

碱基编辑系统在遗传性疾病治疗中的应用

陈 缘[#], 陈宇轩[#], 平 渊^{*}

(浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

摘要: CRISPR/Cas 系统是现阶段应用最广泛的基因组编辑工具, 但由于其激活同源重组进行 DNA 修复的效率低且存在脱靶效应, 严重限制了该工具在基因治疗方面的应用。碱基编辑是一种基于 CRISPR/Cas 系统的基因编辑新策略, 其工作原理是利用其结合的碱基脱氨酶精确编辑目标 DNA 或 RNA 上一小段窗口内的核苷酸。碱基编辑系统包括胞嘧啶碱基编辑系统 (CBEs) 和腺嘌呤碱基编辑系统 (ABEs), 可以分别实现碱基对 C·G 到 T·A 和 A·T 到 G·C 的转换。碱基编辑系统作用过程中不依赖于 DNA 双链断裂的发生, 无需引入供体 DNA, 并因其高效性及特异性已被广泛应用于遗传性疾病治疗的研究中。本文综述了近年来碱基编辑系统的发展历程和在遗传性疾病治疗中的潜力, 并对其作为基因治疗药物的发展前景进行了展望。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因编辑; 基因治疗; 碱基编辑; 遗传性疾病

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)07-1562-11

Application of base editors in the treatment of genetic disorders

CHEN Yuan[#], CHEN Yu-xuan[#], PING Yuan^{*}

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: To date, CRISPR/Cas systems represent the most widely used tool for genome editing; however, its application scope for gene therapy has been largely limited due to its limited efficiency in activating homology-directed repair for DNA and off-target effect. Base editing is a new CRISPR/Cas-based genome-editing strategy, which allows single nucleotide to be precisely corrected in a narrow window scope on the target DNA or RNA by taking advantage of different nucleobase deaminases. Base editors include cytosine base editors (CBEs) and adenine base editors (ABEs), which can induce the conversions from C·G to T·A and A·T to G·C, respectively. Base editors work independently of double-strand DNA breaks (DSBs) and DNA donor templates, and thus they are extensively adopted for a wide range of therapeutic applications for genetic diseases, largely owing to their high efficiency and great specificity. In this review, we summarize the development of base editors and their potentials as therapeutic drugs for treating genetic diseases, and future outlooks are also discussed.

Key words: CRISPR/Cas9; gene editing; gene therapy; base editor; genetic disorder

基于成簇规律间隔短回文重复序列及其关联蛋白 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas] 基因编辑技术, 因其广阔的应用前景备受人们

关注。相较于前两代基因编辑工具: 锌指核酸酶 (zinc finger nucleases, ZFNs) 和转录激活样效应因子核酸酶 (transcription activator-like effector nucleases, TALENs), CRISPR/Cas 系统因其构建简单、使用方便、价格低廉和构建时间较短等优点而被广泛使用。来自化脓性链球菌的 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9) 及来自金葡球菌的 Cas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9, SaCas9) 是 CRISPR/Cas 系统中目前常用的两种核酸内切酶^[1,2]。在单向导 RNA (single-guide RNA,

收稿日期: 2020-06-09; 修回日期: 2020-06-25.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81872807).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-571-88208606, Fax: 86-571-88208417,

E-mail: pingy@zju.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0942

sgRNA) 靶向基因组序列的作用下, Cas9 通过原间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM) 识别并在特定位点造成 DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB)^[1]。该断裂通常由两种方式进行修复: 一种是非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 介导的修复方式。在修复过程中, 该方式可通过引入插入和缺失突变 (insertion and deletion, indels) 或因 DNA 重组而造成靶基因失活; 另一种是同源重组修复 (homology-directed repair, HDR) 方式。当该过程被激活后, 目标位点的基因组 DNA 序列可以被外源供体 DNA 序列替代, 从而通过精确编辑而实现遗传突变的纠正。虽然通过 HDR 可对靶基因位点进行精准校正, 但此方法很大程度上受限于细胞分裂的 G2 和 S 期。此外, NHEJ 和 HDR 之间会竞争性修复 DSB, 且在多数情况下 NHEJ 比 HDR 效率更高, 因而通过 CRISPR/Cas9 基因编辑后通常都会产生 indels^[3-5]。然而, 对于大多数已知的遗传病治疗, 其最终目标是纠正目标位点的突变, 而不是基因的随机破坏^[6], 因而 CRISPR/Cas9 基因编辑技术很难实现遗传病的精准治疗。

碱基编辑器 (base editors, BEs) 是一种基于 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑工具。该编辑系统主要包括 4 种元件: 可结合靶 DNA 的无切割活性 Cas9 突变体 dCas9 [Cas9 (D10A, H840A)] 或只有切割一条链活性作用的 nCas9 [Cas9 nickase (D10A)], 催化碱基产生脱氨作用的碱基修饰酶、引导 Cas9 和脱氨酶复合物结合靶 DNA 位点的 sgRNA 和仅在胞嘧啶碱基编辑系统 (cytosine base editors, CBEs) 中应用以破坏尿嘧啶碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径的尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (uracil glycosylase inhibitor, UGI) (图 1)。当与其同源 DNA 结合时, dCas9 对 DNA 双链进行局部变性并介导 R 环形成, 其中未与 sgRNA 配对的 DNA 链以

无序的单链形式存在, 使得活性窗口内的靶碱基会在碱基脱氨酶的作用下发生特异、高效的脱氨反应, 从而实现单个碱基的精确替换^[7]。

碱基编辑系统在编辑 DNA 过程中不依赖于 DSBs 的发生, 无需引入 DNA 供体模板, 极大地提高了基因组编辑的精确性和灵活性(表 1)^[4]。该系统不仅可作用于双链 DNA, 也可对单链 RNA 进行碱基编辑。碱基编辑系统有着十分巨大的应用潜力, 可对某些由基因突变引发的遗传性疾病进行基因矫正治疗。因此, 碱基编辑系统作为一种生物大分子药物, 在未来临床基因治疗中将发挥不可估量的重要作用。

Table 1 Comparison of base editing system and homology directed repair. DSB: Double-strand DNA break; Indels: Insertion and deletion

Item	Base editing system	Homology directed repair
DSB	Unnecessary	Necessary
Donor DNA	Unnecessary	Necessary
Cell cycle	Unrestricted	Restricted to G2 and S phases of the cell cycle
Indels	Lower	Higher
Editing efficiency <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Higher	Lower

1 DNA 碱基编辑系统

目前报道的 DNA 碱基编辑系统分为两类: CBEs, 其功能是将 C (胞嘧啶)-G (鸟嘌呤) 碱基对转换为 T (胸腺嘧啶)-A (腺嘌呤) 碱基对; 腺嘌呤碱基编辑系统 (adenine base editors, ABEs), 其功能是将 A·T 碱基对转换为 G·C 碱基对。合理运用两种碱基编辑系统就可以根据需要产生 4 种突变, 即由 C 到 T、由 A 到 G、由 T 到 C 和由 G 到 A (后两种通过在其互补链的碱基编辑而产生最终修饰作用)。

