaker gebruikt door concurrerende, foutgevoelige DNA-reparatiemechanismen, bijvoorbeeld niet-homologe eindverbinding (NHEJ) en microhomologie-gemedieerde eindverbinding (MMEJ). Hoewel talloze onderzoeken hebben aangetoond dat HDR-gemedieerde genoombewerking kan worden bevoordeeld door de remming van NHEJ- en MMEJ-factoren, verdient het de voorkeur om het HDR-proces zelf te verbeteren, in plaats van de activiteit van DNA-reparatiefactoren te verstoren, waarvan de gevolgen voor genomische stabiliteit meestal onvoorspelbaar is. Een ander kritisch punt betreft de behoefte aan effectieve en veilige afgifte van de grote en uit diverse componenten bestaande elementen, die ten grondslag liggen aan de genoombewerkingsprocedures. Daarom behandelt **Hoofdstuk 1**, naast de beoordeling van klassieke en recentere hulpmiddelen en strategieën voor het bewerken van het genoom, ook het gebruik van adenovirale vectoren (AdVs) als afgiftemiddelen voor gerichte genetische modificatie van menselijke stamcellen, voorlopercellen en hun gedifferentieerde nakomelingen, met de nadruk op *in vitro* en *ex vivo* protocollen. In deze context vormen adenovirale vectoren met hoge capaciteit (HC-AdVs), waarbij alle virale genen zijn verwijderd, bijzonder waardevolle vectoren voor het afgeven van grote genoombewerkingscomponenten vanwege hun lage cytotoxiciteit en hun vatbaarheid voor celtropisemodificaties. In dit proefschrift maakten HC-AdVs, die CD46-specifieke capsidefibers van adenovirus serotype-50 bevatten in plaats van coxsackievirus en adenovirusreceptor (CAR)-bindende fibers van prototypisch serotype-5, het effectief testen van nieuwe genoombewerkingsmethoden mogelijk op therapeutisch relevante CAR-negatieve menselijke celtypen, zoals mesenchymale stamcellen (hMSCs) en spiervoorlopercellen (myoblasten), maar ook CD46- en hartspiercellen afgeleid van CAR-positieve geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC).

Gemotiveerd door de bovengenoemde beperkingen van veelgebruikte genoombewerkingsmethoden, sterk geassocieerd met hun afhankelijkheid van designer nucleasen, richten de experimentele hoofdstukken die in dit proefschrift worden gepresenteerd zich op het onderzoeken van genoombewerkingsprincipes gebaseerd op het gebruik van sequentie- en strengspecifieke nucleasen (“nickases”). In dit verband laat **Hoofdstuk 2** zien dat ‘*in trans* paired nicking’ (ITPN), bestaande uit gelijktijdige vorming van enkelstrengige DNA-breuken (SSB) op genomische doelwit-locaties en donor-DNA-constructen door *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9-afgeleide nickases, naadloze en littekenloze HDR -gemedieerde gen-knock-ins op endogene loci teweegbrengt, waarvan de producten

