

PRACA POGLĄDOWA/REVIEW PAPER

Techniki edycji genomu jako narzędzie modyfikacji komórek układu odpornościowego

Genome editing tools to modify immune cells

Ewelina Stoczyńska-Fidelus^{1,2,3}, Piotr Rieske^{2,3,4}

¹Zakład Biologii Molekularnej, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź, Polska

²Celther Polska Sp. z o.o., Laboratorium Naukowo-Badawcze, Konstancin Łódzki, Polska

³Personather Sp. z o.o., Konstancin Łódzki, Polska

⁴Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź, Polska

STRESZCZENIE

Techniki, takie jak TALEN, CRISPR-CAS9 oraz *prime editing* (PE), mogą znaleźć zastosowanie w edycji genomu różnych komórek. Niemniej genomy hematopoetycznych komórek macierzystych i komórek układu odpornościowego mogą być wkrótce edytowane częściej w celach terapeutycznych. Dzieje się tak ze względu na charakterystykę krwi i szpiku jako tkanki pozbawionej bardzo skomplikowanych struktur trójwymiarowych. Dodatkowo indukowane komórki pluripotencjalne (iPSc), uznawane za źródło komórek o potencjale terapeutycznym, nadal stanowią zagrożenie z powodu rozwijających się z nich potworników. Można również dodać, że edycja typu *knock out* jest łatwiejsza niż edycja zmieniająca gen zmutowany na prawidłowy. Z kolei komórki, takie jak CAR-T czy komórki zakażone wirusami, stanowią ważne cele dla systemów edycji genomu typu *knock out* w ramach terapii. Komórki układu odpornościowego wydają się również szczególnie odpowiednie jako wyjściowe do tworzenia zupełnie nowych typów komórek dzięki syntetycznej biologii, w której techniki edycji genomu odgrywają szczególną rolę. Wszystko to powoduje, że CRISPR-CAS9 oraz PE wzbudzają coraz większe zainteresowanie wśród immunologów. W artykule omówiono podstawy działania tych technik i wyjaśniono przyczyny ich niedoskonałości.

SŁOWA KLUCZOWE

TALEN, CRISPR-CAS9, *prime editing*, CAR-T.

ABSTRACT

Techniques such as TALEN, CRISPR-CAS9 or *prime editing* (PE) can be used to edit the genome of various cells. Nevertheless, the genomes of hematopoietic stem cells and cells of the immune system may soon be edited more frequently for therapeutic purposes. This is due to the characteristics of blood and marrow as a tissue devoid of very complicated three-dimensional structures. In addition, induced pluripotent cells (iPSc), which are considered a source of cells with therapeutic potential, continue to pose a threat due to the developing teratomas. Moreover, knock out editing is easier than editing that changes the mutant gene to the correct one. Whereas cells such as CAR-T or virus-infected cells represent high-value targets for knockout genome

editing systems in therapy. Immune system cells also seem to be particularly suitable as starting points for the creation of completely new cell types thanks to synthetic biology, in which genome editing techniques play an important role. All this makes CRISPR-CAS9 or PE more and more interesting for immunologists. The article discusses the basics of these techniques and explains the reasons for their imperfections.

KEY WORDS

TALEN, CRISPR-CAS9, prime editing, CAR-T.

ADRES DO KORESPONDENCJI

Piotr Rieske, Zakład Biologii Nowotworów, Katedra Biologii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź, Polska, e-mail: piotr.rieske@umed.lodz.pl

TECHNIKI EDYCJI GENOMU I ZAKRES ICH ZASTOSOWANIA

Edycja genomu polega na wprowadzeniu zmian w DNA komórek poprzez zmiany sekwencji w obrębie istniejących genów. Zmiany wprowadzane w celach terapeutycznych mają doprowadzić do usunięcia genetycznej przyczyny choroby. Możliwa jest również edycja genomu w celu zastosowania w terapii udoskonalonych dzięki niej komórek, takich jak CAR-T. Techniki edycji genomu pozwalają edytować fragmenty DNA, dzięki specjalnym białkom, molekułom sgRNA (*single guide RNA*), a niekiedy również donorowym DNA [1]. Technologie edycji genomu rozwijają się bardzo szybko. Zanim skończyły się badania kliniczne z zastosowaniem metody TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*) i ZFN (*Zinc-finger nucleases*), pojawiła się metoda CRISPR-CAS9 (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats, CAS9 CRISPR associated protein*) [2]. W ostatnich latach zaprezentowano również *prime editing* „edycja prime” (PE) i kilka innych metod edycji genomu [3]. Wspólnym mianownikiem tych technik jest wykorzystanie molekuł umożliwiających rozpoznanie konkretnego fragmentu genomu oraz wykorzystanie systemu naprawy uszkodzeń DNA po to, by wprowadzić zamierzoną zmianę w sekwencji DNA określonych komórek. W przypadku metod TALEN i ZFN za rozpoznanie odpowiedniego fragmentu DNA odpowiadają białka, przy czym w metodzie TALEN rozpoznanie jest wrażliwe na wyspy CpG [4]. W przypadku CRISPR-CAS9 za rozpoznanie konkretnego fragmentu DNA odpowiada RNA, a dokładnie molekuła określona jako sgRNA (*single guide RNA*). W uproszczeniu rola sgRNA jest podobna do tej, jaką odgrywa starter w trakcie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Oczywiście starter PCR to DNA, które nie ma takiego wspomaganie w trakcie PCR, jakie zapewnia molekuła sgRNA białko CAS9