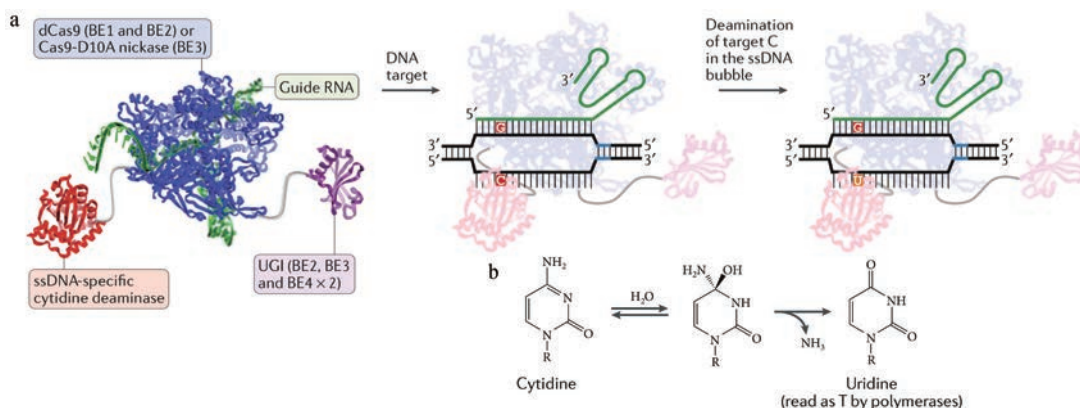


Figure 1 Working mechanisms of cytosine base editors (BE1, BE2, BE3 or BE4). a: Chemical reaction of cytosine (C) to thymidine (T) conversion. C deamination generates uridine (U), which base pairs as T. R represents 2'-deoxyribose in DNA; b: Schematic illustration of working mechanisms of cytosine base editors. Adapted from Ref. 4 with permission. Copyright © 2018 Springer Nature

1.1 胞嘧啶碱基编辑系统的发展

美国哈佛大学 David Liu 实验室^[6]首先将来自大鼠的胞嘧啶核苷脱氨酶 APOBEC1 与失去催化活性的 Cas9 (dCas9) 融合, 制备了第一代碱基编辑系统 (base editor 1, BE1)。在 gRNA 引导定位下, 当结合目标 DNA 位点时, 靶点的 C 核苷在 APOBEC1 作用下水解脱氨转变为尿嘧啶 (U) 核苷, 并在 DNA 复制和修复过程转换为 T 核苷, 最终实现 C·G 碱基对转换为 T·A 碱基对的编辑过程。尽管 BE1 在体外表现出良好的由 C 到 T 的碱基定向编辑作用, 但在人类细胞中效果并不理想。经研究发现, 这主要是由于尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (uracil DNA glycosylase, UNG) 催化的 BER 作用, 使 U·G 错配返回到了 C·G 配对。为了改善这种情况, 该课题组应用来自枯草杆菌噬菌体的 UGI, 将其融合到 BE1 的 C 末端制成了第二代碱基编辑系统 (BE2), 该系统可明显提高在人类细胞中的碱基转换效率。随后, 借助对胞内碱基错配修复 (base mismatch repair, MMR) 机制的研究, 他们又设计了第三代碱基编辑系统 (BE3)。BE3 中用 dCas9 nickase [Cas9n (D10A)] 代替 dCas9, APOBEC1-Cas9 nickase-UGI 融合物可在未发生编辑的 DNA 单链引入一个缺口, 激活胞内的 MMR 作用, 使得 DNA 倾向于以已发生编辑的 DNA 单链作为模板进行修复, 大大提升了 BE3 在哺乳动物细胞内碱基编辑的效率。

日本神户大学 Akihiko Kondo 实验室^[8]使用来自七鳃鳗的胞嘧啶脱氨酶 (petromyzon marinus cytidine deaminase 1, PmCDA1) 替代 APOBEC1 与 Cas9 nickase 融合, 设计了一种在酵母和哺乳动物细胞中均有效的 CSEs——“Target-AID” (target activation-induced cytidine deaminase)。该系统具有较窄的活性窗口和较低的细胞毒性。Hess 等^[9]开发的“CRISPR-X”系统利用催化灭活的 dCas9 和 MS2 修饰的 sgRNAs 招募胞嘧啶脱氨酶变异体, 实现了对内源性靶标的特异性诱变。常兴课题组^[10]基于诱导激活的胞嘧啶脱氨酶 (activation-induced cytidine deaminase, AID) 开发了“TAM” (targeted AID-mediated mutagenesis) 系统, 该系统可实

现将 C 或 G 转换为其他 3 种碱基, 在特定位点产生大量变异, 用于耐药突变的筛选。

以 BE3 结构为基础, Komor 等^[11]通过调整 APOBEC1 和 Cas9n (D10A) 之间连接区、Cas9n (D10A) 与 UGI 之间连接区的长度, 并增加 UGI 数量至 2 个后, 获得了第四代碱基编辑系统 (BE4)。与 BE3 相比, BE4 实现了将 C·G 碱基对更高效地转换为 T·A 碱基对, 提升了目标编辑产物纯度, 同时降低了 indels 的频率。为了避免 DSBs 诱导产生的插入/缺失等突变破坏基因的功能, 他们还在 BE4 的氨基端融入来自噬菌体 Mu 的 Gam 蛋白 (BE4-Gam), Gam 蛋白可结合在 DSB 末端, 保护基因功能不被破坏, 大大降低了 indels 频率。CBEs 的发展如表 2 所示。

1.2 腺嘌呤碱基编辑系统的发展

与 CBEs 类似, ABEs 的原理是利用合适的腺嘌呤脱氨酶将靶点 A 核苷脱去氨基转换为肌苷 (I), 再经 DNA 复制和修复过程转换为 G 核苷, 最终将碱基对 A·T 转换为 G·C (图 2)。

Gudelli 等^[12]利用来自大肠杆菌 tRNA 的腺苷脱氨酶 TadA, 并对 TadA 先后进行了 7 轮体外改造后, 得到编辑效率高且脱靶效率低的突变体 TadA*, 并将其与 BE3 中使用的同种核酸酶变异体 Cas9n (D10A) 融合 (TadA*-nCas9)。同时, 他们发现将野生型 TadA 和突变体 TadA* 融合成异二聚体后再结合 Cas9 nickase (TadA-TadA*-Cas9 nickase) 可大大提高该编辑系统在哺乳动物细胞中对腺嘌呤碱基的编辑效率。综合以上研究结果得到的 ABE7.10 是目前发现的编辑效率较高的一类 ABEs, 有较高的靶序列相容性, 可在原间隔基的位点 4~7 窗口内执行由 A·T 到 C·G 的替换。此外, 研究表明 ABEs 不需要抑制烷基腺嘌呤 DNA 糖基化酶的活性, 也能保证高精度、高纯度的碱基编辑, 这一点与 CBEs 不同^[13]。

最近, Richter 等^[14]通过利用噬菌体辅助的连续和非连续进化改进了 ABE7.10 的脱氨酶组分, 得到了 ABE8e。ABE8e 含有 8 个额外的突变, 与 ABE7.10 相比其活性增加了 590 倍。ABE8e 扩展了腺嘌呤编辑系统的碱基编辑

Table 2 Cytosine base editors with various characteristics. PAM: Protospacer adjacent motif; BE: Base editor; Target-AID: Target activation-induced cytidine deaminase; TAM: Targeted AID-mediated mutagenesis

Cytosine base editor	Base editor architecture	Editing window	PAM	Reference
BE1	rAPOBEC1-Sp dCas9	4 - 8	NGG	[6]
BE2	rAPOBEC1-Sp dCas9-UGI	4 - 8	NGG	[6]
BE3	rAPOBEC1-Sp nCas9 (D10A)-UGI	4 - 8	NGG	[6]
Target-AID	Sp nCas9 (D10A)-PmCDA1-UGI	2 - 8	NGG	[8]
CRISPR-X	Sp dCas9; MS2-hAIDΔ	-50 - 50	NGG	[9]
TAM	Sp dCas9-hAID*-P182X	4 - 10	NGG	[10]
BE4	rAPOBEC1-Sp nCas9 (D10A)-UGI-UGI	4 - 8	NGG	[11]
BE4-Gam	Gam-rAPOBEC1-Sp nCas9 (D10A)-UGI-UGI	4 - 8	NGG	[11]

