Universiteit
Leiden
The Netherlands

Combinatorial testing of viral vector and CRISPR systems for precision genome editing

Li, Z.

Citation
Li, Z. (2025, October 8). *Combinatorial testing of viral vector and CRISPR systems for precision genome editing*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4262567

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/1887/4262567

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

Chapter 7

Nederlandse Samenvatting

Nederlandse samenvatting

Genome editing (ook wel genoemd: genome engineering en gene editing) is een snel ontwikkelend vakgebied met een toenemende impact op fundamentele wetenschap, biotechnologie en geneeskunde [1]. Met behulp van gemodificeerde RNA-gestuurde nucleasen (RGN's) afgeleid van 'geclusterde regelmatig interspaced korte palindromische repeat (CRISPR)-systemen', die werden ontdekt als prokaryotische antivirale machines in bacteriën en archaea [2], is genoombewerking veelzijdiger geworden voor het bereiken van gen-knock-out (KO), gen-knock-in (KI), gerichte DNA-vervanging en tagging [1,2]. Ondanks de aanpassing van nieuwe CRISPR en CRISPR-achtige systemen voor genoom-bewerkingsdoeleinden [3], blijven CRISPR-afgeleide RGN's gebaseerd op het prototypische *Streptococcus pyogenes* CRISPR-Cas9-systeem, en door gerichte evolutie gecreëerde varianten, veelgebruikte reagentia voor vele toepassingen [4]. Dit komt grotendeels voort uit hun robuustheid bij het aangaan van eukaryotisch chromatine [5].

Hoewel nuclease-geïnduceerde dubbelstrengs DNA-breuk (DSB)-vorming robuuste en celcyclus-onafhankelijke gen-KO oplevert door het ontstaan van kleine inserties en deleties (indels) door niet-homologe end-joining (NHEJ)-paden, zijn deze DNA-herstelpaden verstorend in de context van gen-KI-procedures gebaseerd op homologie-gerichte reparatie (HDR) [6]. Bovendien vereist de mogelijkheid voor RGN off-target en on-target activiteiten en daaropvolgende mutagene effecten, die voortkomen uit NHEJ-processen, het ontwikkelen van nauwkeurigere en minder mutagene genoom-bewerkingsstrategieën. Een opkomende klasse van dergelijke DSB-onafhankelijke strategieën wordt besproken **in Hoofdstuk 2**, waar sequentie- en plaats-specifieke nucleasen ('nickases') afgeleid van CRISPR-systemen worden benut voor nauwkeurige HDR-gemedieerde gen-KI met behulp van op maat gemaakte donor-DNA-substraten. In tegenstelling tot DSB's zijn enkelstrengs DNA-breuken (SSB's) of nicks geen substraten voor mutagene

NHEJ DNA-herstelpaden, canoniek of anderszins. Als gevolg hiervan is genome engineering met behulp van nickases dramatisch bevoordeeld ten opzichte van precieze HDR boven onnauwkeurige NHEJ-gebeurtenissen. Opmerkelijk is dat hoewel genomische SSB's op zichzelf zwakke HDR-stimuli zijn, eerdere experimenten hebben aangetoond dat gelijktijdige SSB-vorming bij acceptor-genoomsequenties en donor-DNA-substraten door CRISPR/Cas9-nickases HDR-gemedieerde gen-KI bevordert [7-9]. De toepassing van dit generieke *in trans*-paired nicking-principe levert genome engineering op van stamcellen met minimale indel vorming, translocaties en P53-afhankelijke activering van de DNA-schaderespons (DDR) waarvan bekend is dat deze apoptose veroorzaakt of de celcyclusprogressie stopt die nodig is voor HDR [7,9]. Daarom zullen, zoals aangegeven in **Hoofdstuk 2**, celtherapieproducten die zijn afgeleid van het gebruik van RNA-programmeerbare nickases als zodanig of gekoppeld aan heterologe effectordomeinen, zoals prime editor reverse transcriptases of base editor deaminases, steeds vaker een complementaire set van 'zachte' genoombewerkingsopties gaan bieden waarvan de prestaties en veiligheidsprofielen mogelijk hoger zijn dan die voortvloeien uit het blootstellen van cellen aan programmeerbare nucleasen.