w komórce. Również w przypadku techniki PE (*prime editing*) to RNA odpowiada za rozpoznanie miejsca, które ma ulec edycji. To właśnie zamiana białek na RNA jako molekuł umożliwiających rozpoznanie fragmentu DNA o odpowiedniej sekwencji zwiększyła skuteczność systemu edycji. Nie chodzi jednak tylko o specyficzność, czyli zmniejszenie liczby tzw. miejsc *off target* (miejsc w genomie innych niż zaplanowane do edycji). Metoda TALEN wykazuje specyficzność zbliżoną do CRISPR-CAS9, ale to CRISPR-CAS9 ma np. większą wydajność, umożliwia skrócenie czasu wymaganego na edycję lub też możliwość działania jednocześnie w kilku pozycjach w genomie. Mimo to technika TALEN pozostanie zapewne w użyciu. Nie ma tu jednak miejsca na omawianie wszystkich technik edycji genomu, nawet na tak podstawowym poziomie, jak omówiono w tym opracowaniu CRISPR-CAS9 czy PE. Wydaje się, że technika TALEN pozostanie w użyciu w konkretnych sytuacjach. Jest ona niezależna od obecności tzw. sekwencji PAM, a jej wrażliwość na tzw. wyspy CpG w DNA może być w niektórych sytuacjach traktowana jako zaleta. Więcej informacji o korzyściach ze stosowania techniki edycji TALEN można znaleźć w publikacji Bhardwaja i Naina [5].

Metody edycji genomu są ważną częścią biologii syntetycznej – dziedziny, w której rozważa się tworzenie komórek nawet bardziej zmodyfikowanych niż CAR-T. Mogą to być komórki o zupełnie nowych funkcjach, a komórki układu odpornościowego wydają się pierwszorzędnym podmiotem w przypadku takich działań. Syntetyczna biologia jest niekiedy trudna do odróżnienia od biotechnologii. Dziedzina ta traktuje komórkę oraz jej elementy, np. białka, w sposób podobny do tego, którego używa się przy opracowywaniu układów scalonych w elektronice. PE polega na działaniu dwóch chimer, każdej złożonej z trzech podjednostek. Trzy elementy białkowe tworzą jedną chimere (nikaza, odwrotna

transkryptaza, CAS9), a kolejne trzy elementy RNA tworzą drugą chimerę (crRNA, tracerRNA i RNA odgrywającego rolę DNA donorowego). W niektórych sytuacjach, takich jak tworzenie uniwersalnych CAR-T, potrzebne jest połączenie technologii indukowanych komórek pluripotencjalnych (iPSc) z edycją genomu. To pokazuje, jak bardzo rozbudowane stają się systemy do zastosowania w terapii, co wymusza pewną standaryzację i unifikację, która będzie bardzo trudna bez dziedziny, która to uporządkuje. Rolę takiej dziedziny może odegrać właśnie biologia syntetyczna [6].

Niestety metody edycji genomu prowadzą do powstania nie tylko komórek ze zmianami planowanymi, lecz także komórek z nieplanowanymi zmianami genomu (*off target*). Pojawianie się takich błędów w trakcie stosowania metod edycji genomu powoduje, że konieczne jest selekcjonowanie otrzymanych komórek – oddzielenie tych o cechach pożądanym od tych z błędami. Jest to możliwe w przypadku komórek, takich jak hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC) czy iPSc. Konieczność przeprowadzenia takiej selekcji jest jedną z przyczyn zakazu edycji genomu ludzkich komórek totipotencjalnych w celach terapeutycznych i dla badań stosowanych (nie w badaniach podstawowych) [7]. Nawet jeśli powyższy zakaz zostałby zniesiony, to nadal konieczne będzie stosowanie pochodnych iPSc lub limfocytów z edytowanym genomem w terapii osób urodzonych z dziedzicznymi chorobami genetycznymi lub osób z chorobami nowotworowymi. Idealnym przykładem są tu hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC), których zastosowanie, w przeciwieństwie do iPSc, nie niesie ryzyka powstania potworników. Jednak HSC trudniej hodować w warunkach *in vitro*. Metody ich hodowli są wciąż udoskonalane. Dodatkowo jeśli nawet dojdzie do selekcji komórek z niektórymi błędami powstałymi w trakcie edycji genomów komórek multipotencjalnych czy komórek dojrzałych, to wprowadzenie do organizmu subpopulacji takich komórek nie spowoduje tak negatywnych konsekwencji jak rozwój całego organizmu i być może jego potomstwa, których większość lub wszystkie komórki będzie miała błędy genetyczne. Wychwycenie wszystkich błędów jest w zasadzie niemożliwe. Wymaga zastosowania sekwencjonowania nowej generacji (NGS) całego genomu kolonii komórkowych po klonowaniu, aby wykryć komórki ze zmianami typu *off target* (miejsc nieplanowanych). Naturalnie zawsze trzeba brać pod uwagę ryzyko pojawiania się niezamierzonej edycji supresorów nowotworowych i onkogenów w przypadku edycji komórek pluri- czy multipotencjalnych [8]. Metody edycji genomu są ciągle poprawiane i pojawiają się ich kolejne odmiany, ale selekcja w inżynierii komórkowej jest zawsze obecna, chociażby po to, by oddzielić komórki, które przyjęły transgen(y), od tych, które tego nie zrobiły.