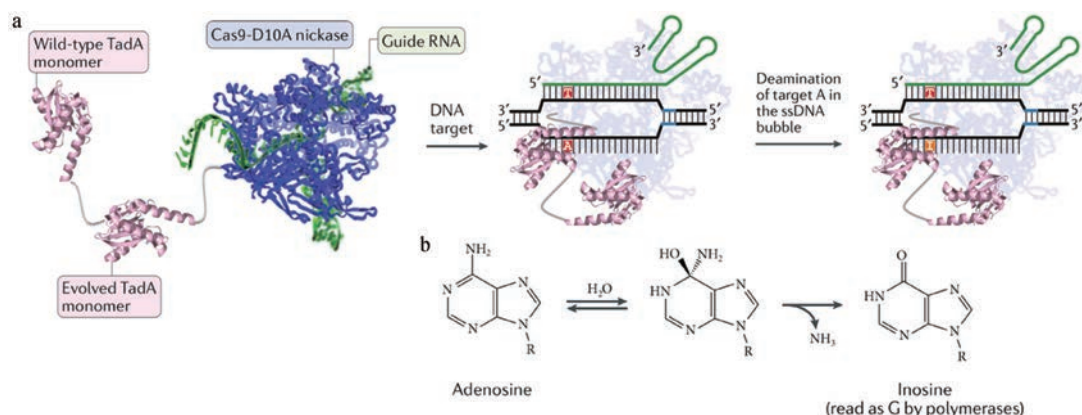


Figure 2 Working mechanisms of adenine base editors. a: Chemical reaction of adenine (A) to guanine (G) conversion. R stands for 2'-deoxyribose in DNA or ribose in RNA; b: Schematic illustration of working mechanisms of adenine base editors. Adapted from Ref. 4 with permission. Copyright © 2018 Springer Nature

范围, 显著提升了编辑效率, 极大地提高了 ABEs 的适用性。

2 RNA 碱基编辑系统

RNA 碱基编辑系统可分为两种: 由反义 RNA 介导的 RNA 碱基编辑系统和由 Cas13 介导的 RNA 碱基编辑系统。这两种系统均需来自 ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) 家族的 RNA 腺苷脱氨酶参与, 其氨基端的 RNA 结合结构域能够帮助该酶识别定位到双链 RNA 的特定区域, 其羧基端的脱氨基酶结构域则可将 RNA 双链结构中 A 核苷转化为 I, 而 I 在后续的剪接和翻译过程中被误读为 G 核苷, 从而纠正由 G 到 A 的突变^[4,15]。

2.1 反义 RNA 介导的 RNA 碱基编辑系统

ADAR 脱氨酶变异体通过与目标转录本同源但不同长度的反义 RNA 定位于目标 RNA 转录本。目前反义 RNA 介导脱氨酶与目标 RNA 融合的碱基编辑系统有以下 3 种形式^[4]: ① 将 SNAP 标签 (改造的 *O*⁶-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶, 具有与 5'-*O*-苄基鸟嘌呤修饰的 RNA 结合的活性) 与 ADAR 的脱氨基酶结构域 (ADAR_{DD}) 融合, 同时用苄基鸟嘌呤修饰反义 RNA 的 5'端。由于 SNAP 可与苄基鸟嘌呤之间形成共价连接, 故将 ADAR 与反义 RNA 相连以发挥脱氨作用; ② 将具有 RNA 结合能力的 λ-噬菌体 N 蛋白与 ADAR_{DD} 融合, 同时将反义 RNA 和 BoxB 发卡结构融合, 通过 N 蛋白与 BoxB 结构的相互作用, 增强了 ADAR 与反义 RNA 之间的联系; ③ 将反义 RNA 和 ADAR2 (也称为 ADARB1) 融合, 可以将 ADAR 定位到反义 RNA 上, 有利于后续的在体内进行基因编辑。

人类来源的 2 个 ADAR 蛋白: ADAR1 和 ADAR2, 对于序列具有天然偏好, 结合这两种腺苷脱氨酶的 RNA 碱基编辑系统可优先编辑双链 RNA 底物中 A-C

错配。利用此 A-C 错配策略, 再结合使用高活性的突变体 ADAR2 (E488Q) 可进一步提高 RNA 碱基编辑效率^[4]。

2.2 Cas13 介导的 RNA 碱基编辑系统

Cas13 蛋白是来自 CRISPR 系统的第二类第 VI 型的核酸酶, 在 RNA 引导下具有催化单链 RNA 位点特异性断裂的作用。Cas13 主要包括 3 个家族: Cas13a、Cas13b 和 Cas13c。经过筛选, Rees 等^[4]将一种失去催化活性的 Cas13b 酶 (catalytically dead RNA-guided Cas13b enzyme, dPspCas13b) 与高活性突变体 ADAR_{DD} (E488Q) 融合, 得到可产生从 A 到 I (后续被读为 G) 修复的 RNA 碱基编辑系统 (REPAIRv1)。REPAIRv1 对内源性转录本仅能达到 15%~40% 的编辑效率, 且会产生较严重的脱靶效应, 而非靶位点的 RNA 编辑主要是由于 ADAR 脱氨酶的过度表达。为了提高靶点特异性, 给 ADAR_{DD} (E488Q) 引入了新的突变 T375G 得到了 REPAIRv2。改进的 REPAIRv2 与 REPAIRv1 相比, 脱靶率降低为 1/900。但由于其更高的特异性, 编辑效率相对于 REPAIRv1 有所降低^[7]。

3 碱基编辑系统在遗传性疾病治疗中的应用

迄今为止, 已知的人类致病性突变中, 最大的一类是点突变 (也称为单核苷酸多态性, single nucleotide polymorphism, SNP)。因此, 高效、准确地纠正致病性 SNP 对于研究和治疗遗传性疾病具有重要意义。由于碱基编辑技术能进行基因组序列中的单个碱基对的替换, 因而一定程度上满足了遗传性疾病治疗的需求。近年来, 碱基编辑系统因其更高的编辑效率和安全优势备受关注, 也成为点突变引发的遗传性疾病的潜在有效治疗工具^[4]。

3.1 代谢类疾病

3.1.1 苯丙酮尿症 苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU) 是一种常见的常染色体隐性代谢性肝病, 是由于苯

丙氨酸代谢途径中的苯丙氨酸羟化酶 (phenylalanine hydroxylase, PAH) 缺陷, 使得苯丙氨酸不能转变成为酪氨酸, 导致苯丙氨酸及其酮酸蓄积, 并从尿中大量排出。未经治疗的PKU患儿有严重发育迟缓、小脑畸形和癫痫等临床表现。

Villiger 等^[16]利用腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 递送碱基编辑系统 (nSaKKH-BE3) 来纠正 (*Pah*)^{emu2}成年小鼠中编码苯丙氨酸羟化酶的第七外显子的点突变 (图3)。经过治疗的苯丙酮尿症小鼠, mRNA 校正率高达63%, PAH的酶活性可以得到有效恢复, 且血液中苯丙氨酸水平恢复到120 μmol·L⁻¹以下, 并显著改善小鼠皮毛褪色表型。该工作证明了利用碱基编辑系统纠正 *Pah* 基因的方法治疗苯丙酮尿症的可行性。

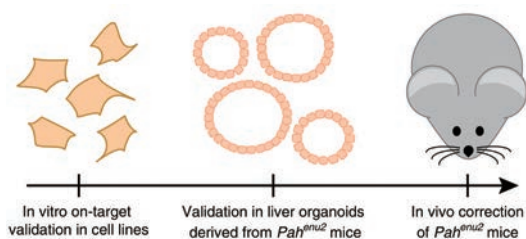


Figure 3 Schematic illustration of the correction of the mutated *Pah*^{emu2} locus in cell lines, liver organoids and *Pah*^{emu2} mice. Adapted from Ref. 16 with permission. Copyright © 2018 Springer Nature