In **Hoofdstuk 3** wordt de relevantie van DSB-onafhankelijke genoombewerkingsinspanningen verder uitgewerkt door middel van een commentaar op een studie van Chai en collega's [10]. In deze studie worden base-editors op basis van Cas9-nickases die fuseren met deaminase-effectordomeinen getest met als doel de dystrofinesynthese te herstellen in *in vitro*- en *in vivo*-modellen van Duchenne-spierdystrofie (DMD; MIM: 310200). In het bijzonder identificeren de auteurs adenine-base-editors en cognate guide-RNA's die, door A·T-naar-G·C-overgangen te installeren bij splicing-motieven, leiden tot *DMD*-leesraamreparatie via exon-skipping en daaropvolgende verwijdering van voortijdige stopcodons die ontstonden door out-of-frame-deleties. Door gebruik te maken van dubbele AAV-vectoren voor trans-splicing-assemblage van complete base-editor-eiwitten, tonen de

auteurs inderdaad de redding van dystrofische eigenschappen op cellulair en organismeniveau aan in dystrofine-defecte muizen bij toediening van dubbele AAV-vectoren. Specifiek werden base-editorconstructies gekoppeld aan N- en C-terminale inteïnedomeinen gesplitst en verpakt in twee afzonderlijke AAV-vectoren die, na doelcelcotransducties, leidden tot inteïne-gemedieerde eiwittrans-splicing en in situ-assemblage van volledige base-editoreiwitten. Dit werk wijkt af van eerdere studies gebaseerd op duale AAV-afgifte van RGN's waarbij potentieel schadelijke uitkomsten in de vorm van prevalente end-joining 'capture' van Cas9-coderende AAV-genomen op nuclease-doellocaties werden gedetecteerd in verschillende muizenweefsels, waaronder skeletspieren [11,12].

Het is de consensus dat een belangrijk knelpunt met betrekking tot de toepassing van genoom-bewerkingstechnologieën de moeilijkheid betreft om de bijbehorende hulpmiddelen op een effectieve manier af te leveren, met name in normale, niet-getransformeerde, primaire cellen, waaronder therapeutisch relevante celtypen. In deze context maken fysieke en chemische transfectiemethoden gebaseerd op bijvoorbeeld elektroporatie, polyplexen en polykationen het mogelijk om RGN's en donor-DNA-constructies in zoogdiercellen te introduceren. Het bereiken van optimale transfectie-efficiënties zonder merkbare cytotoxische effecten in de bovengenoemde primaire celtypen blijft echter een uitdaging. Bovendien zijn elektroporatie noch transfecties van RGN's en/of donor-DNA-substraten gemakkelijk geschikt voor *in vivo*-instellingen. En vaak zijn deze methoden voor het leveren van genbewerkingstools afhankelijk van celtypespecifieke reagentia waarvan de samenstellingen om bedrijfseconomische redenen onbekend kunnen zijn. Eveneens opmerkelijk is dat elektroporatie en transfecties verder afhankelijk zijn van tijdrovende optimalisaties van celtypespecifieke parameters waarvan de prestaties kunnen variëren vanwege subtiele experimentele omstandigheden, bijvoorbeeld celcyclusfaseprofielen van doelcelpopulaties. Virale vectortransducties zijn daarentegen eenvoudig uit te voeren en bieden doorgaans een hogere reproduceerbaarheid, onafhankelijk

van het gekozen doelceltype [13]. Deze kenmerken komen voort uit de nauwkeurig afgestemde mechanismen die door de ouderlijke virussen zijn ontwikkeld voor de overdracht van nucleïnezuur naar de kernen van gastcellen.

In **Hoofdstuk 4**, geïnspireerd door de complementaire kenmerken van twee verschillende klassen van virale genvrije virale vectoren, namelijk adenovirale vectoren met hoge capaciteit (AdV) en AAV-vectoren (respectievelijk bijvoorbeeld grote vrachtcompatibiliteit en bron van recombinogene HDR-substraten), wordt een dubbel viraal vectorsysteem geïntroduceerd, gekarakteriseerd en getest voor HDR-gemedieerde gen-KI-doeleinden. In dit duale virale vector-genoombewerkingsplatform worden RGN-constructies verpakt in AdV-capsiden; terwijl donor-DNA-sjablonen in AAV-capsiden worden geplaatst.

