

碱基编辑器 CGBE 的研究进展

林洁婧 王刚^(通讯作者)

广州大学生命科学学院精准基因编辑工程中心, 广东广州, 510006;

摘要: 碱基编辑技术作为基因组编辑领域的重要进展, 不依赖于双链断裂 (DSB), 从而减少了基因组损伤和脱靶效应。碱基编辑器 (Base Editor, BE) 是一种能在特定的 DNA 位点实现单碱基的精确替换的技术。自 2016 年 CBE (Cytosine Base Editor) 和 ABE (Adenine Base Editor) 被提出以来, 碱基编辑器已成为基因编辑研究的热点。CGBE (Cytosine-Guanine Base Editor) 是基于 CBE 的进一步发展, 它能够同时编辑胞嘧啶 (C) 和鸟嘌呤 (G), 拓展了碱基编辑器的应用范围。本综述将概述碱基编辑器 CGBE 的基本研究进展。

关键词: 碱基编辑; 碱基颠换编辑器; CGBE; 脱氨酶

DOI: 10.69979/3029-2808.26.02.061

引言

基因编辑领域由于 CRISPR-Cas9 技术的出迎来了革命性的突破, 其通过双链 DNA 断裂和细胞修复机制的引导, 实现了特定基因的编辑。但双链断裂的修复过程往往引发脱靶效应, 并可能导致一些不必要的基因突变。单核苷酸变异 (SNV) 占有致病突变的一半以上, CRISPR-Cas9 基因组编辑的发展改变了我们在研究和治疗环境中纠正这些致病 SNV 的能力。近年来, 使用的两种最常见的碱基编辑程序是胞嘧啶碱基编辑器 (CBE) 和腺嘌呤碱基编辑器 (ABES)。本文主要阐述胞嘧啶碱基编辑器 (CBE), CBEs 由 nCas9、胞嘧啶脱氨酶和尿嘧啶糖基酶抑制物 (UGI) 组成, 可有效地产生胞嘧啶到胸腺嘧啶 (C-T) 的转变。自最初构建 CBEs 以来, 通过脱氨酶工程、密码子序列优化、结构重组和加入新的效应器组件, 它们的编辑效率和特异性不断提高。基于新兴方向收缩编辑窗口, 适合矫正特定突变 (如 C→G 型致病变异), CGBE 应运而生。在这里, 我们介绍了关于相关 CGBE 的进展, 其主要是关于是否依赖脱氨酶的两种编辑器。

1 C-to-G 碱基编辑器

1.1 依赖脱氨酶的 C-to-G 碱基编辑器

大约 10% 的人类致病 SNV 需要进行 C-G 校正^[1]。有趣的是, 几个基于 C 到 G 的转换编辑器是通过在 CBE 中用 UNG 替换 UGI 来开发的^[2]。其基本原理是 UNG 去掉胞嘧啶脱氨基产生的 U。这触发了一种 TLS, 它有利于插入与 AP 位点相反的 C, 这导致在 DNA 修复和/或 DNA 复制之后主导的 C-to-G 编辑结果 (图 1A)。通过融合 rAPO

BEC1 (胞嘧啶脱氨酶)、nCas9 和人 UNG1 (hUNG1), Zhao 等人构造了一个基于 C-to-G 的转换编辑器 GBE, 实现了 5.3%-53% 的目标编辑效率^[1,3]。由于 rAPOBEC1 本质上同时脱氨基 DNA 和 RNA 中的胞嘧啶^[4,5], 因此 APOBEC1 衍生的碱基编辑器有必要进行彻底的审查, 以实现 sgRNA 独立的非靶标编辑。当观察到 CBE 导致 sgRNA 独立的、基因组范围的非靶标 DNA 编辑和转录组范围的 RNA 编辑时, 这个问题就突出出来^[6,7]。为了减少依赖 APOBEC1 的脱靶事件, Kurt 等人。开发了另一个基于 C 到 G 的转换编辑器 (CGBE1), 它由 rAPOBEC1 (R33A)、Cas9 (D10A) 和 eUNG (来自大肠杆菌的 UNG)^[8] 组成。先前在 CBE 中使用 rAPOBEC1 R33A 突变被证明在不牺牲其靶上 DNA 编辑效率的情况下减少其在 RNA 和 DNA 中的 sgRNA 非靶标效应, 并且 eUNG 在产生 AP 位点方面比 hUNG 更有效^[6,8]。因此, 与原始形式的 GBE 相比, CGBE1 预计会有更少的副产品, 同时仍然保持更高的 C-to-G 编辑效率。