METODA CRISPR-CAS9

Metoda CRISPR-CAS9 wywodzi się z bakteryjnego systemu służącego eliminacji bakteriofagów [9]. Nadal najpopularniejszym enzymem jest CAS9, ale coraz częściej stosuje się inne enzymy z rodziny CAS [10]. Mimo to w artykule przyjęto dość tradycyjną konwencję nazywania tej techniki CRISPR-CAS9. Za odkrycie CRISPR-CAS9 i pokazanie, jak wykorzystać w edycji genomu eukariotycznego, przyznano w 2020 roku Nagrodę Nobla. Bakterie mogą integrować do swojego genomu fragmenty DNA bakteriofagów i wykorzystywać je, po przepisananiu na RNA, do rozpoznawania i degradacji DNA bakteriofaga, który zainfekował bakterię ponownie. W trawieniu DNA faga, poza crRNA i *tracer* RNA, uczestniczą enzymy CAS, najczęściej CAS9, kiedy jest to ponowna infekcja, a CAS1 i CAS2 w trakcie pierwszej infekcji. Odróżnienie własnego DNA bakteryjnego zawierającego fragmenty tożsame sekwencyjnie z genomem fagów, które zainfekowały komórkę bakteryjną ponownie, odbywa się dzięki sekwencji PAM (*protospacer adjacent motif*) – krótkiej 2–6-nukleotydowej sekwencji DNA [11]. PAM występuje w DNA faga, ale nie w DNA bakteryjnym. Sekwencja PAM przyspiesza proces poszukiwania DNA faga. Dopiero gdy CAS9 rozpozna PAM, sprawdza, czy crRNA pasuje do DNA faga. Nie tylko sekwencji PAM nie ma w obrębie sekwencji CRISPR w genomie bakteryjnym, ale za każdym fragmentem DNA z innego faga w obrębie genomu bakterii występuje sekwencja odmienna od PAM (najczęściej GTT; można ją określić jako anty-PAM). Zabezpieczenie to (wykorzystanie PAM i anty-PAM) jest konieczne z punktu widzenia skuteczności i specyficzności działania układu odpornościowego bakterii. Można to nazwać ochroną przed autoagresją systemu CRISPR. W przypadku stosowania niektórych typów edycji taki mechanizm może być kłopotliwy (opisano szczegółowo w ostatnim rozdziale artykułu).

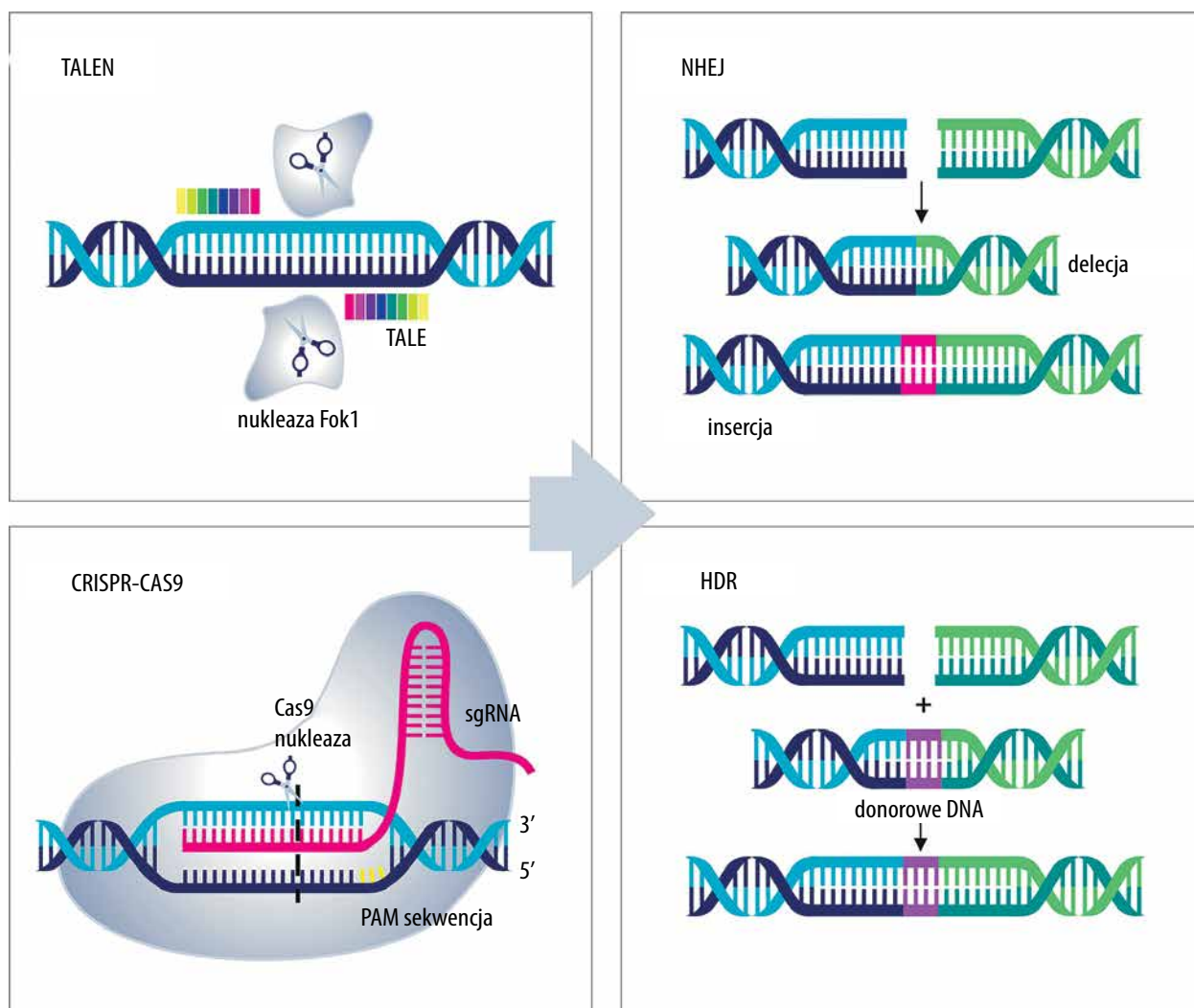
W przypadku edycji genomów komórek eukariotycznych zastosowane wzmiankowane powyżej sgRNA jest połączeniem mechanicznym (chimera molekuł) i funkcjonalnym crRNA i *tracer* RNA, wykorzystywanych do trawienia DNA faga. Dodatkowo w komórkach bakteryjnych systemy naprawy uszkodzeń DNA nie są tak rozwinięte jak w przypadku komórek eukariotycznych. Wprowadzenie do komórek eukariotycznych za pomocą np. wektora lentiwirusowego transgeny kodującego CAS9 razem z sgRNA prowadzi do przecięcia obu nici DNA w miejscu rozpoznanym przez sgRNA, a także jednocześnie – do uruchomienia systemu naprawy DNA z wykorzystaniem białek komórki gospodarza (*host cell*). Po dokonaniu dwuniciowego przecięcia DNA pojawiają się dwie możliwości naprawy: NHEJ (*non-homologous end joining*) i HDR (*homologous directed repair*) [12, 13].

