

腺嘌呤碱基编辑器的优化与调控

张弛^{1,2#} 何梓妍^{1,2#} 杨玉东^{1,2#} 宋奕萱^{1,2} 张明亮^{1,2*}⁽¹上海交通大学医学院, 组织胚胎学与遗传发育学系, 上海 200025; ²上海市生殖医学重点实验室, 上海 200025)

摘要 腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)是基于CRISPR/Cas系统开发的单碱基编辑系统。ABE通过人工进化的大肠杆菌中的腺嘌呤脱氨酶(tRNA specific adenosine deaminase, Tada*)与酿脓链球菌切口酶(streptococcus pyogenes Cas9 nickase, nSpCas9)融合, 实现了对基因组DNA的A·T>G·C单碱基替换。自开发以来, ABE经历了多轮进化以提升编辑效率。同时人们筛选出一系列针对ABE活性的调控因子(包括化学小分子、噬菌体多肽等), 通过改变蛋白结构、提高蛋白表达水平或调控DNA修复通路等方式改善编辑效率和精度, 增加编辑的可控性, 拓宽了ABE的应用范围。目前, ABE及其调控手段已展现出巨大的基础研究价值与临床应用潜力。该文综述了ABE的优化历程及调控手段, 并展望了ABE编辑技术的未来发展方向。

关键词 CRISPR/Cas; 腺嘌呤碱基编辑器; 碱基编辑调控

Optimization and Regulation of Adenine Base Editors

ZHANG Chi^{1,2#}, HE Ziyang^{1,2#}, YANG Yudong^{1,2#}, SONG Yixuan^{1,2}, ZHANG Mingliang^{1,2*}⁽¹Department of Histoembryology, Genetics, and Developmental Biology, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; ²Shanghai Key Laboratory of Reproductive Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract ABE (adenine base editor) is a single-base editing system based on the CRISPR/Cas system. ABEs are constructed by fusing artificially evolved Tada* (adenine deaminase) with *Streptococcus pyogenes* Cas nickase to achieve A·T>G·C single-base substitutions in genomic DNA. Since its development, ABE has undergone multiple rounds of evolution to improve its editing efficiency. Meanwhile, a series of regulatory factors targeting structural modules of ABE or related cellular pathways have been identified, enabling spatial-temporal control of their activity and greatly expanding their applications. Currently, ABEs, as well as regulatory factors, have shown great potential in basic research and clinical applications. This article reviews the evolution of ABE and the investigation of their regulatory approaches, and prospects for the development of adenine base editing technology.

Keywords CRISPR/Cas; adenine base editor; regulation of ABE

人类遗传疾病突变中超过半数是点突变。根据人类基因组变异数据库ClinVar分析, G·C>A·T突变约占点突变的48%^[1-2]。因此, 实现精准DNA单碱基

替换, 可以从根本上纠正相关的人类遗传病, 助力生物进化筛选和基因功能研究^[3]。由此可见, 开发高效精确的碱基编辑工具意义重大。

收稿日期: 2023-05-14 接受日期: 2023-07-10

国家科技部重点研发专项(批准号: 2020YFA0113101、2021YFA1100800)、国家自然科学基金(批准号: 32070866)、上海市细胞稳态与人类疾病前沿科学中心和中央高校基本科研业务费资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 021-54562516, E-mail: mingliang.zhang@shsmu.edu.cn

Received: May 14, 2023 Accepted: July 10, 2023

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2020YFA0113101, 2021YFA1100800), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070866), Shanghai Frontiers Science Center of Cellular Homeostasis and Human Diseases, and the Fundamental Research Funds for the Central Universities

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-21-54562516, E-mail: mingliang.zhang@shsmu.edu.cn

2016年, LIU实验室^[4]率先开发出基于CRISPR/Cas系统融合大鼠胞嘧啶脱氨酶APOBEC1的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE), 实现了基因组DNA的C·G>T·A单碱基编辑。2017年, 他们又将来源于大肠杆菌的tRNA腺嘌呤脱氨酶TadA(tRNA-specific adenosine deaminase), 通过定向进化并融合于CRISPR/Cas系统后, 获得了能够在基因组DNA介导A·T>G·C单碱基替换的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE), 并开发出具有较高编辑活性的ABE 7.10版本^[5]。ABE碱基编辑器催化活性高、不依赖细胞周期、不引入双链断裂(double strand breaks, DSB)且无需外源DNA修复模板, 因此为单碱基编辑提供了便捷高效的工具^[5]。