Naast overwegingen over de levering van genoombewerkingstools die verband houden met de uiteindelijke efficiëntie van gen-KI-procedures, zijn er andere parameters om te overwegen met betrekking tot de specificiteit en precisie van donor-DNA-insertie. De specificiteit is het resultaat van het detecteren van donor-DNA-sequenties op de doellocatie; terwijl de precisie kan worden beoordeeld door de frequentie van nauwkeurige HDR-afhankelijke DNA-inserties boven onnauwkeurige NHEJ-afgeleide gebeurtenissen vast te stellen. In dit opzicht is de kennis over de relatieve bijdragen van verschillende AAV-donorontwerpen (d.w.z. conventioneel versus 'dubbel gesneden') en structuren (d.w.z. enkelstrengs versus dubbelstrengs) aan de specificiteit en precisieparameters van genoombewerking schaars. Daarom diende het duale virale vectorplatform dat in **hoofdstuk 4** werd bestudeerd, naast het bereiken van opmerkelijk hoge gen-KI-efficiënties in getransformeerde, niet-getransformeerde en primaire cellen, als een probe om de relatie te bestuderen tussen de eerdergenoemde AAV-DNA-arrangementen en de specificiteit en precisie van gen-KI en taggingprocedures. Dit onderzoek onthulde dat het combineren van

enkelstrengs AAV-afgifte van HDR-donoren met AdV-overdracht met hoge capaciteit van RGN-constructies leidt tot nauwkeurige genoombewerking in grote fracties van doelcelpopulaties. En het onthulde dat RGN-geïnduceerde chromosomale DNA-breuken productieve AAV-vectortransductie bevorderen, zoals gescoord door transgeenexpressie, vermoedelijk als gevolg van het bevorderen van enkelstrengs naar transcriptioneel competente dubbelstrengs DNA-conversie. Ten slotte wordt in **Hoofdstuk 4** verder het cruciale belang onthuld van het gebruik van high-fidelity RGN's voor het minimaliseren van off-target donor AAV-inserties in de vorm van defecte vectorgenomen waarvan bekend is dat ze verpakt zijn in vectordeeltjes [14,15].

Het eerdergenoemde recombinogene karakter van AAV-vectorgenomen, dat ze tot efficiënte HDR-substraten maakt, draagt ook bij aan hun promiscue "vangst" bij on-target en off-target of willekeurige chromosomale DNA-breuken door onnauwkeurige NHEJ-processen [11,12,16,17]. Deze end-joining-processen kunnen verder leiden tot chromosomale insertie van concatemere en subgenomische AAV-soorten, waardoor het bereik van HDR-onafhankelijke omstandergebeurtenissen verder wordt vergroot [11,12,17,18]. Tot slot kunnen AAV-genomen, mogelijk door het nabootsen van DNA-laesies of reparatie-intermediairen, de levensvatbaarheid van cellen aantasten door P53-afhankelijke DDR-activering waarvan de gevolgen naar verluidt bijzonder schadelijk zijn in stamcellen [19,20]. Concluderend geeft een groeiend aantal onderzoeken aan dat er onderscheidende genotoxische en cytotoxische effecten zijn gekoppeld aan respectievelijk chromosomaal geïntegreerde en episomale AAV-DNA-vormen, waarbij de opbouw van deze schadelijke effecten strikt evenredig is met de hoeveelheid AAV-vectorinvoer.

Om de tekortkomingen aan te pakken die verband houden met AAV-gebaseerde genoombewerking, werd in **hoofdstuk 5** een merkervrij coselectiesysteem [21] onderzocht, dat afhankelijk is van de krachtige specifieke remmer van de Na^+/K^+ ATPase-pomp, ouabaïne. Hiervoor werden

AAV-donorvectoren met een secundaire ouabaïne-selecteerbare donormodule en bijpassende gRNA-eenheden samengesteld en getest. Dergelijke AAV-ontwerpen, selector-AAV-vectoren genoemd, kunnen zorgen voor verrijking voor cellen die co-bewerkt zijn via een primaire doellocus en *ATP1A1*-allelen die resistentie verlenen tegen ouabaïne bij HDR-gemedieerde verwerving van specifieke polymorfismen. Belangrijk is dat naast verrijking voor gen-KI-celpopulaties, het combineren van selector-AAV-vectoren met ouabaïneselectie de eliminatie van HDR-onafhankelijke bewerkingen en off-target en/of willekeurige AAV-donor-DNA-inserties uit genoemde populaties veroorzaakte. Dit selector-AAV-principe werd succesvol toegepast voor het invoegen van hele transgenen op veilige haven-genomische loci en voor het taggen van endogene eiwitten. Verder onthulden selector-AAV-vectortitratie-experimenten dat de hoogste verrijkingsfactoren van gen-gerichte cellen geassocieerd zijn met de laagste vector doses. Deze eigenschap zou gunstig kunnen zijn voor het verlichten van zowel AAV-productiekosten als schadelijke P53-afhankelijke DDR-activering. Opmerkelijk is dat het dubbele virale vectorplatform dat **in hoofdstuk 4** wordt beschreven, werd gebruikt voor het stroomlijnen en uitbreiden van selector-AAV-vectortesten in moeilijk te transfecteren primaire cellen.