W pierwszym przypadku dochodzi do dodania lub usunięcia kilku nukleotydów w miejscu przecięcia i następnie do zespolenia dwuniciowego DNA. W drugim przypadku system naprawy próbuje przywrócić dokładnie sekwencję sprzed uszkodzenia, jeśli nie ma ingerencji biotechnologicznej lub na drugim allelu nie występuje różnica w stosunku do sekwencji przeciętego fragmentu. Zdarza się również, że system HDR wprowadza przesunięcie ramki odczytu. Jest to uznawane za błąd w działaniu tego systemu, a wynika z bardzo skomplikowanej operacji, którą musi on przeprowadzić. System naprawy HDR wykorzystuje w tym celu DNA homologiczne (np. z drugiego chromosomu/allela/kopii genu) lub DNA donorowe [14]. Jeśli razem z transgenem dla CAS9 i sgRNA nie zostanie wprowadzony żaden DNA donorowy, to najczęściej zadziała system NHEJ, rzadziej HDR, wykorzystując DNA homologiczne z drugiego allela. Kiedy sgRNA rozpozna część genu, która ma być edytowana, i w trakcie naprawy NHEJ dojdzie do dodania lub usunięcia kilku nukleotydów, to zazwyczaj prowadzi to do przesunięcia ramki odczytu, a mRNA powstający z tak edytowanego genu nie będzie ulegał translacji dzięki włączeniu się systemu *nonsense mRNA decay*. Na marginesie warto uściślić, że w przypadku edycji genomu unika się określenia typu „edycja lub metoda CRISPR prowadzi do mutacji”, ponieważ mutacje ze swej natury są przypadkowe, a edycja indukowana celowo i precyzyjnie w zamysle. Historycznie próbowano używać w stosunku do edycji genomu oksymoronu ukierunkowana mutagenеза. Niemniej system NHEJ wprowadza w sekwencji zmiany, które nie mogą być przewidziane w każdym szczególe (insercje lub delecje, tzw. INDELS). Jeśli jednak rozważa się zmiany w miejscach, które nie miały zostać zmieniane, czyli tzw. *off target*, wtedy używa się częściej terminu mutacja. W omawianym scenariuszu (po uruchomieniu NHEJ) można mówić o tzw. *knock out* genu – wyłączeniu go z działania. Jeśli wprowadza się razem z transgenem CAS9 zarówno sgRNA, jak i tzw. DNA donorowe, to może się zdarzyć, że system HDR rozpozna DNA donorowe jako homologiczne (zamiast homologicznego z drugiego allela) i wykorzysta je do naprawy uszkodzonego DNA. W tym przypadku pojawia się możliwość zamiany w pewnym zakresie sekwencji, która występowała w komórce eukariotycznej przed użyciem CRISPR-CAS9 na nową sekwencję, ale umożliwiającą powstanie prawidłowego białka. Określa się to niekiedy mianem *knock in*, nawet jeśli nie polega na insercji, ale substytucji nukleotydu. Może to być zamiana fragmentu DNA z mutacją odpowiedzialną za chorobę na fragment prawidłowy. Od razu trzeba zaznaczyć, że ta zamiana nie zawsze dojdzie do skutku, pomimo wprowadzenia DNA donorowego. Czasem DNA donorowe jest „ignorowane” i nie włącza się system HDR, ale ciągle NHEJ i to ten system wpro-

wadza kolejną zmianę genu, który pierwotnie wykazywał mutację odpowiedzialną za występowanie choroby, np. była to zmiana sensu (*missense*), a po edycji pojawi się zmiana typu nonsens [15]. Jeśli mutacja leżąca u podstawy choroby jest heterozygotyczna (mutacja jednego allela) i polega na zamianie jednego nukleotydu w inny, to zdarza się, że sgRNA rozpoznające fragment DNA z sekwencją zmutowaną rozpoznaje niekiedy również DNA prawidłowe i prowadzi do rozpoczęcia jego edycji, która nie zawsze zakończy się przywróceniem pierwotnej prawidłowej sekwencji w tym allelu, ale dokonaniem zmiany na nieprawidłową albo nawet typu *nonsense* [16]. Warto w tym miejscu przypomnieć analogię między sgRNA a starterem (DNA) w PCR. Biotechnolodzy powoli eliminują te mankamenty techniki, ale daleko jeszcze do uniknięcia konieczności selekcji otrzymanych po edycji komórek. Można użyć przenośni, że komórka, w której zachodzi taka edycja, zamiast planowanej dzięki HDR i donorowemu DNA poprawy, wpada niejako z deszczu pod rynnę, po włączeniu się NHEJ. Tego typu wady metody CRISPR prowadzą do tego, że systemy edycji powodują dużo niezamierzonych zmian, pomimo wprowadzenia donorowego DNA [17–19]. Technika TALEN również korzysta z HDR oraz NHEJ i jest w związku z tym obciążona podobnymi mankamentami (ryc. 1).