ABE被广泛应用于基础研究中, 在纠正镰状细胞病^[6]、早衰症^[7]相关的遗传突变, 调控基因剪切^[8]等研究中已经显示出良好的应用前景, 助力临床遗传疾病诊断和治疗靶点发掘。然而, 在不同细胞类型或基因组不同位点中, ABE的编辑活性不均一, 且存在DNA^[9]和RNA水平脱靶^[10-11]。为了降低ABE对基因组、转录组水平脱靶的影响, 并降低非目标时间编辑、非靶向细胞编辑带来的风险, 研究人员需要对ABE编辑活性、编辑窗口、作用时间和作用空间进行高精度调控, 提高ABE编辑活性和特异性, 发挥更精准的编辑效果^[12]。因此, 提高ABE精确性和可控性是单碱基编辑研究的重要方向。

本文将回顾ABE的优化历程, 介绍针对ABE活性和精确性的调控方法, 及其相关外源调控因子的研究进展, 并对其未来可能的发展方向进行展望。

1 ABE的开发和优化

1.1 ABE的开发及定向进化

自然界中不存在能够催化DNA底物中腺嘌呤脱氨的酶。2017年, LIU实验室^[5]将大肠杆菌的tRNA腺嘌呤脱氨酶融合于nCas9, 通过分子进化对ABE进行了7轮筛选, 在ecTadA中保留14个定向突变, 开发出了在HEK293T细胞基因组DNA中介导腺嘌呤高效脱氨的腺嘌呤脱氨酶ecTadA*。该腺嘌呤脱氨酶可以将腺嘌呤(A)催化为次黄嘌呤(I), 次黄嘌呤在DNA修复中常被识别为鸟嘌呤(G), 通过碱基错配修复途径, 实现A-G的转换。通过这一途径, LIU团队^[5]成功开发了ABE 7.10(ecTadA-ecTadA*-nCas9), 其最佳编辑活性窗口为4~7位。

1.2 ABE的活性优化

ABE通过以下关键过程催化基因编辑: (1) ABE在Cas9引导下识别前间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM), 由向导RNA(guide RNA, gRNA)与目标DNA链结合实现“定位”; (2) gRNA与互补DNA序列形成“R-loop”结构, 释放出游离的单链DNA作为脱氨酶的底物; (3) 脱氨酶与底物结合并在一定的“窗口”内执行脱氨功能^[5]。在定位、结合、脱氨的过程中, ABE存在定位受限^[13]、底物错配^[10-11]、脱氨效率低^[5]、脱氨窗口狭窄^[13]、非目标转换等^[9]问题, 制约了高精度、高效率的单碱基编辑发展。为了解决这些问题, 科学家们从不同角度对ABE进行了优化, 利用结构改造^[13-14]、密码子优化^[13]、蛋白定向进化^[14-15]等方式, 开发出了更高效、灵活的ABE编辑系统。

1.2.1 针对ABE活性的优化 ABE编辑活性不均一主要体现在三个方面。第一, 在不同类型组织或细胞中活性差异大, 这种差异可能是由于递送水平不同引起的, 可以通过优化递送手段得到缓解^[12]。第二, 同一细胞不同基因组位点之间, 其基因组修饰和螺旋化程度不同, 导致催化活性不一致^[16], 这种差异主要通过提高脱氨酶自身催化活性改善, 是本部分阐述的重点。第三, 在同一编辑窗口内, 窗口中心腺嘌呤与边缘腺嘌呤编辑效果不均等, 呈现“中间高, 边缘低”的趋势^[5]。通过改变活性窗口来改善边缘活性的系列研究将在靶向范围内容中详细阐述。总之, 如何有针对性地不同角度优化编辑活性, 使ABE发挥最优的编辑效果, 是基因编辑领域研究的主要方向。

优化ABE自身结构可以提高编辑活性。LIU等^[13]通过增加ABE 7.10的核定位信号(nuclear localization signal, NLS)数量并优化密码子, 构建了平均A>G替换效率约52%的ABEmax。脱氨酶进化有望进一步提高编辑活性, GAUDELLI等^[14]通过脱氨酶突变文库筛选, 在ABE 7.10的基础上获得了平均编辑效率提升约4.2倍的ABE 8.20。类似地, RICHTER等^[15]使用噬菌体辅助进化技术(phage-assisted non-continuous and continuous evolution, PANCE and PACE)进化了eTadA单体, 开发了两组新的ABE变体(ABE 8e和ABE 8s)。其中ABE 8e的活性比ABE 7.10提高3~11倍, 同时编辑窗口扩大至A2~A11^[15]。ROTHGANGL等^[17]和KIRAN等^[18]分别利用ABEmax和ABE8.8在非