1.2 不含脱氨酶的 C-to-G 碱基编辑器

上面提到的 C-to-G 碱基编辑仍然需要胞嘧啶脱氨酶的参与, 这被证明是 RNA 和 DNA 中许多 sgRNA 非靶标突变的主要原因^[9,10]。绕过 C 脱氨基的过程, 找到一种可以直接识别和切除 C 的胞嘧啶-DNA 糖基酶 (CDG) 来构建无脱氨酶的 C-to-G 碱基编辑程序可能有助于克服这个问题。受 hUNG1 (N204D) 在体外显示较低的 CDG 活性的启发, Ye 等人。首先通过 hUNG1 的进化产生了一种名为 CDG4 的高活性 CDG, 它可以直接有效地切断胞嘧啶, 创建一个 AP 位点^[11]。当 CDG4 与设计为胞嘧啶无脱氨酶碱基编辑程序 (DAF-CBE) 的 nCas9 融合时, 它实现了 C-to

-G 编辑，特别是在 NCT 基序中 (N 表示任何核苷酸)。由于 DAF-CBE 不包括脱氨酶，其 sgRNA 非依赖的非靶点编辑效应显著降低。然而，与以前的 C-to-G 碱基编辑相比，DAF-CBE 在 Protospacer 中的几个测试胞嘧啶位置显示出较低的编辑性能。

1.3 基于 C-to-G 的碱基编辑生成的 DSB

下面这个表格列举了几个关于 C 到 G 的编辑器，它们编辑的窗口各不相同。除了靶外突变，在 C-to-G 碱基编辑过程中也观察到大量的中间双链断裂。这些是缺失、模板化插入、异常颠换和染色体易位的主要原因。研究表明，APE1 介导的 AP 部位切割和 nCas9 介导的单链 DNA 缺口是观察到的 DSB 产生的两个主要原因^[12]。为

Base-Editor	C-to-G editing efficiency	C-to-G purity of target editing	motif preference	editing window	Ref.
GBE	averaging 24.14%	29.7%~92.2%	N.A.	C6	[10]
CGBE1	averaging 14.4%	N.A.	AT-rich	C5-C7(C6)	[14]
miniCGBE1	averaging 13%	N.A.	AT-rich	C5-C7(C6)	[14]
CGBE	15.4%±7%	68%±14%	WCW/ACC/GCT	C2-C10(C5-C7)	[15]
GBE2.0	averaging 30.88%	35.57%~92.92%	N.A.	C3-C9(C6)	[16]

2 展望

CGBE 技术正从“工具开发”向“精准应用”快速迈进。未来，随着对 DNA 修复机制的深入理解和酶工程技术的突破，CGBE 有望成为纠正 C-to-G 致病突变的首选工具，为基因治疗和生物技术创新带来革命性变化。同时，其在安全性和特异性上的持续优化，将加速该技术从实验室走向临床和产业化应用

参考文献

[1]Zhao D, Li J, Li S, et al. Glycosylase base editors enable C-to-A and C-to-G base changes[J]. Nature biotechnology, 2021, 39(1): 35-40.

[2]Molla K A, Qi Y, Karmakar S, et al. Base editing landscape extends to perform transversion mutation[J]. Trends in Genetics, 2020, 36(12): 899-901.