Techniki edycji genomu, takie jak CRISPR-CAS9, mogą być też wykorzystywane do wycinania dużych fragmentów DNA, ale w tym przypadku konieczne jest zastosowanie dwóch sgRNA flankujących fragment, który ma zostać wycięty [20]. Możliwość edycji więcej niż jednego miejsca w genomie stanowi pewną przewagę w stosunku do metody TALEN, gdzie edycja jednocześnie kilku punktów jest trudniejsza. Może to być pomocne w trakcie usuwania większych fragmentów genów lub genów kodujących miRNA, ponieważ nie ma w tym przypadku możliwości przesunięcia ramki odczytu po włączeniu się NHEJ, jak ma to miejsce w genach kodujących białka. Również w tej sytuacji może dochodzić do wystąpienia zmian innych niż zaplanowane. Najprostszą przyczyną pojawienia się nieplanowanych zmian w tej sytuacji jest przyłączenie się tylko jednego z dwóch wprowadzonych sgRNA.

Metoda edycji CRISPR-Cas9 stanowi w niektórych aspektach postęp w stosunku do metod TALEN. Jej odkrycie stanowiło bez wątpienia przełom. Wymaga ona jednak ciągłych udoskonaleń albo zastąpienia nowszą techniką. Może się nią okazać *prime editing* (PE) albo raczej jej odmiana. Porównanie metod edycji genomu przedstawiono w tabeli 1. W tabeli porównano trzy główne techniki edycji genomu, niemniej opracowano ich więcej i występują już odmiany głównych technik. Technika TALEN jest bez wątpienia doskonalsza niż ZFN. W przypadku PE istnieją już wersje PE2, PE3 i PE4. W meto-



RYCINA 1. Graficzne porównanie metod TALEN i CRISPR-CAS9. W metodzie TALEN za rozpoznanie fragmentu DNA do edycji odpowiada białko, a przecięcia dwuniciowego dokonuje enzym FokI (moduły po prawej i lewej stronie FokI nazywa się TALEs). W metodzie CRISPR-CAS9 za rozpoznanie tego fragmentu DNA odpowiada sgRNA. CAS9 ma aktywność nukleazową i dokonuje przecięcia obu nici DNA. Niezależnie od tego, która metoda jest stosowana, po dokonaniu cięcia włącza się system naprawy DNA NHEJ lub HDR. W przypadku NHEJ możliwy jest *knock out* edytowanego genu, ponieważ NHEJ przed połączeniem pęknięcia wprowadza kilka dodatkowych nukleotydów albo kilka usuwa, co zazwyczaj prowadzi do przesunięcia ramki odczytu i braku białka kodowanego przez gen z powodu zadziałania mechanizmu *nonsense mRNA decay*. Jeśli włączy się HDR, to możliwa jest naprawa bez przesunięcia ramki odczytu na podstawie DNA homologicznego. Gdy w przypadku HDR zostanie wykorzystany DNA donorowy, to możliwa jest np. zmiana sekwencji z mutacją na sekwencję prawidłową, zgodną z tą występującą w DNA donorowym

dzie CRISPR wykorzystuje się niekiedy inne enzymy niż CAS-9.

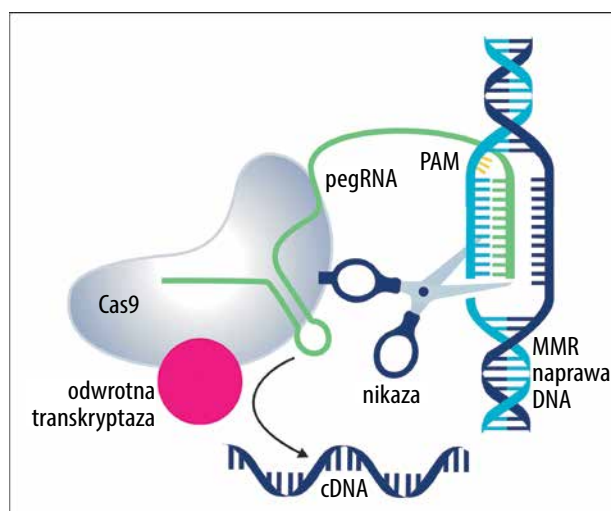
METODA PRIME EDITING

Prime editing (PE) wykorzystuje: mRNA (tutaj pegRNA), CAS9, nikazę i odwrotną transkryptazę, a w zasadzie domeny tych trzech enzymów połączonych w jedno wielofunkcyjne białko chimerowe [21]. Wprowadza się więc transgen kodujący takie wielofunkcyjne białko oraz mRNA, najczęściej za pomocą lentiwirusów. Wykorzystywane tu mRNA składa się z dwóch części. Jedna

z nich działa podobnie jak sgRNA w systemie CRISPR-CAS9 i rozpoznaje konkretne miejsce w genomie. Druga część RNA odgrywa rolę analogiczną do DNA donorowego w metodzie CRISPR-CAS9 (tu używa się skrótu pegRNA). CAS wraz z pegRNA naprowadza białko chimerowe na wybrane miejsce w genomie. Domena nikazy przecina jedną nić DNA. Odwrotna transkryptaza przepisuje dostarczone RNA na cDNA i w ścisłym sąsiedztwie działania nikazy powstaje odpowiednik DNA donorowego z metody CRISPR-CAS9. Po przecięciu DNA włącza się system jego naprawy (ryc. 2). Różnica między przecięciem jednoniciowym (*single strand break* – SSB) a dwu-