3.1.2 遗传性酪氨酸血症 I 型 遗传性酪氨酸血症 I 型 (hereditary tyrosinemia type 1, HT1) 是由于编码酪氨酸分解代谢途径中的延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (fumarylacetoacetate hydrolase, FAH) 的 *Fah* 基因突变导致功能丧失所致。FAH 缺乏会导致毒性代谢中间产物的积累, 最终导致突变肝细胞凋亡和严重的肝损伤。尼替西农可抑制这一代谢通路上游的羟苯丙酮酸二加氧酶 (HPD), 阻止有毒代谢物的积累从而挽救急性肝衰竭。然而, 在一些患者身上应用尼替西农并未见效,

即便是使用该药物有效的患者, 仍处于发生肝硬化、肝细胞癌和智力发育受损等严重并发症的高风险之中。因此, 通过基因治疗手段从根源上对引起遗传性酪氨酸血症 I 型的基因突变进行精准纠正具有重要的科学意义和临床价值^[17]。

Rossidis 等^[18]利用 Ad-BE3-Hpd 在子宫内引入 *Hpd* 基因的无义突变来永久性地破坏 HPD 功能, 成功挽救了 *Fah*^{-/-}致死表型的小鼠。该工作证明了使用 BE3 在子宫内进行代谢基因治疗的可行性, 也为先天性遗传病的治疗提供了一种潜在的新方法。

最近, 麻省大学的薛文课题组、武汉大学的殷昊课题组和 David Liu 课题组^[19]使用 ABEs 的 ABE6.3 成功地纠正 *Fah*^{mut/mut} 成年小鼠中 *Fah* 基因的第八号外显子最后一个核苷酸的 A>G 剪接位点突变, 恢复小鼠肝细胞的功能性 *Fah* mRNA 的表达, 挽救小鼠的疾病表型, 如图4所示。研究人员将 ABE6.3 和 CRISPR 系统一起通过尾静脉水动力注射方式, 导入到小鼠的肝脏中。接受 ABE6.3 碱基编辑疗法的小鼠, 肝脏中 FAH 蛋白恢复表达且 FAH⁺肝细胞数量稳定, 小鼠的肝脏功能和生存率也大大提高。此研究第一次成功地将碱基编辑系统运用于 HT1 治疗, 表明了碱基编辑系统在治疗成年动物的肝脏遗传疾病的可行性及优越性。

3.1.3 家族性高胆固醇血症 家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia, FH) 是一种严重的遗传性脂质代谢疾病。FH 最常见的基因缺陷是编码低密度脂蛋白受体 (LDLR) 的基因突变, LDLR 蛋白功能丧失会导致循环系统中低密度脂蛋白 LDL 堆积。FH 的临床表现为血液中胆固醇水平明显升高, 诱发早期心血管疾病, 严重时可危及生命。针对纯合子 FH 患者, 现有治疗手段如血浆置换及肝移植等费用昂贵且存在一定风险, 因此急需寻找和探索新的治疗方法^[20]。 *Ldlr* 基因敲除小鼠具有纯和性家族性高胆固醇血症的表型, 使用 BE3 对 FH 模型小鼠进行体内碱基编辑, 将功能丧失突变引入到血管生成素样蛋白 3 (ANGPTL3)

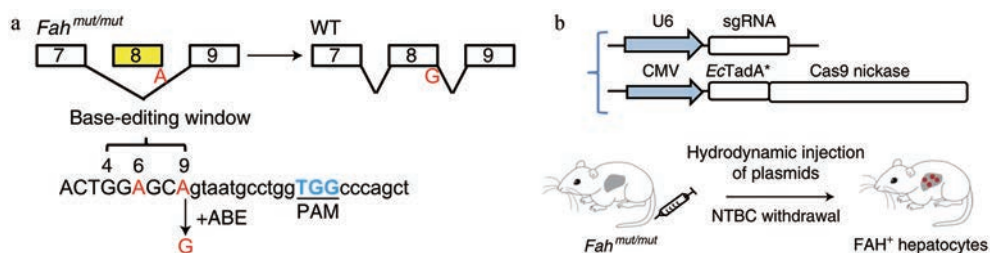


Figure 4 Application of adenine base editing for the treatment of mouse model of tyrosinaemia. a: Exon skipping caused by G>A mutation (red) at the last nucleotide of exon 8 in the *Fah* gene of *Fah*^{mut/mut} mice. Exon sequences are shown in upper case. The G>A mutation is at position 9 of the sgRNA target. WT: Wild-type allele; b: Schematic illustration of hydrodynamic injection of adenine base editors (ABEs) plasmids for the treatment of *Fah*^{mut/mut} mice. Adapted from Ref. 19 with permission. Copyright © 2020 Springer Nature

基因中可以显著影响小鼠甘油三酯(下调56%)和胆固醇(下调51%)的水平。这一结果表明,碱基编辑系统可作为治疗血脂异常患者的潜在策略^[21]。

3.2 β -血红蛋白病

3.2.1 β -珠蛋白生成障碍性贫血 β -珠蛋白生成障碍性贫血(β -thalassemia)又称 β -地中海贫血,是一种常见遗传病,多发于地中海国家、中国和东南亚。患者表现为 β -珠蛋白和红细胞减少,进而产生人体多部位缺氧、骨骼畸形和器官功能障碍最终发生器官衰竭。目前,骨髓移植(bone marrow transplantation, BMT)是唯一有效的治疗该疾病的方法,但由于人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)相容性的影响,治疗效果并不理想^[22]。

β -珠蛋白生成障碍性贫血主要由 β -珠蛋白基因 *HBB* 突变引起,其中 *HBB*-28 (A>G) 突变较为常见,该突变会导致 *HBB* 转录降低。因此,通过碱基编辑系统纠正 *HBB*-28 (A>G) 突变,是一种非常具有前景的治疗手段。黄军就课题组^[23]报道了使用 BE3 和 YEE-BE3 实现了对患者原代皮肤成纤维细胞和克隆人类胚胎中的 *HBB*-28 (A>G) 突变的精确有效校正,这也是首次在人胚胎中证实碱基编辑技术有望治疗点突变遗传疾病。Gehrke 等^[24]则通过工程化 APOBEC3A 脱氨酶得到的 eA3A-BE3,在人的红系前体细胞中选择性地编辑同一活性窗口内 *HBB*-28 基因的胞嘧啶核苷,实现了比 BE3 更精确的碱基编辑(图5)。

3.2.2 镰状细胞贫血 镰状细胞贫血(sickle cell anemia, SCA)的常见病因是 β -珠蛋白基因(*HBB*)上的第6位氨基酸谷氨酸被缬氨酸所代替(GAG到GTG),产生的镰状血红蛋白(HbS)取代了正常的血红蛋白(HbA)。临床特点除慢性溶血性贫血外,还表现为再发性疼痛危象,患者常因局部缺血导致器官组织受损。在对侧链使用 ABEs 将 GTG 转化为 GCG (丙氨酸),产生非致