人类灵长类动物的肝脏中进行功能丧失突变编辑, 实现了PCSK9的敲低, 降低了血液中低密度脂蛋白的水平, 展示了ABE治疗家族性高胆固醇血症的潜力。

1.2.2 针对ABE靶向范围的优化 SpCas9依赖PAM序列NGG, 这意味着在SpCas9引导下ABE可靶向的范围受到NGG序列在基因组分布的影响^[3]。改变靶向范围可以通过(1) 替换识别不同PAM序列的Cas蛋白; (2) 进化ABE编辑窗口等方式实现。因此, 研究人员一方面通过提高脱氨酶与不同来源Cas蛋白的兼容性以拓展PAM种类, 另一方面通过ABE结构进化及蛋白进化来实现编辑窗口的转变。

WALTON等^[19]通过将不同Cas9突变体、不同菌种来源的Cas9替换到ABE max中, 构建了以NG-ABE max为代表的一系列变体, 将编辑窗口从4~5个核苷酸扩大到8~9个核苷酸, 靶向位点的PAM选择范围包括NGA(SpCas9-VQR / SpCas9-VRQR)、NGCG(SpCas9-VRER)、NGN(xCas9)、NG(SpCas9-NG)、NNGRRT(SaCas9), 拓展了单碱基编辑靶向覆盖率。RICHER等^[15]构建了多种Cas9突变及同源物的系列变体, 在保留高编辑活性的同时扩展了PAM识别范围。

ABE的另一个进化方向是改变编辑窗口。拓宽编辑窗口有助于提高可编辑位点在全基因组水平上的覆盖率, 提高应用广度; 缩窄编辑窗口可以降低旁观者编辑效率, 提高编辑准确性^[3]。基于蛋白结构功能的研究, 科学家们发现特定位点的不同突变能够影响脱氨酶的活性或窗口, 并以此开发出不同活性窗口范围的一系列ABE变体。BAE等^[20]分析了ABE 7.10脱氨酶与十几种其他TadA同源物的氨基酸序列, 对其中高度保守的P48和D108等位点进行了多向突变, 发现D108Q、F148A双突变可以限制编辑窗口至A5~A7, 同时降低了窗口内的旁观者胞嘧啶/腺嘌呤编辑效率, 提高了ABE 7.10的编辑精确性。CHEN等^[21]通过对ABE 8e脱氨酶冷冻电镜结构分析, 对形成结合口袋的十个氨基酸进行突变筛选, 发现D108Q和L145T突变可以将ABE 8e的编辑窗口缩窄至A5~A6, 从而构建了ABE 9, 减少了非目标编辑, 并在小鼠胚胎中对毛发相关基因A5目标突变实现了精准编辑。ZHANG等^[22]将TadA 8e融合在dCas12f1(PAM位置-3~0, 窗口位置1~20)上, 发现在Cas12f1中引入D143R/T147R/E151A突变(dRRA)

后, N-端、C-端融合引入V82G或V106W的TadA, 分别展示出PAM近端和远端的两个窗口, 提示Cas与脱氨酶融合的结构影响底物可及性, 进而影响编辑范围(表1)。针对不同应用场景的靶点特性, 选择合适的ABE变体, 能够实现最精准有效的目标编辑。

目前对ABE编辑窗口的优化主要以降低旁观者编辑效率为目标, 替换Cas蛋白^[19]、改变TadA与Cas的融合方式^[22]以及引入TadA突变的调控方式^[20-21]均能影响ABE编辑窗口, 但多数改变编辑窗口的手段都会使编辑活性降低。此外, ClinVar数据库中G>A点突变仅有约48%可以被ABE 8e的编辑窗口靶向^[11], 位于PAM近端的A12~A20还缺乏高效精确的靶向方式。因此, 开发编辑窗口平移或全窗口的ABE编辑器同样具有重要的应用价值。

1.3 针对ABE体积的优化

在实际应用当中, 由于SpCas9体积较大, ABE总体积超过了AAV病毒包装的上限, 应用场景受限^[12]。因此, 对ABE的体积进行优化有助于其临床应用的推进。目前针对ABE体积的优化主要聚焦于小体积Cas蛋白的发现和进化。HARRINGTON等^[23]筛选了数万个基因组, 发现了仅有400~700个氨基酸的超小体积Cas14, 但Cas14与TadA的兼容性还有待进一步研究。KIM等^[24]在gRNA改造的基础上, 进一步优化与Cas12f高度同源的TnpB核酸酶, 将dTnpB(D354A)与脱氨酶Tad二聚体融合, 成功开发出紧凑型单碱基编辑器TaRGET-ABE, 其脱靶率较高。DAVIS等^[25]利用TadA*与不同种类的小体积Cas9进行组合, 开发了一系列具有不同PAM依赖性的小体积ABE, 拓宽了小体积编辑器的应用场景。