essentieel zijn voor de reguliere celfunctie, in het bijzonder allelen die fundamenteel zijn voor reacties op DNA-schade (bijv., *H2AX* en *PARP1*) en voor het behoud van pluripotentie in bonafide pluripotente stamcellen en iPSCs (bijv., *OCT4*). Belangrijk is dat werd aangetoond dat het lage mutagene karakter van ITPN de doeleiwitdoseringen behoudt en fenotypische en fitness-verliezen in gen-bewerkte celpopulaties voorkomt. Daarnaast introduceert **Hoofdstuk 2**, door middel van een samenwerkingsverband, de orthogonale high-throughput genoom-brede translocatie sequencing (oHTGTS) techniek voor identificatie en karakterisering van off-target sites en effecten, respectievelijk resulterend uit knippende versus nicking RGNs. Met behulp van oHTGTS werd vastgesteld dat het induceren van enkelstrengsbreken door RGNs de frequentie van grootschalige chromosomale herschikkingen en translocaties aanzienlijk vermindert in vergelijking met hun DNA-splitsende tegenhangers. Nicking-RGNs zouden niettemin detecteerbare translocaties kunnen veroorzaken waarbij on-target en off-target sites betrokken zijn. Vermoedelijk kunnen dergelijke gebeurtenissen zich voordoen wanneer bijvoorbeeld een voortschrijdende replicatievork instort na het raken van een door nickase geïnduceerd SSB-product. Bovendien bestaat er, gezien het feit dat eukaryotische genomen vele repetitieve elementen bevatten, waarvan de individuele eenheden een volledige of hoge sequentie-identiteit delen met eenheden die elders in het genoom verspreid zijn (bijvoorbeeld retro-elementen, geamplificeerde genclusters, genparalogen en pseudogenen), een dringende behoefte om nickases met hoge specificiteit te identificeren, die toegang tot specifieke chromosomale sequenties mogelijk maken, terwijl vergelijkbare off-target-sites worden vermeden. Daarom werd in Hoofdstuk 3 een representatief panel van RuvC-uitgeschakeld *S. pyogenes* Cas9 nickases (SpCas9^{D10A}) samengesteld, op basis van betreffende nucleasen met hoge specificiteit, namelijk SpCas9-KA^{D10A}, SpCas9-KARA^{D10A}, eSpCas9(1.1)^{D10A}, Sniper-Cas9^{D10A}, xCas9-3.7^{D10A}, evoCas9^{D10A} en SpCas9-HF1^{D10A}. Daaropvolgende benchmarkingexperimenten en functionele screenings beschreven in **Hoofdstuk 3** identificeren SpCas9^{D10A}-varianten met hoge specificiteit die hun reguliere tegenhangers kunnen overtreffen op het niveau van het onderscheid maken tussen on-target en off-target sequenties en het minimaliseren van genoombrede translocaties zoals bepaald door functionele screens en oHTGTS-analyse. Bovendien presteerden SpCas9^{D10A}-nickases met hoge specificiteit die als ‘dual nicking-RGNs’ werken ook beter dan hun conventionele tegenhangers in termen van het opleveren van zeer specifieke gen-knock-outs en bereiken ze, samen met gematchte donorconstructen, specifieke gen-knock-ins door off-target-inserties op vergelijkbare pseudogene elementen te minimaliseren. Op basis van deze bevindingen illustreert **Hoofdstuk 4** dat SpCas9^{D10A}-nickases met hoge specificiteit in staat zijn om ITPN-genoombewerking in dezelfde of hogere mate uit te lokken dan die welke worden geactiveerd door het ouderlijke SpCas9^{D10A}-eiwit, inclusief op ‘veilige haven’-loci (bijv., *AAVS1* en *CCR5*), waarvan de HDR-gemedieerde DNA-targeting langdurige en homogene transgenexpressie in gemanipuleerde celpopulaties mogelijk maakt. Cruciaal is dat **Hoofdstuk 4** verder laat zien dat, in tegenstelling tot reguliere SpCas9-nucleasen met hoge specificiteit, noch reguliere SpCas9^{D10A}-nickases noch reguliere SpCas9^{D10A}-nickases met hoge specificiteit de canonieke P53-afhankelijke signaalroute voor DNA-schaderespons in menselijke iPSCs activeren, wat het potentieel betere veiligheidsprofiel van nickases boven nucleasen voor de genomische manipulatie van cellen met een hoge gevoeligheid voor DNA-schade, bijvoorbeeld pluripotente en weefsel-specifieke stamcellen, verder benadrukt. Deze gegevens duiden er inderdaad op dat SpCas9^{D10A}-nickases een beter veiligheidsprofiel zouden kunnen bieden voor gemodificeerde celproducten die zijn afgeleid van stamcellen, omdat, naast het stoppen van de celcyclus en apoptose, door DSB geïnduceerde signaalroutes in verband zijn gebracht met de selectie van cellen die mutaties in kanker-geassocieerde genen, bijvoorbeeld *TP53* zelf en *KRAS*, dragen.