病的等位基因 HbG 是一种治疗策略^[25]。

据报道, γ -球蛋白基因 *HBG1* 和 *HBG2* 的启动子突变导致患遗传性持续性胎儿血红蛋白增高症(hereditary persistence of fetal hemoglobin, HPFH)的人群能够抵抗镰状细胞贫血病。利用 ABEs 同时将 *HBG1* 和 *HBG2* 启动子的 198 位的 T 转换成 C,可以使胎儿血红蛋白在成年人中持续表达。Gaudelli 等^[12]利用 ABE7.10 实现了在 HEK293T 细胞中,以 29% 和 30% 的编辑效率分别为 *HBG1* 和 *HBG2* 启动子安装了所需的由 T·A 到 C·G 的突变。而使用 AncBE4max 和 ABEmax 在 *HBG1* 和 *HBG2* 启动子中引入激活突变,则获得了比 BE4 更好的效果^[26]。在最近报道的工作中,Miller 等^[25]使用进化的 SpCas9 突变体,实现了对 CACC-PAM 的定位,可对 HbS 突变的 HEK293T 细胞进行更高特异性的腺嘌呤碱基编辑。由此可见,基于碱基编辑系统的基因疗法为治愈镰刀状细胞贫血带来新的希望。

3.3 杜氏肌营养不良症

杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)为 X 染色体隐性遗传病,是儿童中最常见的遗传性肌肉疾病,临床表现为进行性肌肉萎缩,严重者常因心肺功能衰竭导致死亡。绝大部分患者由于编码抗肌萎缩蛋白的 *Dmd* 基因发生移码突变,导致该蛋白缺失,肌肉细胞功能退化^[27]。常兴课题组^[28]使用 TAM 系统介导的外显子跳跃,可以高效地恢复患者来源的诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)中肌营养不良蛋白的表达和分子特性,以改善肌肉功能。韩国首尔国立大学 Jin-Soo Kim 团队^[29]使用 ABE7.10 纠正杜氏肌营养不良症小鼠模型中 *Dmd* 基因的无义突变,在治疗组小鼠中实现了肌肉细胞的抗肌萎缩蛋白的表达部分恢复,如图6所示。以上工作均显示了碱基编辑系统作为杜氏肌营养不良症潜在治疗方法的前景。

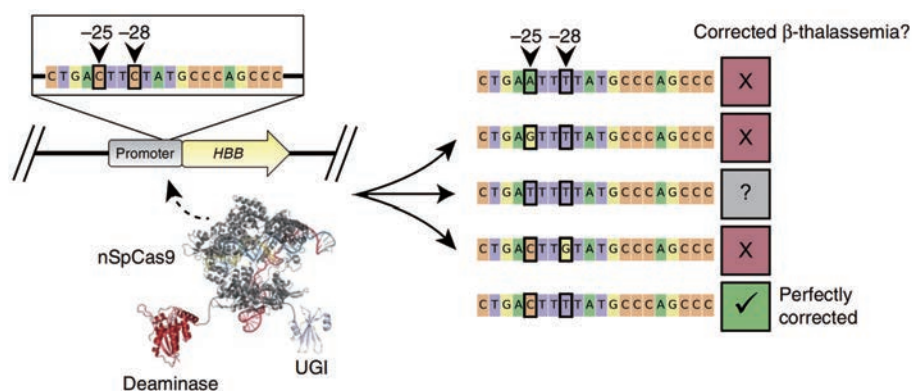


Figure 5 Schematic illustration of *HBB*-28 (A>G) mutation and potential therapeutic base editing by targeting Cs at -28 and -25 in the editing window with an *HBB*-targeting gRNA. Mutations to the bystander cytosine at the -25 position are deleterious and cause β -thalassemia phenotypes independent of the identity of the -28 nucleotide. Adapted from Ref. 24 with permission. Copyright © 2018 Springer Nature

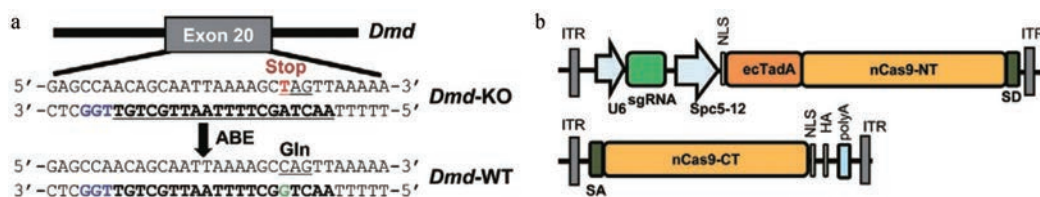


Figure 6 Application of ABEs for the treatment of a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. a: The ABEs target sequence in exon 20 of the *Dmd* gene contains a nonsense mutation. The PAM sequence is shown in blue, and the protospacer sequence is underlined. The mutated nucleotide in the *Dmd* knockout mouse and the guanine nucleotide corrected by ABEs are shown in red and green, respectively; b: Schematic diagram of *trans*-splicing AAV vectors encoding engineered *E. coli* TadA (ecTadA), which are conjugated to the first half of nickase Cas9 (nCas9-NT) and the second half of nickase Cas9 (nCas9-CT). SD: Splicing donor; SA: Splicing acceptor. Adapted from Ref. 29 with permission. Copyright © 2018 Springer Nature

3.4 遗传性耳聋

随着新型致聋基因的发现, 遗传性耳聋 (hereditary hearing loss, HHL) 的研究在近年来得到飞速发展, 对耳聋基因的功能及机制的研究将为遗传性耳聋患者提供更多的治疗选择。目前, 科学家已经可以利用 CRISPR/Cas9 系统建立遗传性耳聋动物模型, 并发现碱基编辑系统在治疗遗传性耳聋上有着巨大的应用潜力^[30]。

Gao 等^[31]首次利用 CRISPR/Cas9 产生 DSB, 通过 NHEJ 修复形式导致靶基因失活来治疗常显性耳聋等位基因突变的 *Tmc1*^{Bth/+} 小鼠模型, 并显著改善小鼠听力损失的情况。但 *Tmc1*^{Bth/+} 和野生型小鼠的等位基因仅在一个碱基对上发生了突变, 而特异性纠正靶基因中的一对碱基是碱基编辑系统的优势, 因此使用碱基编辑系统治疗基因突变引发的遗传性耳聋更有前景。Rees 等^[32]将 BE3 与 sgRNA 复合物包埋在阳离子脂质纳米粒中, 注射进入小鼠幼鼠体内, 成功实现了对活体小鼠耳蜗组织的碱基编辑, 使碱基编辑系统治疗基因突变引起的耳蜗相关疾病成为可能。

隐性功能丧失突变是遗传性耳聋最常见的病因。最近, Yeh 等^[33]应用 CBEs 有效纠正了编码跨膜通道样蛋白 1 (transmembrane channel-like 1, TMC1) 的 *Tmc1* 基因上携带的导致耳聋的点突变。并在模拟人类隐性耳聋的小鼠模型中进行碱基编辑治疗, 接受治疗的小鼠毛细胞形态、功能部分恢复, 听觉功能得到改善。

4 碱基编辑系统的优化方向

虽然 CBEs 和 ABEs 在基因编辑方面具有强大的优势, 但是正式应用于临床试验前, 仍然有许多限制和亟待解决的问题, 如碱基编辑效率低、碱基编辑范围有限和脱靶编辑等。

4.1 提升碱基编辑效率

上海科技大学生命学院和中国科学院—马普计算生物研究所的研究人员合作开发出了增强型基因组

碱基编辑系统 (enhanced BE, eBE)。将 2A (自切割肽)-UGI 序列融合到 BE3 中, 表达游离 UGI 以强烈抑制内源性碱基切除修复, 不仅提升了碱基编辑效率, 也提高了编辑的精确度^[34]。该方法不仅适用于基于 Cas9n 的碱基编辑系统, 在 dCpf1-BEs (Cpf1, 也被称为 Cas12a, 是另一种可靶向切割基因组 DNA 的 CRISPR 核酸酶) 3'端增加 3 个拷贝 2A-UGI 序列, 也可达到提升碱基编辑效率的目的^[35]。最近陈佳研究组、杨力研究组、刘真研究组和黄行许研究组^[36]基于不具有 DNA 切割活性的 dCas12a (catalytically dead Cas12a), 合作开发了 BEACON (base editing induced by human APOBEC3A and Cas12a without DNA break) 系统。该系统不仅提高了脱氨基效率和碱基编辑特异性, 也避免了激活细胞 DNA 损伤相应通路造成的细胞凋亡, 在体内应用更为安全。