TABELA 1. Porównanie głównych technik edycji genomu

Metoda	Molekuła wykrywająca miejsce docelowe w genomie	Wybór miejsca edycji	Koszt i czas edycji	Naprawa DNA	Obecność PAM wymagana	Najczęstsze błędy metody	Możliwość edycji wielu miejsc
TALEN ZFN	białko	ograniczony ZFN, TALEN wrażliwy na wyspy CpG	wysoki 5–15 dni	HDR, NHEJ (DSB)	nie	INDELS, <i>off targets</i>	utrudniona
CRISPR-CAS9	RNA	nieograniczony	niski 2–3 dni	HDR, NHEJ (DSB)	tak	INDELS, <i>off targets</i>	tak
PE	RNA	nieograniczony	niski 2–3 dni	MMR? (SSB)	tak	minimum INDELS, <i>off targets</i> , wprowadzenie fragmentu DNA z sekwencją sprzed edycji	tak



RYCINA 2. Edycja genomu metodą PE (*prime editing*). Zrozumienie mechanizmu działania tej metody jest łatwiejsze, jeśli czytelnik zna metodę CRISPR-CAS9. Białko chimerowe umożliwiające edycję składa się z 3 podjednostek: 1) fragmentu CAS9, który pozwala części pegRNA przypominającej sgRNA rozpoznać miejsca, które ma być edytowane, 2) domeny nikaży, która przecina jedną nić DNA w miejscu, w którym działa część pegRNA przypominająca sgRNA z metody CRISPR-CAS9, oraz 3) podjednostki z domeną katalityczną odwrotnej transkryptazy (OT), która przepisuje fragment pegRNA na cDNA. OT działa na fragment pegRNA, odpowiadające któremu cDNA przypomina w metodzie CRISPR-CAS9 DNA donorowe. cDNA zawiera sekwencję prawidłową i jest wykorzystywane najpewniej przez system naprawy DNA typu MMR do naprawy jednoniciowego pęknięcia i prowadzi do zmiany sekwencji pierwotnej, zmutowanej na nową prawidłową. Schemat zmodyfikowano na podstawie <https://www.news-medical.net/news/20191022/New-CRISPR-genome-prime-editing-system.aspx> [33]

niciowym DNA (*double strand break* – DSB) jest bardzo istotna [22]. Po przecięciu jednej nici nie można dokonać kolejnej zmiany typu nonsens w związku z działaniem systemu NHEJ, jeśli taka zmiana nie jest oczekiwana. Obecnie trwają prace nad wyjaśnieniem, jakie dokładnie systemy naprawy DNA włączają się po zastosowaniu metody PE. Do niedawna wydawało się, że to naprawa błędnie sparowanych zasad (*mismatch repair* – MMR) w prosty sposób odgrywa kluczową rolę. Obecnie wydaje się jednak, że wymaga to bardziej pogłębionej analizy [23]. Aktualnie wprowadzane są kolejne metody, z różnymi – mniej lub bardziej subtelnymi – udoskonaleniami, opisywane jako PE3, PE4, itd. Warto także zauważyć, że opracowanie technik edycji genomu przyczyniło się do rozwoju badań nad systemami naprawy uszkodzeń DNA, a ośrodki zajmujące się tymi systemami opracowują składowe nowych metod edycji genomu.

W typowym działaniu PE istnieje 50% szans, że system naprawy DNA wykorzysta cDNA powstały dzięki działaniu odwrotnej transkryptazy, zawierający sekwencję prowadzącą do zaplanowanej przez badacza zmiany typu *missense* czy *nonsense*, a także 50% szans, że system naprawy wykorzysta DNA jednoniciowe komórki gospodarza, które nie zostało przecięte nikażą. W ten sposób można sprawniej niż za pomocą CRISPR edytować genom, dokonując zmiany typu *missense*. System ten jednak również zależy od sekwencji PAM [24]. Jak wynika z powyższych opisów, obecnie stosowane metody edycji genomu o wiele trudniej zastosować, jeśli mutacja odpowiedzialna za chorobę polega na rozległej delecji. Przyjmuje się, że maksymalna wielkość możliwej insercji, jaką można wykonać, stosując obecne metody edycji genomu,