Zoals eerder vermeld, betreft een kritisch knelpunt met betrekking tot de toepassing van genoombewerkingstechnologieën de noodzaak om, op een effectieve en niet-cytotoxische manier, de vereiste grote en uit meerdere componenten bestaande reagentia te introduceren in cellen, weefsels of organen die interessant zijn. **Hoofdstuk 5** laat zien dat HC-AdVs, in het bijzonder op CD46 gerichte HC-AdVs, een geschikte optie zijn voor alles-in-één levering van ‘prime editing reagentia’ van volledige lengte, in de vorm van prime editors en prime editing gRNAs (pegRNAs), in menselijke cellen, ongeacht hun transformatie- en replicatiestatus. Tot 90% van de primaire ‘editing-efficiëntie’ is inderdaad haalbaar, zonder duidelijke cytotoxiciteit in getransduceerde cellen. Bovendien werd een directe correlatie gevonden tussen de replicatiestatus van doelcellen en primaire editing activiteiten, door gebruik te maken van dit celcyclus-onafhankelijke platform voor het afleveren van virale vectoren.

De bevindingen gepresenteerd in **Hoofdstuk 5** worden verder uitgebreid in **Hoofdstuk 6** door gebruik te maken van HC-AdVs voor het afleveren van geavanceerde prime editing-systemen die zijn ontworpen voor het installeren van nauwkeurige *DMD*-genbewerkingen in menselijke myogene cellen. In het bijzonder in myoblasten en mesenchymale stamcellen, met efficiënties tot respectievelijk 80% en 64%, en in hartspiercellen gedifferentieerd van iPSCs geïsoleerd uit een patiënt met Duchenne spierdystrofie (*DMD*), met efficiënties tot 82%. Defecte *DMD*-allelen liggen ten grondslag aan *DMD* (OMIM #310200), een veel voorkomende en dodelijke X-gebonden spieraafbraakstoornis die ongeveer 1 op de 4.700 jongens treft, van wie de behandelingsopties momenteel louter palliatief zijn. HC-AdV-transductie-experimenten ontworpen voor herstel van het defecte *DMD*-leesraam leidden al snel tot de detectie van mRNA-transcripten die coderen voor eiwitten die overeenkomen met verkorte, maar gedeeltelijk functionele, dystrofine-varianten (dwz Becker-achtige dystrofines) in niet-geselecteerde spiercelpopulaties. Cruciaal was dat nabijheids-ligatietesten aantoonde dat de resulterende Becker-achtige dystrofine-eiwitten in staat waren zich te verbinden met β -dystroglycan, een sleutelcomponent van het dystrofine-geassocieerde glycoproteïnecomplex dat zich bevindt in het sarcolemma van normale spiercellen. Bovendien demonstrenen aanvullende *DMD*-leesframe herstel-experimenten de haalbaarheid van het gebruik van HC-AdV-levering voor multiplexing van prime-editing op basis van de gecoördineerde actie van paren prime-editingcomplexen. Tenslotte kan het eenvoudige HC-AdV-afgifteproces, gecombineerd met het niet-mutagene karakter van prime editing, worden benut voor de selectieve accumulatie van nauwkeurige chromosomale bewerkingen in doelcelpopulaties door middel van opeenvolgende transductieronden. Alles bij elkaar laat het onderzoek dat in **Hoofdstuk 5** en **Hoofdstuk 6** wordt behandeld zien dat de geïntegreerde levering van 'prime editing'-systemen in afzonderlijke HC-AdV-deeltjes, efficiënte en nauwkeurige modificatie van doelallelen in menselijke stam-/voorlopercellen oplevert. Als gevolg hiervan rechtvaardigt HC-AdV-ondersteunde 'prime editing' verder onderzoek, inclusief voor het modelleren en repareren van genetische defecten in *ex vivo* en *in vivo* omgevingen.