DNA 修饰是影响碱基编辑效率的另一个因素。研究发现 CpG 位点的 DNA 甲基化极大抑制了小鼠 APOBEC1 催化的胞嘧啶脱氨活性。杨力课题组、陈佳课题组和黄行许课题组^[37]合作进行了一系列筛选鉴定, 发现基于人类 APOBEC3A 的碱基编辑系统 (BEs containing human APOBEC3A, hA3A-BE) 可在基因组高甲基化区域实现从甲基化胞嘧啶到胸腺嘧啶的单个碱基的高效转换。

由于 BEs 的低表达和递送效率低的性质, 在某些细胞系或特定靶基因位点的碱基编辑效率常不理想^[7]。近期研究表明, Cas9 nickase 密码子的优化和 N 端核苷定位序列的加入可提高碱基编辑的效率, 经此两种方法优化后 CBEs 和 ABEs 的编辑效率都得到了显著提高^[19,26,38]。

4.2 扩大碱基编辑范围

在碱基编辑中, 无完整 DNA 切割活性的 dCas9 或 dCpf1 蛋白通常作为定位子来引导胞苷脱氨酶到达目标位点, 其中一个重要特征是, 它们都需要一个 PAM 来识别目标位点。比如 SpCas9 识别的 PAM 序列是 NGG, 而 Cpf1 允许识别富含 T 的 PAM (TTTV), 极大地

限制了目标基因组位点的选择^[35,39,40]。碱基编辑范围局限性的问题可以通过替换不同的 Cas 蛋白或应用多种进化或工程化的 Cas9 变体来解决^[40]。

Kim 等^[41]使用来自金葡萄球菌的 SaCas9 nickase 替换了 BE3 中的 SpCas9 nickase, 实现了对 NNGRRT 序列的 PAM 的靶向; 此外, 还应用工程化方式得到其他变体 Sa(KKH)-BE3、VQR-BE3、VRER-BE3 和 EQR-BE3, 扩大了碱基编辑系统识别的 PAM 序列的范围 (NGG、NGA、NGAN、NGAG、NGCG、NNGRRT 和 NNNRRT)。SpCas9-NG 变体与噬菌体辅助的连续进化得到的 xCas9 均具有识别 NG-PAM 的兼容性, 将其用于碱基编辑系统开发可直接靶向相应位点^[39,42]。基于 ABEs 改造的 VRQR-ABEmax 和 VRER-ABEmax 分别可以靶向以 NGA、NGCG 为 PAM 的靶点^[40]。利用噬菌体辅助连续与非连续进化构建的 3 个识别 NRRH、NRCH 和 NRTH 的 PAM 序列的 SpCas9 新变种, 实现了对以前难以定位的非 G-PAMs 的致病性点突变的有效碱基编辑^[25]。工程化 SpCas9 变体和噬菌体辅助进化的 SpCas9 使得 Cas9 拥有更广泛的 PAM 兼容性, 碱基编辑系统的编辑范围也得到了不断的扩展。

最近, 哈佛医学院的 Walton 等^[43]对 SpCas9 蛋白进行了突变改造, 开发了一种名为 SpRY 的突变体。SpRY 核酸酶可以靶向几乎所有 PAM, 在人类细胞中具有 NRN PAM 的广泛位点上均表现出强大的活性。因此, 应用此核酸酶蛋白的单碱基编辑系统可将编辑目标拓展至全基因组范围。

4.3 优化活性窗口

碱基编辑系统的底物上易发生脱氨作用的活性区域称为活性窗口, 大多数碱基编辑系统的编辑窗口仅在 4~5 个核苷酸内, 以距 PAM 的核苷酸数来定位 (通常情况下, 位点 12~17 为次优, 位点 14~17 为优)^[4,29]。理论上活性窗口内的所有胞嘧啶都有可能被转化为胸腺嘧啶, 而在编辑过程中会产生旁观者编辑效应, 即在活性窗口内对除目标碱基以外的碱基进行的编辑, 需要尽可能加以规避^[4]。然而, 较大的活性窗口有利于对目标序列进行定位, 较小的活性窗口则有利于提高编辑的准确性, 如何根据碱基编辑的实际需要选择合适大小的活性窗口是一个需要考虑的重要问题。

许多碱基编辑系统的应用仅将单个核苷酸的转换作为最终目标, 这时一个较窄的活性窗口可以提高碱基编辑的准确性。研究发现, 通过降低胞嘧啶脱氨酶的酶活性和降低底物与胞嘧啶脱氨酶的结合能力, 可有效缩小 CBEs 的活性窗口, 基于 APOBEC1 结构域突变开发的 YE1-BE3、YE2-BE3 和 YEE-BE3 等具有更小活性窗口的碱基编辑系统由此产生。即便两个胞苷都

位于 BE3 的活性窗口内, YEE-BE3 也可以区分相邻的“C”^[41]。通过向 dCpf1-BEs 的 APOBEC 中引入相似的突变, 同一活性窗口内主要与次要的编辑比率也得到了提高, 尽管一定程度上降低了编辑效率, 但活性窗口却被缩小至 3 个核苷酸内^[35]。值得一提的是, ABEs 被证明在人类细胞中也有编辑胞嘧啶的作用, ABEs 在 UGI 共作用下可将 C 转换成 T。ABEs 诱导的 C 替换独立于其诱导的 A 替换, 此编辑窗口位于 5~7 位点, 且在 6 位点编辑活性更高^[44]。

尽管不少研究在缩小编辑活性窗口方面做出了很多努力, 但在一些特定状况下, 也需要尽可能扩大活性窗口。与 ABE7.10 不同, ABE7.9 或 ABE6.3 的活性窗口可以从位点 4 到位点 9^[12]。对引导 ABE7.10 的 gRNA 5' 端进行结构扩展, 可将编辑活性窗口增加 1~2 个核苷酸^[29]。陆军军医大学陈洁平课题组和上海科技大学黄行许课题组^[45]合作开发了一种新的编辑技术——“BE-PLUS”, 将 10 个拷贝的 GCN4 肽融合到 nCas9 (D10A) 中, 向靶位点招募多个 APOBEC-UGI 融合蛋白, 从而在更大范围地进行由 C 到 U (T) 的编辑, 极大地拓展了碱基编辑器的编辑窗口。Huang 等^[40]将 SaCas9 与 ABEmax 体系结构融合, 构建的 SaABEmax 和 SaKKHABEmax 可将碱基编辑活动窗口扩大至 4~14 位点。尽管扩大的窗口范围增加了旁观者编辑的可能性, 但当编辑目标位点和典型的 PAM 区域有一定距离时, 传统的碱基编辑工具很难在目标位点发挥编辑作用; 若所引起的额外突变微不足道, 或不需要的基因型可以通过筛选去除, 拓宽编辑窗口将能显示出更强的优越性^[40]。

4.4 降低脱靶效应

CBEs 和 ABEs 都有对非靶基因位点上 DNA 进行编辑的潜在可能。脱靶的碱基编辑主要包括: 近端脱靶编辑, 即远离活性窗口但在目标位点附近 200 bp 以内的编辑; 远端脱靶编辑, 即在远离目标位点位置进行的编辑。由于碱基编辑系统中 Cas9 介导了其 DNA 靶向能力, 因此通过对 Cas9 核酸酶编辑的目标进行基因组测序, 可以对非靶碱基编辑进行研究和预测^[4]。