来自脑膜炎奈瑟菌的Cas9变体Nme2Cas9 (1082 aa)尺寸远小于SpCas9 (1368 aa), HUANG等^[26]利用噬菌体辅助的非连续进化和eVOLVER支持的噬菌体辅助连续进化, 将Nme2Cas9进化成识别单核苷酸嘧啶/嘌呤-PAM序列的变体, 进化出依赖胸腺嘧啶的小体积ABE变体eNme2-T.1、eNme2-T.2和依赖胞嘧啶的小体积ABE变体eNme2-C、eNme2-C-NR。以上研究主要从Cas蛋白体积减小的角度优化了ABE的体积, 但小体积ABE在病毒包装和体内递送上的效率, 以及基于不同Cas蛋白的ABE活性等还有待应用与验证。

表1 针对腺嘌呤碱基编辑器的内源调控

Table 1 Endogenous regulation targeting the adenine base editor

ABE版本 ABE versions	靶向范围 Editing window	平均编辑效率 Average editing	脱靶水平 Off-target editing	参考文献 Reference
ABE 7.10	4-7	50%	Off-target editing $\geq 0.2\%$ at DNA level, undetectable off-target editing at RNA level	[5]
ABEmax (ABE 8)	4-8	52%	Off-target editing range from 10% to 80% at RNA level	[10,13,32]
ABEmax (del153/ del153*)	4-8	40%	Off-target editing $< 20\%$ at RNA level	[34]
ABE 8e	4-8	18%-86%	Decreased off-target editing at both DNA and RNA level	[15]
ABE 9	4-6	80%	Undetectable off-target editing at both DNA and RNA level	[22]
N-dRRAABE- TadA*82G	15-20	25%	Decreased off-target editing of miniABEs	[23]
CL-dRRAABE- TadA*82G	1-5	15%		[23]

“靶向范围”中, ABE 7.10、ABEmax(ABE 8)、ABEmax(del153/del153*)、ABE 8e、ABE 9等定义gRNA序列5'→3'为1~20位, PAM(NGG)为21~23位; N-dRRAABE-TadA*82G、CL-dRRAABE-TadA*82G定义PAM(TTTR)为-3~0位, gRNA序列5'→3'为1~20位。

“Editing Window” defines the sequence of gRNA on position 1-20 and PAM (NGG) on position 21-23 for ABE 7.10, ABEmax (ABE 8), ABEmax (del153/del153*), ABE 8e and ABE 9; PAM (TTTR) on position -3-0 and gRNA sequence on position 1-20 for N-dRRAABE-TadA*82G and CL-dRRAABE-TadA*82G.

2 ABE的脱靶效应及其调控

ABE的脱靶编辑可能对细胞基因组、转录组造成不可逆的非靶向突变。一方面, ABE存在CRISPR/Cas系统固有的gRNA错配脱靶^[9]; 另一方面, 腺嘌呤脱氨酶原始作用底物为RNA, Cas非依赖性DNA随机脱靶水平很低, 但带来了较高的Cas非依赖性转录组水平随机脱靶^[10-11]。开发针对降低脱靶率的调控手段有助于进一步实现精准编辑^[27]。

2.1 gRNA/Cas依赖性DNA水平脱靶的调控

gRNA可能与靶DNA位点相似的序列产生错配, 从而发生脱靶编辑。限制gRNA的错配活性对于精准编辑意义重大, RYU等^[28]评估了ABE 7.10 gRNA对碱基错配的容忍度, 并发现适当改变长度的gRNA可以降低脱靶效率。替换保真度更高的Cas同源蛋白或变体有望降低DNA错配导致的脱靶率, KIM等^[29]使用高保真Cas蛋白变体Sniper-Cas9降低了ABE 7.10依赖于Cas蛋白的脱靶率, 全面提高了ABE在全基因组编辑的精准度。LIU实验室^[30]借助冷冻电镜技术发现Cas9蛋白在脱靶位点具有不同的DNA结合方式, 为研究ABE的脱靶效应发生机制提供了线索。

2.2 RNA水平脱靶的调控

TadA脱氨酶在获得DNA脱氨活性的同时保

留了RNA脱氨活性, 造成转录组水平的随机脱靶。GRÜNEWALD等^[10,31]和REES等^[32]在2019年报道了ABE存在严重的转录组水平脱靶。ZHOU等^[11]对ABE的转录组水平脱靶进行了系统性分析, 在ABE 7.10中分别引入了F128A、D53E突变, 限制了ABE的转录组水平脱靶。REES等^[32]通过分析ABEmax的作用结构, 发现在TadA中引入E59A或E59Q突变, 以及在TadA*中引入V106W突变可以广泛抑制其RNA编辑活性。LI等^[33]发现, TadA内的精氨酸153(R153)对具有核心tRNA样结构(UACGA motif)的RNA脱氨非常关键, 删除了R153(del153/del153*和minide153)的TadA和/或TadA* RNA脱靶率显著降低。