Zoals besproken in **Hoofdstuk 2** en **Hoofdstuk 3**, is er een groeiend besef dat, met name in DNA-schadegevoelige stamcellen, programmeerbare nuclease-geïnduceerde DSB's schadelijk zijn voor de stabiliteit van doelloci [22,23], en de levensvatbaarheid van cellen [7,19]. Het is veelzeggend dat $Cas9^{D10A}$-nickases, vergeleken met Cas9-nucleasen, notoir minder mutageen zijn bij zowel on-target als off-target genomische sequenties, zoals bepaald door reporter en onbevooroordeelde genoombrede high-throughput-assays, respectievelijk [24,25]. $Cas9^{D10A}$-nickases vertonen verder een sterk verminderde P53-afhankelijke DDR-activering wanneer ze naast hun Cas9-nuclease-tegenhangers worden getest [9,26]. In deze context hebben transductie-experimenten beschreven in **Hoofdstuk 5** aangetoond dat het combineren van een bepaald selector AAV-ontwerp, genaamd in-linkage

selector AAV, met Cas9- of Cas9^{D10A}-blootstelling leidt tot een significante toename van de frequenties van gen-gerichte cellen. De ouabaïne-afhankelijke verrijkingsfactor voor gen-gerichte cellen was ongeveer 7,5 keer hoger bij gebruik van Cas9^{D10A}-nickase-afgifte. Belangrijk is dat het combineren van in-linkage selector AAV-transductie met Cas9-nuclease of Cas9^{D10A}-nickase-afgifte leidde tot de grondige eliminatie van donor-DNA dat was geïnserteerd op off-target genomische posities van genoom-bewerkte celpopulaties. Daarom zijn deze proof-of-principle-experimenten die aangeven dat op selector AAV gebaseerde genoombewerking transleerbaar zijn naar protocollen met Cas9^{D10A}-geïnduceerde HDR relevant voor het verder verfijnen en toepassen van DSB-onafhankelijke celengineeringstrategieën.

Concluderend kan gesteld worden dat het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, door het onderzoek en de integratie van verschillende virale vectoren en RNA-programmeerbare Cas9-eiwitten, nieuwe inzichten en hulpmiddelen biedt voor het bevorderen van genoombewerking door het verbeteren van prestatieaspecten met betrekking tot de efficiëntie, specificiteit en betrouwbaarheid ervan.

References

1. Pacesa M, Pelea O, Jinek M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies. Cell 2024 187:1076-1100.
2. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014 346:1258096.
3. Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Curr Opin Microbiol. 2017 37:67-78.
4. Chen X, Gonçalves MAFV. DNA, RNA, and Protein Tools for Editing the Genetic Information in Human Cells. iScience 2018 6:247-263.
5. Chen X, Rinsma M, Janssen JM, Liu J, Maggio I, Gonçalves MA. Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools. Nucleic Acids Res. 2016 44:6482-92.
6. Liao H, Wu J, VanDusen NJ, Li Y, Zheng Y. CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. Mol Ther Nucleic Acids. 2024 35:102344.
7. Chen X, Janssen JM, Liu J, Maggio I, 't Jong AEJ, Mikkers HMM, Gonçalves MAFV.

In trans paired nicking triggers seamless genome editing without double-stranded DNA cutting. Nat Commun. 2017 8:657.