to około 100 pz [25]. Metod edycji genomu przybywa, ale jak do tej pory, kiedy opierają się one na RNA, w zasadzie niemożliwe jest uniknięcie obecności sekwencji PAM, co zawsze zwiększa prawdopodobieństwo błędów w czasie edycji typu zmiany sensu (*missense*). Zastosowanie technologii ZFN, pomimo niezależności od PAM, prowadziło do większej liczby błędów niż CRISPR-CAS9 czy PE. Jeśli połączyć PE z technologią reprogramowania (iPSc), to około 50-procentowa poprawność zmian będzie w zupełności wystarczająca [26]. Można bowiem wyselekcjonować odpowiednio edytowane komórki iPSc. Jeśli PE miałyby być wykorzystane w celach terapeutycznych na poziomie komórek totipotencjalnych człowieka *ex vivo* (prawo na to nie zezwala w celach terapeutycznych), to 50% zmian zaplanowanych byłoby nadal dużym problemem, bo wymuszałyby odrzucanie 50% zarodków. Niemniej jest to oczywiście progres w stosunku do CRISPR-CAS9 z donorowym DNA, gdzie nadal za część napraw DNA odpowiada NHEJ, pomimo wprowadzenia donorowego DNA. Nawet najdoskonalsze obecnie metody edycji genomu nie wykluczają najbardziej podstawowego typu selekcji, czyli selekcji antybiotykowej, prowadzonej po to, by oddzielić komórki, które uległy transdukcji lub infekcji, od tych, które jej nie uległy. We wszystkich tych systemach korzysta się z wektorów wirusowych. Edycja *in vivo* natrafia na podobne problemy, jakie napotykała terapia genowa *in vivo*. Obecnie metod edycji jest więcej. Istnieją nawet próby połączenia np. TALEN z technologią CRISPR-CAS9 czy PE. Podsumowując – techniki edycji genomu nie są doskonałe, a ich stosowanie prowadzi do otrzymania heterogennej populacji edytowanych komórek (mozaikowość). Spośród tej populacji konieczne jest wyselekcjonowanie komórek o zaprojektowanym w badaniach genomie. Selekcja taka jest akceptowalna w przypadku komórek iPSc i multipotencjalnych.

SEKWENCJA PAM I JEJ ZNACZENIE

Wymienione powyżej zostały najważniejsze przyczyny błędów w trakcie stosowania technik edycji genomu. Warto ponadto zwrócić uwagę, że obok sekwencji specyficznej dla sgRNA czy pegRNA we fragmencie bliskim edytowanego odcinka DNA musi występować sekwencja PAM, aby CAS9 mógł zadziałać [11]. Utrudnia to dodatkowo edycje polegające na zmianie dowolnej sekwencji zmutowanej na prawidłową, ponieważ nie zawsze sekwencja PAM występuje w sąsiedztwie miejsca, które ma ulec edycji typu zmiany sensu (*missense*). Jak wskazano powyżej, obecność sekwencji PAM ma fundamentalne znaczenie dla uniknięcia autotrawienia DNA bakteryjnego zamiast DNA faga, co powoduje, że pozbycie się jej jest bardzo trudne w systemach edycji opartych na CAS [27]. Na szczęście jest wiele sekwencji PAM i po-

dejmuje się również działania zmierzające do stosowania rekombinowanych enzymów CAS, odpowiednio modyfikowanych konformacyjnie tak, aby odpowiednia dla nich sekwencja PAM występowała w sąsiedztwie miejsca edytowanego. W tym przypadku to biotechnolodzy decydują o tym, co jest sekwencją PAM, ale nie potrafią jej wyeliminować, nie pozbawiając jednocześnie CAS9 możliwości efektywnego działania. Wysiłki w tym kierunku jednak nie ustają [28, 29]. Jak wskazano wcześniej, fragment z sekwencją PAM rozpoznawany jest przez CAS9, zanim zacznie on dopasowywanie crRNA i tracrRNA przed trawieniem DNA faga, a sgRNA przed edycją genomu [30]. Generalnie wprowadzenie zmian typu *knock out* jest łatwiejsze niż *knock in*. W pierwszym przypadku wystarczy znaleźć sekwencję PAM w dowolnym fragmencie genu bliskim kodonu START edytowanego genu. Im bliżej kodonu START zostanie wprowadzona zmiana, tym łatwiej uruchomić rozkład nonsensownego mRNA (*nonsense mRNA decay*), ponieważ system ten opiera się na rozpoznawaniu tego, że kodon STOP jest zbyt odległy od ogona poliA mRNA [31]. PAM rzutuje bardziej na specyficzność w przypadku prób dokonania zmian sensu (*missense*). Obojętnie jednak, czy zmiana ma być *missense* czy nonsens, to może jej ulegać kilka genów, a nie tylko gen wybrany w celu terapii [8]. Prowadzi to, poza heterozygotycznym *knock out* niezamierzonych genów, do pojawienia się złożonych zaburzeń translacji białek [32]. Zamierzone stosowanie systemu NHEJ (brak DNA donorowego w wektorze) ma po pierwsze znaczenie naukowe do badania konsekwencji *knock out* różnych genów. Jest również istotne podczas modyfikacji komórek CAR-T. Ponadto proponuje się niekiedy wykorzystanie metod edycji genomu w chorobach genetycznych warunkowanych mutacjami dominującymi, kiedy heterozygotyczna mutacja powoduje nabycie nowej funkcji (*gain of function* – GOF). Propozycja sprowadza się w tym przypadku do usunięcia funkcjonalnego allele, ale tego z mutacją typu GOF. Trzeba jednak mieć na uwadze, że w takich przypadkach może dojść do *knock out* nie tylko allele zmutowanego, lecz także prawidłowego, a niekiedy w części komórek tylko prawidłowego, co znowu wymusza trudną selekcję odpowiedniej subpopulacji. Widać więc, że PE chociaż jest techniką bardzo zaawansowaną, to może być stosowana tylko pod odpowiednią kontrolą i nadal wymusza selekcję komórek po edycji.