ABE在DNA水平和RNA水平诱导脱靶数量的巨大差异, 可能与ABE对DNA和RNA脱氨过程的不同调控机制有关^[34]。探究ABE在不同底物上的脱氨机制, 对进一步调控ABE脱靶具有重要意义。

3 ABE的调控分子

精准且高效的单碱基编辑一方面依赖于腺嘌呤碱基编辑器自身高编辑效率和低脱靶效应, 另一方面, 辅助性的外源分子对时空编辑的精准操控也至关重要。因此, 筛选碱基编辑器活性的调控因子意义重大。已报道的调控介质主要作用于Cas9及其

变体, 包括噬菌体多肽^[35-36]、蛋白质抑制物^[37]、小分子化合物^[38-41]等。本文综述了针对ABE结构和作用通路而开发的调控分子。

3.1 针对ABE结构调控的抑制分子

针对Cas蛋白结构开发活性抑制剂能够限制ABE的编辑广度, 因而提高了ABE的编辑精准度。噬菌体衍生肽G8P_{PD}是SpCas9的抑制剂, 能够与PAM相互作用结构域(PAM interacting domain, PI)结合, 并以变构方式抑制Cas蛋白的活性^[35]。JIA等^[36]发现在人类细胞中过表达G8P_{PD}可以将ABE 7.10催化活性限制在更窄的编辑窗口中(A7~A9)。这种方法在马凡综合征细胞模型和小鼠胚胎中都表现出更低的旁观者编辑率。

开发能够实现开关的Cas蛋白结构抑制分子有助于编辑时间调控, 实现在特定阶段诱导编辑, 提高临床应用的安全性和精准性。这一调控方式目前在CBE中得到了初步验证。WANG等^[42]利用脱氧胞苷脱氨酶抑制剂(deoxycytidine deaminase inhibitor, dCDI)结构域构建了tBE变体系统。tBE在非目标位点的活性被dCDI抑制, 因此不会产生非目标编辑; 在目标位点上, dCDI结构域被裂解, tBE激活并催化定向脱氨以进行精确的碱基编辑。tBE系统在小鼠体内Pcsk9位点显示出约30%的定向C>T编辑效率。这种“非靶向抑制-靶向激活”系统提高了碱基编辑的纯净度, 并在体内模型中展示出治疗应用的潜力。基于蛋白结构的抑制调控分子在ABE上的作用有待进一步验证。

WEI等^[43]开发了一种多功能、化学控制和快速激活的ciCas9。在ciCas9中, REC2结构域被Bcl-xL取代, 并在C-端连接肽段BH3。Bcl-xL和BH3形成紧密复合物, 抑制Cas9的活性; 加入小分子A-1155463会破坏Bcl-xL和BH3之间的相互作用, 导致靶向位点可诱导的、剂量依赖性的DSBs。同时, ciCas9在ABE、CBE、先导编辑器(prime editor, PE)等多种基因编辑工具中都实现了精确调控^[43]。这种方式为精准控制Cas9及其相关编辑工具提供了一种简单、通用的调控思路。

3.2 针对ABE通路调控的促进分子

针对ABE编辑修复通路开发ABE小分子促进剂, 将在促进ABE的作用效果的同时, 提高在临床应用中靶向区域、靶向窗口的时空特异性^[3]。小分子化合物由于其稳定、容易合成、便于递送等优点,

具有极大的临床转化潜力, 能够拓宽ABE的编辑精度和应用范围。SHIN等^[39]基于荧光报告系统, 筛选了414个具有抗癌特性的化合物, 发现HDAC1/2抑制剂Romidepsin通过提高质粒递送效率和编辑器蛋白表达水平, 普遍地提高ABE 7.10、ABEmax以及BE3、BE4max等的编辑效率。类似地, ZHAO等^[40]利用荧光转换报告系统, 筛选了包含2 863个FDA获准药物的化合物库, 发现了HDAC6抑制剂Ricolinostat和Nexturastat A通过提高编辑器蛋白表达水平, 能够无差别地提高ABEmax-NG和BE3的编辑效率(图1)。以上研究鉴定的小分子促进剂均围绕HDAC信号通路发挥作用, 但HDAC通路抑制对全基因组的影响及对编辑元件活性、精准度调控的特异性仍有待进一步评估。