De chromatine-omgeving van genomische DNA-sequenties varieert in verschillende celtypen en is vaak zeer dynamisch als gevolg van de spatiotemporele regulatie van epigenetische mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van organismes en cellulaire differentiatie. Interessant genoeg wordt het duidelijk dat de prestaties van reagentia voor het bewerken van het genoom afhankelijk zijn van een combinatie van genetische en epigenetische variabelen, dat wil zeggen respectievelijk de doelnucleotidesequenties als zodanig en hun epigenetisch gereguleerde chromatine-omgeving. Mogelijk kan de lokale epigenetische context, naast het in verschillende mate controleren van de toegankelijkheid van doelsequenties voor tools voor genoombewerking, ook de keuzes voor DNA-reparatieroutes en andere determinanten voor DNA-bewerking beïnvloeden, waarvan de gecombineerde effecten uiteindelijk de waargenomen eindpunten van genoommodificatie bepalen. Uit eerdere onderzoeken uit de gastgroep is bijvoorbeeld gebleken dat de activiteit van designernucleasen op basis van CRISPR-Cas9-systemen en transcriptie-activatorachtige effectoren aanzienlijk wordt belemmerd door heterochromatische statussen en dat de verhouding tussen HDR en mutagene NHEJ-gebeurtenissen kan variëren, afhankelijk van de Chromatine-context.

Gezien het feit dat basiseditors en prime-editors worden gevormd door CRISPR-nickasen te fuseren met secundaire effectordomeinen (dat wil zeggen respectievelijk de-aminasen en reverse transcriptasen), wordt in **hoofdstuk 7** onderzocht of er oorzaak-gevolgassociaties bestaan tussen alternatieve chromatineconformaties en genoombewerkingseindpunten, bij gebruik van deze twee krachtige DSB-onafhankelijke genoombewerkingsplatforms. Door complementaire cellulaire systemen met functieverlies en functiewinst te implementeren, bleek dat 'prime editing' vaak wordt gehinderd bij heterochromatine dat wordt beïnvloed door de KRAB/KAP-1/HP1-as, alleen of samen met de DNA-methyltransferasen DNMT3A en DNMT3L. Bovendien dragen de uitgebreide delen van gRNAs die pegRNA's vormen bij aan de beperkte efficiëntie van prime-editors bij heterochromatische sequenties. Opmerkelijk is dat, in contrast met primaire editors en designernucleasen (al dan niet op basis van CRISPR), de DNA-bewerkingsactiviteit van base-editors bij gesloten heterochromatine op een doelplaats-afhankelijke manier varieert van lager tot, vaak, significant hoger dan die waargenomen bij open euchromatine. Bovendien bleek ook dat de chromatineomgeving van doelsequenties de betrouwbaarheid en zuiverheid van basisbewerkingsproducten op een gRNA-afhankelijke manier aanzienlijk kon beïnvloeden. Als gevolg hiervan vereisen de prestatie- en veiligheidsprofielen van basis- en prime-editingtechnologieën een diepgaand onderzoek om hun selectie, verdere ontwikkeling en

toepassing in specifieke contexten te begeleiden. Op basis van de gegevens gepresenteerd in **Hoofdstuk 7** kan men ook stellen dat algoritmen die zijn getraind om de activiteiten van basisbewerkings- en prime-bewerkingsreagentia te voorspellen, naast invoer op doelsequenties, zullen profiteren van de verwerking van informatie over de epigenetische context van genoemde sequenties. Tenslotte kunnen deze gegevens de ontwikkeling van combinatorische strategieën verder begeleiden, waarin gerichte epigenetische modulators en DSB-vrije genoombewerkingstools samenwerken om een efficiëntere en/of nauwkeurigere genetische modificatie van cellulaire (epi)genomen te bereiken.

Samenvattend verschaft dit proefschrift inzicht in hoe deze genoombewerkingstools en strategieën, die gebaseerd zijn op CRISPR-Cas9 nickases als zodanig of op hun afgeleiden voor prime editing en base editing, in menselijke cellen werken en daarmee nieuwe wegen openen voor de naadloze modificatie van cellulaire (epi)genomen. De verwachting is dat door het verder ontwikkelen en verfijnen van 'zachte' genoom-editing procedures die, naast de efficiëntie, rekening houden met specificiteit en nauwkeurigheid parameters, het mogelijk zal zijn om 'genoomchirurgie' interventies te vertalen in effectieve en veilige gen- en celtherapieën.