[3]Chen L, Hong M, Luan C, et al. Adenine transversion editors enable precise, efficient A•T-to-C•G base editing in mammalian cells and embryos[J]. Nature biotechnology, 2024, 42(4): 638-650.

[4] Salter J D, Bennett R P, Smith H C. The AP

了最大限度地减少这种 DSB，将自杀酶 5-羟甲基胞嘧啶结合 ES 细胞特异性 (HMCES) 与 CGBE1^[12, 13] 共转染，HMCES 可以阻止 APE1 对 AP 位点的作用。这种方法显著减少了删除和模板化插入，而不会牺牲大多数目标站点的 C-to-G 编辑效率。由于 HMCES 的 SOS 反应相关肽酶 (SRAP) 结构域与含有亚纳摩尔亲和力 AP 位点的 ssDNA 结合，因此通过与 SRAP 结构域的融合，进一步将名为 AID-CGBE 的 C-to-G 碱基编辑器 (使得 AID 取代了本编辑器中的 APOBEC1) 工程为 AID-CGBE-FH2。然后在 SRAP 域上进行了一轮蛋白质进化，得到的 AID-CGBE-SRAP-K89F-Q235K (AID-CGBE-FH3) 被证明在不影响 C-G 编辑效率的情况下显著减少了缺失和模板插入。

OBEC protein family: united by structure, divergent in function[J]. Trends in biochemical sciences, 2016, 41(7): 578-594.

[5] Boström K, Garcia Z, Poksay K S, et al. Apolipoprotein B mRNA editing. Direct determination of the edited base and occurrence in non-apolipoprotein B-producing cell lines[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(36): 22446-22452.

[6]Grünewald J, Zhou R, Garcia S P, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors[J]. Nature, 2019, 569(7756): 433-437.

[7]Zuo E, Sun Y, Wei W, et al. Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos[J]. Science, 2019, 364(6437): 289-292.

[8]Kurt I C, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. Nature biotechnology, 2021, 39(1): 41-46.

[9]Park S H, Beal P A. Off-target editing by CRISPR-guided DNA base editors[J]. Biochemistry,

- 2019, 58(36): 3727-3734.
- [10] Ye L, Zhao D, Li J, et al. Glycosylase-based base editors for efficient T-to-G and C-to-G editing in mammalian cells[J]. Nature biotechnology, 2024, 42(10): 1538-1547.
- [11] Oakes B L, Fellmann C, Rishi H, et al. CRISPR-Cas9 circular permutants as programmable scaffolds for genome modification[J]. Cell, 2019, 176(1): 254-267. e16.
- [12] Mohni K N, Wessel S R, Zhao R, et al. HMCES maintains genome integrity by shielding abasic sites in single-strand DNA[J]. Cell, 2019, 176(1): 144-153. e13.
- [13] Tong H, Wang X, Liu Y, et al. Programmable A-to-Y base editing by fusing an adenine base editor with an N-methylpurine DNA glycosylase[J]. Nature biotechnology, 2023, 41(8): 1080-1084.
- [14] Kurt I C, Zhou R, Iyer S, et al. CRISPR C-to-G base editors for inducing targeted DNA transversions in human cells[J]. Nature biotechnology, 2021, 39(1): 41-46.
- [15] Chen L, Park J E, Paa P, et al. Programmable C: G to G: C genome editing with CRISPR-Cas9-directed base excision repair proteins[J]. Nature communications, 2021, 12(1): 1384.
- [16] Sun N, Zhao D, Li S, et al. Reconstructed glycosylase base editors GBE2. 0 with enhanced C-to-G base editing efficiency and purity[J]. Molecular Therapy, 2022, 30(7): 2452-2463.
- 作者简介: 林洁婧(2001-), 性别女, 民族汉, 籍贯福建莆田, 学位研究生, 职称, 研究方向基因编辑, 学校广州大学。
- 项目基金: 国家自然科学基金项目(82271909)