围绕其他通路且特异性提高ABE活性的小分子将为揭示ABE调控的细胞生物学机制提供更多信息。YANG等^[41]利用双荧光报告系统, 高通量筛选小分子ABE激活剂, 发现以SB505124为代表的一系列TGF- β 通路抑制剂能够特异性提高各种版本ABE的编辑效率, 显示出调控的特异性。ABE在基因组不同位点的编辑效率存在差异, 在测试后研究者发现, SB505124还提高了ABE在基因组DNA甲基化区域和异染色质区域等难治性位点的编辑效率, 展现出良好的应用前景。机制上, SB505124可能通过阻断经典TGF- β 通路, 下调DNA合成过程中类解旋酶转录因子(helicase like transcription factor, HLTF)的表达, 进而提高ABE编辑效率。此研究首次揭示了TGF- β 信号通路对ABE的调控作用, 提示ABE的调控受到更多潜在信号通路的影响, 筛选开发更加高效、特异的小分子ABE编辑调节剂值得进一步的探索(图1)。

4 挑战与展望

目前ABE已经被应用于疾病突变修复^[45-47]、疾病模型构建^[48]、植物育种^[49-50]等, 并展现出巨大的应用潜力。然而, ABE还存在很多局限性, 在靶向范围、包装体积、脱靶水平和时空调控等方面还有待进一步优化。

单碱基编辑工具发挥作用依赖Cas蛋白对PAM的识别, 而PAM序列与靶点分布的不平衡造成了ABE编辑的局限性^[3]。ABE高效编辑窗口一般在4~9位, 仍有大量靶位点超出高效编辑窗口的范围,

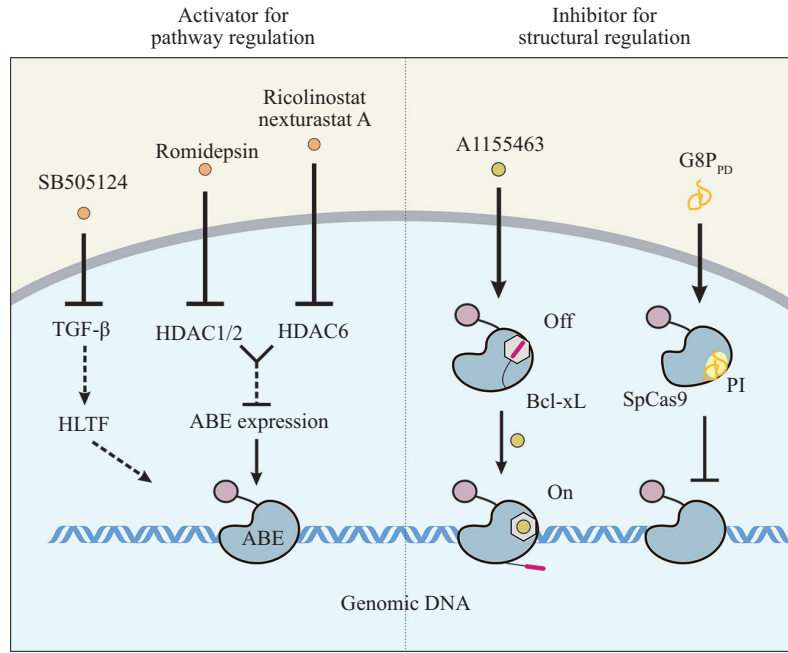


图1 ABE的调控手段及机制(根据参考文献[36-41]修改)

Fig.1 Regulatory controls and mechanisms of ABE (modified from references [36-41])

限制了ABE在各种场景中实现“饱和”编辑^[5,19]。首先,通过Cas蛋白变体进化丰富PAM序列的多样性,能够提高基因组覆盖率^[3,5,19]。其次,调整ABE的编辑窗口也可以提高基因组覆盖率,更宽的编辑窗口能够覆盖更大的编辑范围,缩窄的窗口有利于提升编辑的精准度,而“平移”的编辑窗口可以实现靶向范围的互补^[15,19-22]。总之,小巧、高效、精准且覆盖率广泛的ABE仍有待开发,调控ABE靶向基因组的覆盖率将极大拓宽ABE的应用场景。

ABE体积较大,超过了AAV病毒包装的上限,在递送上还存在优化可能^[12,46]。已有一些研究利用不同种属来源或不同亚型的Cas蛋白来开发紧凑型ABE,但不同的Cas蛋白往往在体积、活性和保真度等方面难以兼顾,如SaCas9、Cas12f等在融合TadA8e后,编辑活性较SpCas9有所损失^[19,22,26]。为了避免这种损失,一方面可以不断开发并进化更小型、高效的Cas蛋白或脱氨酶,另一方面,改善现有的ABE结构,使其在不同载体表达但能实现高效重组激活,发挥高效编辑效果,也为降低脱靶效应提供一种解决方案。