PODSUMOWANIE

Metody edycji genomu są szczególnie ważne w przypadku komórek układu odpornościowego i hematopoetycznych komórek macierzystych. Pomimo starań biotechnologów metody te są nadal niedoskonałe. Największe znaczenie dla terapii ma edycja służąca nie tyle eliminacji funk-

cjonalnej genów, co prowadząca do zmiany fragmentu DNA z sekwencją zmutowaną na fragment z sekwencją prawidłową. Skutkuje to niestety w przypadku CRISPR-CAS9 wprowadzeniem wielu zmian innych niż planowane, w tym nawet zmiany nonsensownej zamiast zmian terapeutycznych. Niemniej biotechnolodzy nie ustają w wysiłkach, aby poprawiać te metody. Już obecnie dzięki zastosowaniu edycji genomu i następczej selekcji edytowanych komórek (oddzieleniu tych z zamierzonymi zmianami DNA od tych z błędami) możliwe jest ich zastosowanie w terapii.

PODZIĘKOWANIA

Publikacja finansowana ze środków Agencji Badań Medycznych w ramach projektu Polish Chimeric Antigen Receptor T-cell Network, numer 2020/ABM/04/00002.

Podziękowania dla byRieske za pomoc w przygotowaniu rycin.

KONFLIKT INTERESÓW

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

PIŚMIENNICTWO

- Ernst M, Broeders M, Herrero-Hernandez P, et al. Ready for repair? Gene editing enters the clinic for the treatment of human disease. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020; 18: 532-57.
- Li H, Yang Y, Hong W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5: 1.
- Scholefield J, Harrison PT. Prime editing – an update on the field. *Gene Ther* 2021; 28: 396-401.
- Valton J, Dupuy A, Daboussi F, et al. Overcoming transcription activator-like effector (TALE) DNA binding domain sensitivity to cytosine methylation. *J Biol Chem* 2012; 287: 38427-32.
- Bhardwaj A, Nain V. TALENs-an indispensable tool in the era of CRISPR: a mini review. *J Genet Eng Biotechnol* 2021; 19: 125.
- Wu CY, Rupp LJ, Roybal KT, et al. Synthetic biology approaches to engineer T cells. *Curr Opin Immunol* 2015; 35: 123-30.
- European Group on Ethics in Science and New Technologies. Ethics of Genome Editing. European Commission, Luxembourg 2021.
- Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells* 2020; 9: 1608.
- Wiedenheft B, Lander GC, Zhou K. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature* 2011; 477: 486-9.
- Yang L, Chen J. A Tale of two moieties: rapidly evolving CRISPR/Cas-based genome editing. *Trends Biochem Sci* 2020; 45: 874-88.
- Karvelis T, Gasiunas G, Young J. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol* 2015; 16: 253.
- Torgovnick A, Schumacher B. DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Front Genet* 2015; 6: 157.
- Xue C, Greene EC. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends Genet* 2021; 37: 639-56.
- Miyaoka Y, Mayerl SJ, Chan AH, et al. Detection and quantification of HDR and NHEJ induced by genome editing at endogenous gene loci using droplet digital PCR. *Methods Mol Biol* 2018; 1768: 349-62.
- Tang L, Zeng Y, Du H, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Mol Genet Genomics* 2017; 292: 525-33.
- Alanis-Lobato G, Zohren J, McCarthy A, et al. Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118: e2004832117.
- Skryabin BV, Kummerfeld DM, Gubar L, et al. Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events. *Sci Adv* 2020; 6: eaax2941.
- Modarai SR, Kanda S, Bloh K, et al. Precise and error-prone CRISPR-directed gene editing activity in human CD34+ cells varies widely among patient samples. *Gene Ther* 2021; 28: 105-13.
- Prat F, Toutain J, Boutin J, et al. Mutation-specific guide RNA for compound heterozygous porphyria on-target scarless correction by CRISPR/Cas9 in stem cells. *Stem Cell Rep* 2020; 15: 677-93.
- Song Y, Lai L, Li Z. Large-scale genomic deletions mediated by CRISPR/Cas9 system. *Oncotarget* 2017; 8: 5647.
- Scholefield J, Harrison PT. Prime editing – an update on the field. *Gene Ther* 2021; 28: 396-401.
- Vitor AC, Huertas P, Legube G, et al. Studying DNA double-strand break repair: an ever-growing toolbox. *Front Mol Biosci* 2020; 7: 24.
- Chen PJ, Hussmann J, Han J, et al. Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell* 2021; 184: 5635-52.e29.
- Kweon J, Yoon JK, Jang AH, et al. Engineered prime editors with PAM flexibility. *Mol Ther* 2021; 29: 2001-7.
- Banan M. Recent advances in CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in mammalian cells. *J Biotechnol* 2020; 308: 1-9.
- Sürün D, Schneider A, Mircetic J, et al. Efficient generation and correction of mutations in human iPS cells utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors. *Genes* 2020; 11: 511.
- Leenay RT, Beisel CL. Deciphering, communicating, and engineering the CRISPR PAM. *J Mol Biol* 2017; 429: 177-91.
- Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 2015; 523: 481-5.
- Collias D, Beisel CL. CRISPR technologies and the search for the PAM-free nuclease. *Nat Commun* 2021; 12: 555.
- Horvath P, Romero DA, Couité-Monvoisin AC, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 2008; 190: 1401-12.
- Kurosaki T, Maquat LY. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 2016; 129: 461-7.
- Tuladhar R, Yeu Y, Piazza JT, et al. CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat Commun* 2019; 10: 4056.
- <https://www.news-medical.net/news/20191022/New-CRISPR-genome-prime-editing-system.aspx>