脱靶碱基编辑的发生有两种途径: 一种是由于 RNA 引导的 Cas9 结构域与目标 DNA 位点序列具有高度同源性, 而产生非靶位点的编辑。由该途径产生的脱靶编辑可以通过以下策略降低: 在碱基编辑系统的 Cas9 组分中增加 DNA 特异性突变, 在 sgRNA 中添加 5'-鸟嘌呤核苷酸, 或将碱基编辑系统以核糖核酸蛋白质 (ribonucleoprotein, RNP) 形式递送; 另一种途径源于碱基编辑系统的脱氨酶域所存在的内在 DNA 亲和力。根据靶点上下游序列、PAM 的适用性和靶点所在

的组织类型等,选择合适的碱基编辑系统,有助于大幅度降低此类脱靶编辑^[46,47]。

Kim等^[48]通过在BE3插入点突变,得到高保真碱基编辑系统HF-BE3,显著降低了碱基编辑的脱靶效应。同时他们发现,以蛋白形式递送BE3和HF-BE3与质粒转染形式相比,在不影响碱基编辑效率的情况下具有更高的特异性^[32]。Kim等^[48]证明了通过设计改良的sgRNA、以RNP形式递送碱基编辑系统及利用SniperABE7.10编辑器,均可降低在人类细胞中ABEs的非靶向活性。为了最大程度降低脱靶效应,研究者推荐使用YE1-BE4、YE2-BE4、YEE-BE4、EE-BE4、R33A+K34A-BE4、YE1BE4-CP1028、YE1-BE4-NG和AALN-BE4等突变体,可显著降低脱靶编辑。以上突变体编辑后所产生的indels与BE4相似甚至更低,且在靶DNA的编辑水平也能达到BE4的50%~90%^[47]。

由于通常使用的DNA碱基编辑系统所必需的脱氨酶常常与RNA结合,因此除了在DNA上的脱靶效应,DNA碱基编辑系统也会诱导潜在RNA脱靶突变。中国科学院神经科学研究所杨辉课题组,与中国科学院计算生物学研究所及四川大学合作完成的一项研究^[49]表明,DNA碱基编辑系统确实会造成非靶向RNA单核苷酸变异(single nucleotide variants, SNVs),并发现这些非靶向SNVs可通过在脱氨酶中引入点突变来消除。依赖于引入点突变的方法,研究人员共获得CBEs和ABEs的4种高保真突变体:BE3^{W90Y/R126E}、BE3(hA3A^{R128A})、BE3(hA3A^{Y130F})和ABE7.10^{F148A}。这些高保真突变体不仅能降低在RNA上的脱靶效应,同时也保持了对靶DNA的有效编辑效率。此外,Gruneald等^[50]基于大鼠APOBEC1,设计了CBEs变异株SECURE variants,不仅显著降低了RNA水平的脱靶编辑,而且大幅度提高了在靶精度。Rees等^[46]发现在两个TadA结构域中,都有突变的ABEmax变体也可使RNA编辑活性大大降低。杨辉课题组^[51]通过突变APOBEC1上的核酸结合域的关键位点来改变其蛋白构象破坏结合RNA能力,或将APOBEC3A蛋白替换为APOBEC1蛋白,并引入突变来降低CBEs的脱靶效应。优化后的单碱基编辑工具YE1-BE3-FNLS,在保证较高编辑效率的同时降低了DNA和RNA上的脱靶效应。

4.5 提高编辑产物纯度

虽然ABEs和CBEs已经被广泛用于在生物体内纠正点突变,根据对两者的靶向编辑效果考察发现,应用ABEs通常会生成纯度较高的A·T→G·C的预期编辑产物;而在CBEs实际应用中,除了发现从C·G→T·A的预期编辑产物外,仍存在一定比例的非预期编辑产物。非预期编辑产物不仅包括靶链上C·G或A·T分别

转换为除T·A或G·C以外的其他碱基对,而且来自于非靶位点的胞苷或腺苷突变和indels的产生^[52]。这些非预期编辑产物的存在,降低了应用碱基编辑系统后的产物纯度。为提高编辑产物纯度,需尽量避免以上几种非预期编辑产物产生的可能。

在胞嘧啶碱基编辑过程中,DNA中C到U的改变会被细胞内BER机制视为错误,并通过UNG去除。去除U的碱基位点修复过程容易出错,因而会导致核苷酸的随机插入;加之dCas9 nickase可在未发生编辑的DNA单链引入一个缺口,导致indels产生^[47]。Komor等^[11]证明了缺少UNG基因的细胞中,碱基编辑产物的纯度大幅度提高,如BE4的构建即是通过增加UGI的拷贝数,提升了碱基编辑效率和编辑产物纯度,可能是由于对UNG抑制作用增强所致。上海科技大学陈佳实验室^[34]所构建的eBE-S3,通过将UGI增加至4个拷贝数,同样可提高编辑产物纯度。基于环化排列的SpCas9(CP-Cas9)优化的CP-CBEmax突变体,所产生非预期编辑产物的频率低于CBEmax,可能原因是由于增强了UGI域对编辑位点的相互作用所致^[40]。

Gehrke等^[24]通过工程化人源的APOBEC3A恢复了胞苷脱氨酶的序列偏好性,所构建的eA3A-BE3具有选择性识别基序,并具有编辑特定胞苷的能力。因而提升了编辑产物的纯度。由于nCas9在非编辑链产生缺口会形成DSB,经细胞自身的NHEJ途径修复,在编辑过程中会产生少量的indels。而Komor等^[11]建立的BE4-Gam,是通过保护DSB末端不被降解,从而降低了indels,提升编辑产物纯度。

4.6 实现AGCT碱基之间自由替换

根据碱基互补配对原则,需要逆转的致病点突变有以下6种:A·T→G·C、A·T→C·G、C·G→T·A、C·G→G·C、A·T→T·A和C·G→A·T,并且这些突变在生物体内的分布比例不均^[4]。目前所应用的CBEs(如BE4)和ABEs(如ABE7.10),分别能实现将目标C·G碱基对转换为T·A碱基对和将A·T碱基对转换为G·C碱基对,实现了嘌呤与嘌呤、嘧啶与嘧啶之间的替换,占临床变异数据库中SNPs的61%^[26]。尽管已有研究表明,利用CRISPR-X等方法可以产生除C到T、G到A的其他可能替换,但这种替换并不稳定,难以达到精准高效纠正致病基因的目的^[9]。因此,能否利用碱基编辑系统实现嘌呤与嘧啶之间的自由替换,以纠正上述6种点突变,仍值得探索。

5 总结和展望

碱基编辑系统作为一种强大的基因编辑工具,其发展与生命科学及医学等领域的进步有着紧密联系。自2016年第一代碱基编辑系统问世以来,碱基编辑经

历了飞速的发展与创新。最近,国内外团队以不同的策略构建了同时能进行两个临近碱基CA向TG替换的双碱基基因编辑工具^[53-56],其中李大力课题组^[56]开发的A & C BEmax在哺乳动物细胞中表现出更高的CBEs活性、更广的编辑窗口及更高的A、C同时突变的效率。David Liu课题组^[57]利用靶标文库分析结合机器学习模型BE-Hive预测碱基编辑基因型的结果,针对BE-Hive的预测结果对CBEs进行设计改进,实现了之前难以处理的靶标编辑。这些研究为基因编辑工具的发展方向及其应用提供了很好的参考。在今后的研究中,作者认为应当继续开发更精准高效的碱基编辑系统,一方面探索碱基编辑技术在更多疾病模型中的应用;另一方面降低碱基编辑系统的脱靶编辑,提高碱基编辑的精准度,从而降低其潜在的基因毒副作用,是未来碱基编辑系统作为新药开发的关键科学问题。同时,通过合理化设计碱基编辑系统的递送载体,以最大限度地提高碱基编辑技术在体内的治疗效果,将为遗传性疾病治疗开拓新的里程碑。