ABE在RNA水平产生的随机脱靶编辑远高于DNA水平^[10-11]。目前已有的大量研究针对ABE的脱靶编辑进行研究,而ABE在靶向位点和脱靶位点诱导脱氨,以及对不同底物(RNA和DNA)诱导脱氨的

机制是否存在差异尚不清楚^[21,30-31]。从进化过程上看,ABE融合的ecTadA*脱氨酶可能保留了RNA特异性催化活性域^[30]。同时,调控ABE在靶与脱靶编辑的细胞生物学机制仍需进一步鉴定。这将为ABE的调控手段提供潜在靶点。

最后,ABE的外源调控因子仍是调控研究的主要方向^[3,41]。ABE对DNA底物的编辑是永久性的,且存在难以避免的全基因组、全转录组脱靶,因此在特定时间和特定空间中发挥编辑效果对基因编辑的发展至关重要。目前开发的抑制因子主要集中于对ABE结构的调控,这种竞争阻断作用可能在体内受限,且ABE“非靶向抑制,靶向激活”的实现还有待研究^[36,42-43]。目前研究开发的激活剂作用范围有限,且作用机制不够透彻。从另一种角度来看,发生单碱基编辑后,细胞内错配修复的作用机制仍不清楚。因此,开发碱基编辑器的抑制剂/激活剂对进一步阐释碱基突变修复相关的细胞生物学机制具有重要推动作用^[50]。

综上所述,ABE作为一种精确、简便的DNA单碱基编辑工具,能够在核基因组高效介导A>G碱基转换,在基础研究和临床转化中应用前景广阔。未来以阐明碱基修复通路为主要方向,开发ABE编辑活性和窗口的精准时空调控方式,有助于实现更加安全可控的单碱基基因编辑,推动基因编辑在人类

医学研究中的深远发展。

参考文献 (References)

- [1] LANDRUM M J, LEE J M, BENSON M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D862-8.
- [2] REES H A, LIU D R. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2018; 19(12): 770-88.
- [3] ANZALONE A V, KOBLAN L W, LIU D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases, and prime editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-44.
- [4] KOMOR A C, KIM Y B, LIU D R, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-4.
- [5] GAUDELLI N M, KOMOR A C, REES H A, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-71.
- [6] NEWBY G A, YEN J S, WOODARD K J, et al. Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice [J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 295-302.
- [7] KOBLAN L W, ERDOS M R, WILSON C, et al. *In vivo* base editing rescues hutchinson-gilford progeria syndrome in mice [J]. *Nature*, 2021, 589(7843): 608-14.
- [8] WINTER J, LUU A, GAPINSKE M, et al. Targeted exon skipping with AAV-mediated split adenine base editors [J]. *Cell Discov*, 2019, 5: 41.
- [9] ZUO E, SUN Y, YANG H, et al. Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice [J]. *Science*, 2019, 364(6437): 289-92.
- [10] GRÜNEWALD J, ZHOU R, GARCIA SP, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 433-7.
- [11] ZHOU C, SUN Y, YAN R, et al. Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis [J]. *Nature*, 2019, 571(7764): 275-8.
- [12] LEVY J M, YEH W H, PENDSN, et al. Cytosine and adenine base editing of the brain, liver, retina, heart and skeletal muscle of mice via adeno-associated viruses [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4(1): 97-110.
- [13] KOBLAN L W, DOMAN J L, WILSON C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(9): 843-6.
- [14] GAUDELLI N M, LAM D K, REES H A, et al. Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 892-900.
- [15] RICHTER M F, ZHAO K T, ETON E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 883-91.
- [16] WANG X, LI J N, WANG Y, et al. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A Cas9 fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 946-9.
- [17] ROTHGANGL T, DENNIS M K, LIN P J C, et al. *In vivo* adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(8): 949-57.
- [18] MUSUNURU K, CHADWICK A C, MIZOGUCHI T, et al. *In vivo* CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in primates [J]. *Nature*, 2021, 593(7859): 429-34.
- [19] WALTON R T, CHRISTIE K A, WHITTAKER M N, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368(6488): 290-6.
- [20] JEONG Y K, LEE S, SANGSU B, et al. Adenine base editor engineering reduces editing of bystander cytosines [J]. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(11): 1426-33.
- [21] CHEN L, ZHANG S, XUE N, et al. Engineering a precise adenine base editor with minimal bystander editing [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(1): 101-10.
- [22] ZHANG S, SONG L, YUAN B, et al. TadA reprogramming to generate potent miniature base editors with high precision [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 413.
- [23] HARRINGTON L B, BURSTEIN D, CHEN J S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes [J]. *Science*, 2018, 362(6416): 839-42.
- [24] KIM D Y, CHUNG Y, LEE Y, et al. Hypercompact adenine base editors based on a Cas12f variant guided by engineered RNA [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, 19(3): 389.
- [25] DAVIS J R, WANG X, WITTE I P, et al. Efficient *in vivo* base editing via single adeno associated viruses with size-optimized genomes encoding compact adenine base editors [J]. *Nature Biomed Eng*, 2022, 6(11): 1272-83.
- [26] HUANG T P, HEINS Z J, MILLER S M, et al. High-throughput continuous evolution of compact Cas9 variants targeting single-nucleotide-pyrimidine PAMs [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(1): 96-107.
- [27] PORTO E M, KOMOR A C, SLAYMAKER I M, et al. Base editing: advances and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev*, 2020, 19(12): 839-59.
- [28] RYU S M, KOO T, KIM K, et al. Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(6): 536-9.
- [29] KIM D, KIM D E, LEE G, et al. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 430-5.
- [30] BRAVO J P K, LIU M S, HIBSHMAN G N, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9 [J]. *Nature*, 2022, 603(7900): 343-7.
- [31] GRÜNEWALD J, ZHOU R, IYER S, et al. CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(9): 1041-8.
- [32] REES H A, WILSON C, DOMAN J L, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors [J]. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaax5717.
- [33] LI J, YU W, HUANG S, et al. Structure-guided engineering of adenine base editor with minimized RNA off-targeting activity [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2287.
- [34] MARINO N D, PINILLA-REDONDO R, CSÖRGÖ B, et al. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(5): 471-9.
- [35] CUI Y R, WANG S J, CHEN J, et al. Allosteric inhibition of CRISPR-Cas9 by bacteriophage-derived peptides [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 51.
- [36] JIA K, CUI Y R, HUANG S, et al. Phage peptides mediate precision base editing with focused targeting window [J]. *Nat Com-*