8. Nakajima K, Zhou Y, Tomita A, Hirade Y, Gurumurthy CB, Nakada S. Precise and efficient nucleotide substitution near genomic nick via noncanonical homology-directed repair. Genome Res. 2018 28:223-230.
9. Wang Q, Liu J, Janssen JM, Gonçalves MAFV. Precise homology-directed installation of large genomic edits in human cells with cleaving and nicking high-specificity Cas9 variants. Nucleic Acids Res. 2023 51:3465-3484.
10. Chai AC, Chemello F, Li H, Nishiyama T, Chen K, Zhang Y, Sánchez-Ortiz E, Alomar A, Xu L, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Single-swap editing for the correction of common Duchenne muscular dystrophy mutations. Mol Ther Nucleic Acids. 2023 32:522-535.
11. Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, Zaborowski MP, Volak A, Spirig SE, Muller A, Sousa AA, Tsai SQ, Bengtsson NE, Lööv C, Ingelsson M, Chamberlain JS, Corey DP, Aryee MJ, Joung JK, Breakefield XO, Maguire CA, György B. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. Nat Commun. 2019 10:4439.
12. Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, Oliver ML, Waller MA, Bohning JD, Robinson-Hamm JN, Bulaklak K, Castellanos Rivera RM, Collier JH, Asokan A, Gersbach CA. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. Nat Med. 2019 25:427-432.
13. Chen X, Gonçalves MA. Engineered Viruses as Genome Editing Devices. Mol Ther. 2016 24:447-457.
14. Wada M, Uchida N, Posadas-Herrera G, Hayashita-Kinoh H, Tsunekawa Y, Hirai Y, Okada T. Large-scale purification of functional AAV particles packaging the full genome using short-term ultracentrifugation with a zonal rotor. Gene Ther. 2023 30:641-648.
15. McColl-Carboni A, Dollive S, Laughlin S, Lushi R, MacArthur M, Zhou S, Gagnon J, Smith CA, Burnham B, Horton R, Lata D, Uga B, Natu K, Michel E, Slater C, DaSilva E, Bruccoleri R, Kelly T, McGivney JB 4th. Analytical characterization of full, intermediate, and empty AAV capsids. Gene Ther. 2024 31:285-294.
16. Miller DG, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. Nat Genet. 2004 36:767-773.
17. Ferrari S, Jacob A, Cesana D, Laugel M, Beretta S, Varesi A, Unali G, Conti A, Canarutto D, Albano L, Calabria A, Vavassori V, Cipriani C, Castiello MC, Esposito S, Brombin C, Cugnata F, Adjali O, Ayuso E, Merelli I, Villa A, Di Micco R, Kajaste-Rudnitski A, Montini E, Penaud-Budloo M, Naldini L. Choice of template delivery

mitigates the genotoxic risk and adverse impact of editing in human hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell 2022 29:1428-1444.

18. Suchy FP, Karigane D, Nakauchi Y, Higuchi M, Zhang J, Pekrun K, Hsu I, Fan AC, Nishimura T, Charlesworth CT, Bhadury J, Nishimura T, Wilkinson AC, Kay MA, Majeti R, Nakauchi H. Genome engineering with Cas9 and AAV repair templates generates frequent concatemeric insertions of viral vectors. Nat Biotechnol. 2025 43:204-213.
19. Schiroli G, Conti A, Ferrari S, Della Volpe L, Jacob A, Albano L, Beretta S, Calabria A, Vavassori V, Gasparini P, Salataj E, Ndiaye-Lobry D, Brombin C, Chaumeil J, Montini E, Merelli I, Genovese P, Naldini L, Di Micco R. Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response. Cell Stem Cell. 2019 24:551-565.
20. Allen D, Weiss LE, Saguy A, Rosenberg M, Iancu O, Matalon O, Lee C, Beider K, Nagler A, Shechtman Y, Hendel A. High-Throughput Imaging of CRISPR- and Recombinant Adeno-Associated Virus-Induced DNA Damage Response in Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. CRISPR J. 2022 5:80-94.
21. Agudelo D, Duringer A, Bozoyan L, Huard CC, Carter S, Loehr J, Synodinou D, Drouin M, Salsman J, Dellaire G, Laganière J, Doyon Y. Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells. Nat Methods. 2017 :615-620.
22. Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E, Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nat Biotechnol. 2015 33:179-186.
23. Kosicki M, Tomberg K, Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. Nat Biotechnol. 2018 36:765-771.
24. Chen X, Tasca F, Wang Q, Liu J, Janssen JM, Brescia MD, Bellin M, Szuhai K, Kenrick J, Frock RL, Gonçalves MAFV. Expanding the editable genome and CRISPR-Cas9 versatility using DNA cutting-free gene targeting based on in trans paired nicking. Nucleic Acids Res. 2020 48:974-995.
25. Wang Q, Liu J, Janssen JM, Le Bouteiller M, Frock RL, Gonçalves MAFV. Precise and broad scope genome editing based on high-specificity Cas9 nickases. Nucleic Acids Res. 2021 49:1173-1198.
26. Hyodo T, Rahman ML, Karnan S, Ito T, Toyoda A, Ota A, Wahiduzzaman M, Tsuzuki S, Okada Y, Hosokawa Y, Konishi H. Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53. Cell Rep. 2020 30:1195-1207.