作者贡献: 陈缘、陈宇轩和平渊共同参与了文章的撰写以及修改。

利益冲突: 本文作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Wan T, Niu D, Wu C, et al. Material solutions for delivery of CRISPR/Cas-based genome editing tools: current status and future outlook [J]. *Mater Today*, 2019, 26: 40-66.
- [2] Lu D, Li L, Deng XM. CRISPR/Cas9 and its application in drugs development [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 11-20.
- [3] Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. *In vivo* genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration [J]. *Nature*, 2016, 540: 144-149.
- [4] Rees HA, Liu DR. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 770-788.
- [5] Yang B, Yang L, Chen J, et al. Development and application of base editors [J]. *CRISPR J*, 2019, 2: 91-104.
- [6] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533: 420-424.
- [7] Molla KA, Yang Y. CRISPR/Cas-mediated base editing: technical considerations and practical applications [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 1121-1142.
- [8] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems [J]. *Science*, 2016, 353: aaf8729.
- [9] Hess GT, Frésard L, Han K, et al. Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2016, 13: 1036-1042.
- [10] Ma Y, Zhang J, Yin W, et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2016, 13: 1029-1035.
- [11] Komor AC, Zhao KT, Packer MS, et al. Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity [J]. *Sci Adv*, 2017, 3: eaao4774.
- [12] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551: 464-471.
- [13] Zong Y, Gao CX. Progress on base editing systems [J]. *Hereditas (遗传)*, 2019, 41: 777-800.
- [14] Richter MF, Zhao KT, Eton E, et al. Phage-assisted evolution of an adenine base editor with improved Cas domain compatibility and activity [J]. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0453-z.
- [15] Zhao YW, Jiang WH, Deng ZX, et al. Development and application of base editors in bacterial genome editing [J]. *Microbiol China (微生物学通报)*, 2019, 46: 319-331.
- [16] Villiger L, Grisch-Chan HM, Lindsay H, et al. Treatment of a metabolic liver disease by *in vivo* genome base editing in adult mice [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1519-1525.
- [17] Yin H, Xue W, Chen S, et al. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 551-553.
- [18] Rossidis AC, Stratigis JD, Chadwick AC, et al. *In utero* CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes [J]. *Nat Med*, 2018, 24: 1513-1518.
- [19] Song CQ, Jiang T, Richter M, et al. Adenine base editing in an adult mouse model of tyrosinaemia [J]. *Nat Biomed Eng*, 2020, 4: 125-130.
- [20] Zhao H, Li Y, He L, et al. *In vivo* AAV-CRISPR/Cas9-mediated gene editing ameliorates atherosclerosis in familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2020, 141: 67-79.
- [21] Chadwick AC, Evitt NH, Lv W, et al. Reduced blood lipid levels with *in vivo* CRISPR-Cas9 base editing of ANGPTL3 [J]. *Circulation*, 2018, 137: 975-977.
- [22] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378: 1479-1493.
- [23] Liang P, Ding C, Sun H, et al. Correction of β -thalassemia mutant by base editor in human embryos [J]. *Protein Cell*, 2017, 8: 811-822.
- [24] Gehrke JM, Cervantes O, Clement MK, et al. An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 977-982.
- [25] Miller SM, Wang T, Randolph PB, et al. Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs [J]. *Nat Biotech*

- nol, 2020, 38: 471-481.
- [26] Koblan LW, Doman JL, Wilson C, et al. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 843-846.
- [27] Moretti A, Fonteyne L, Giesert F, et al. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of Duchenne muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2020, 26: 207-214.
- [28] Yuan J, Ma Y, Huang T, et al. Genetic modulation of RNA splicing with a CRISPR-guided cytidine deaminase [J]. *Mol Cell*, 2018, 72: 380-394.
- [29] Ryu SM, 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: 536-539.
- [30] Tao Y, Zhao XL, Kang W, et al. Base editing and its applications in gene therapy [J]. *Chin J Otolaryngol (中华耳科学杂志)*, 2018, 16: 150-154.
- [31] Gao X, Tao Y, Lamas V, et al. Treatment of autosomal dominant hearing loss by *in vivo* delivery of genome editing agents [J]. *Nature*, 2018, 553: 217-221.
- [32] Rees HA, Komor AC, Yeh WH, et al. Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15790.
- [33] Yeh WH, Shubina-Oleinik O, Levy JM, et al. *In vivo* base editing restores sensory transduction and transiently improves auditory function in a mouse model of recessive deafness [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaay9101.
- [34] Wang L, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor [J]. *Cell Res*, 2017, 27: 1289-1292.
- [35] Li X, Wang Y, Liu Y, et al. Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 324-327.
- [36] Wang X, Ding C, Yu W, et al. Cas12a base editors induce efficient and specific editing with low DNA damage response [J]. *Cell Rep*, 2020, 31: 107723.
- [37] Wang X, Li J, Wang Y, et al. Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 946-949.
- [38] Zafra MP, Schatoff EM, Katti A, et al. Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 888-893.
- [39] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. *Nature*, 2018, 556: 57-63.
- [40] Huang TP, Zhao KT, Miller SM, et al. Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 626-631.
- [41] Kim YB, Komor AC, Levy JM, et al. Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 371-376.
- [42] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space [J]. *Science*, 2018, 361: 1259-1262.
- [43] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368: 290-296.
- [44] Kim HS, Jeong YK, Hur JK, et al. Adenine base editors catalyze cytosine conversions in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1145-1148.
- [45] Jiang W, Feng S, Huang S, et al. BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity [J]. *Cell Res*, 2018, 28: 855-861.
- [46] Rees HA, Wilson C, Doman JL, et al. Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors [J]. *Sci Adv*, 2019, 5: eaax5717.
- [47] Doman JL, Raguram A, Newby GA, et al. Evaluation and minimization of Cas9-independent off-target DNA editing by cytosine base editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 620-628.
- [48] Kim D, Kim DE, Lee G, et al. Genome-wide target specificity of CRISPR RNA-guided adenine base editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 430-435.
- [49] 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: 275-278.
- [50] Gruneald J, Zhou R, Garcia SP, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors [J]. *Nature*, 2019, 569: 433-437.
- [51] Zuo E, Sun Y, Yuan T, et al. A rationally engineered cytosine base editor retains high on-target activity while reducing both DNA and RNA off-target effects [J]. *Nat Methods*, 2020, 17: 600-604.
- [52] Lee HK, Willi M, Miller SM, et al. Targeting fidelity of adenine and cytosine base editors in mouse embryos [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4804.
- [53] Sakata RC, Ishiguro S, Mori H, et al. Base editors for simultaneous introduction of C-to-T and A-to-G mutations [J]. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0509-0.
- [54] Grünwald J, Zhou R, Lareau CA, et al. A dual-deaminase CRISPR base editor enables concurrent adenine and cytosine editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0535-y.
- [55] Li C, Zhang R, Meng X, et al. Targeted, random mutagenesis of plant genes with dual cytosine and adenine base editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-019-0393-7.
- [56] Zhang X, Zhu B, Chen L, et al. Dual base editor catalyzes both cytosine and adenine base conversions in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0527-y.
- [57] Arbab M, Shen MW, Mok B, et al. Determinants of base editing outcomes from target library analysis and machine learning [J]. *Cell*, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.037.