- mun, 2022, 13(1): 1662.
- [37] BONDY-DENOMY J. Protein inhibitors of CRISPR-Cas9 [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(2): 417-23.
- [38] RAY U, VARTAK S V, RAGHAVAN S C. NHEJ inhibitor SCR7 and its different forms: promising CRISPR tools for genome engineering [J]. *Gene*, 2020, 763: 144997.
- [39] SHIN H R, SEE J E, KWEON J, et al. Small-molecule inhibitors of histone deacetylase improve CRISPR-based adenine base editing [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(4): 2390-9.
- [40] ZHAO T, LI Q, ZHOU C, et al. Small-molecule compounds boost genome-editing efficiency of cytosine base editor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(15): 8974-86.
- [41] YANG Y, ZHANG C, SONG Y, et al. Small-molecule activators specific to adenine base editors through blocking the canonical TGF- β pathway [J]. *Nucleic Acids Res*. 2022, 50(17): 9632-46.
- [42] WANG L, XUE W, ZHANG H, et al. Eliminating base-editor-induced genome-wide and transcriptome-wide off-target mutations [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(5): 552-563.
- [43] WEI C T, POPP N A, PELEG O, et al. A chemically controlled Cas9 switch enables temporal modulation of diverse effectors [J]. *Nat Chem Biol*, 2023, doi: 10.1038/s41589-023-01278-6.
- [44] WERDER R B, KASERMAN J E, PACKER M S, et al. Adenine base editing reduces misfolded protein accumulation and toxicity in alpha-1 antitrypsin deficient patient iPSC-hepatocytes [J]. *Mol Ther*, 2021, 29(11): 3219-29.
- [45] NEWBY G A, YEN J S, WOODARD K J, et al. Base editing of hematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice [J]. *Nature*, 2021, 595(7866): 295-302.
- [46] SUH S, CHOI E H, LEINONEN H, et al. Restoration of visual function in adult mice with an inherited retinal disease via adenine base editing [J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(2): 169-78.
- [47] ZHANG W, AIDA T, DEL ROSARIO R C H, et al. Multiplex precise base editing in cynomolgus monkeys [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2325.
- [48] HUA K, TAO X, HAN P, et al. Genome engineering in rice using Cas9 variants that recognize NG PAM sequences [J]. *Mol Plant*, 2019, 12(7): 1003-14.
- [49] YAN F, KUANG Y, REN B, et al. Highly efficient A•T to G•C base editing by Cas9n-guided tRNA adenosine deaminase in rice [J]. *Mol Plant*, 2018, 11(4): 631-4.
- [50] CHEN P J, HUSSMANN J A, YAN J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes [J]. *Cell*, 2021, 184 (22): 5635-52.