



腺嘌呤碱基编辑器及其临床应用*

王慧灵 陈雷 谷峰**

(湖南师范大学医学部, 模式动物与干细胞生物学湖南省重点实验室, 生殖与转化医学湖南省工程研究中心, 长沙 410013)

摘要 人类遗传病致病基因一半以上是点突变, 对其进行精确、高效的原位修复是遗传病治疗最理想的方式。鉴于点突变中大部分为鸟嘌呤(G)与腺嘌呤(A)之间的转换, 而基于CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas9) 系统的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)通过将A转换为G, 从而修复这些突变, 因此该种碱基编辑在人类遗传病治疗中特别重要。近年来, ABE不断被优化, 特别是碱基编辑器的活性和保真性均被提高。本文总结了有关ABE的研究进展, 特别是ABE研发过程中重要的突变体, 同时对现有ABE仍然存在的缺陷进行了思考。另外, 对ABE在临床(含临床前研究)方面的相关应用也进行了回顾。本文为发现和优化新型ABE及其应用提供参考。

关键词 腺嘌呤碱基编辑器, 基因治疗, CRISPR/Cas9技术
中图分类号 Q812

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0345

基因治疗在人类遗传疾病的治疗中扮演着重要的角色。从锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)和转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)等工程化的内切酶^[1], 到最新发现的与细菌和古细菌抗病毒免疫相关的CRISPR/Cas9系统, 研究者们不断探索通过基因编辑来实现基因治疗, 以治愈疾病。CRISPR/Cas9基因编辑系统于2012年被报道, 由于其构建简单、成本低且编辑效率高, 目前已广泛应用于多种物种的基因组改造^[2]。无论是ZFNs、TALENs还是CRISPR/Cas9系统, 均通过对特定基因组位点进行识别并产生DNA双链断裂(double strand break, DSB), 来启动DNA的自我修复。这些修复途径包括同源定向修复(homology-directed repair, HDR)、微同源介导的末端连接(microhomology-mediated end joining, MMEJ)和非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)^[3]。需要指出的是, HDR效率极低并且需要供体模板, 而NHEJ可能导致不必要的插入和缺失(insertion and deletion, indels)^[4], 这大大限制了CRISPR/Cas9技术在治疗人类疾病方面的发展。为了克服该问题, 科研人员建立了基于CRISPR/Cas9系统的碱基编辑技术。碱基编辑技术使用单指导RNA(single

guide RNA, sgRNA)、Cas9蛋白和脱氨酶来进行碱基编辑, 这不仅精确且大大减少了插入缺失突变(indels)的产生。基于此技术, 多种碱基编辑器被陆续报道, 例如: 诱导胞嘧啶(C)向尿嘧啶(U)突变的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)、诱导A到G突变的腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE), 以及诱导C到G突变的CG碱基编辑器(C-to-G base editor, CGBE)等。目前, 根据ClinVar数据库, 48%的人类遗传病致病性点突变是由G•C到A•T的突变引起的。因此, ABE在遗传病治疗方面显示出明显优势。基于CRISPR/Cas9系统的ABE由来自大肠杆菌的腺苷脱氨酶——TadA, 加上sgRNA以及nCas9/dCas9(nickase Cas9/dead Cas9)组成, 能够实现A到G的编辑。尽管ABE具有明显治疗疾病的前景, 但其低编辑活性、脱靶效应(含旁观者编辑(bystander edit))以及原间隔序列邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)限制等问题制约着其应用^[5]。为了解决这些问题, 研究人员研

* 国家科技重大专项(2023ZD0500502), 国家自然科学基金(82271910)和湖南省自然科学基金(2024JJ3024)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-88912412, E-mail: fgu@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2024-07-26, 接受日期: 2024-09-09

发和优化了ABE，由此产生了一系列ABE突变体。

1 ABE的机制

CRISPR 相关蛋白 Cas9 具有两个活性切割结构域——RuvC 和 HNH。RuvC 切割非靶向链，HNH 切割靶向链。ABE 的原理是将 Cas9 蛋白的两个或其中一个切割结构域失活，形成 dCas9 或 nCas9 [6]，

再融合定向进化的 TadA。在 sgRNA 的指导下，将目标腺嘌呤（A）转化为次黄嘌呤（I），随后细胞进一步识别为鸟嘌呤（G），从而实现 A 到 G 的突变（图 1）。dCas9 由于 RuvC 和 HNH 的双重失活，从而仅有靶向功能而无切割活性；而 nCas9 由于仅一个结构域失活，保留了切割单条链的活性，可促使修复以编辑链为模板，从而提升编辑效率。

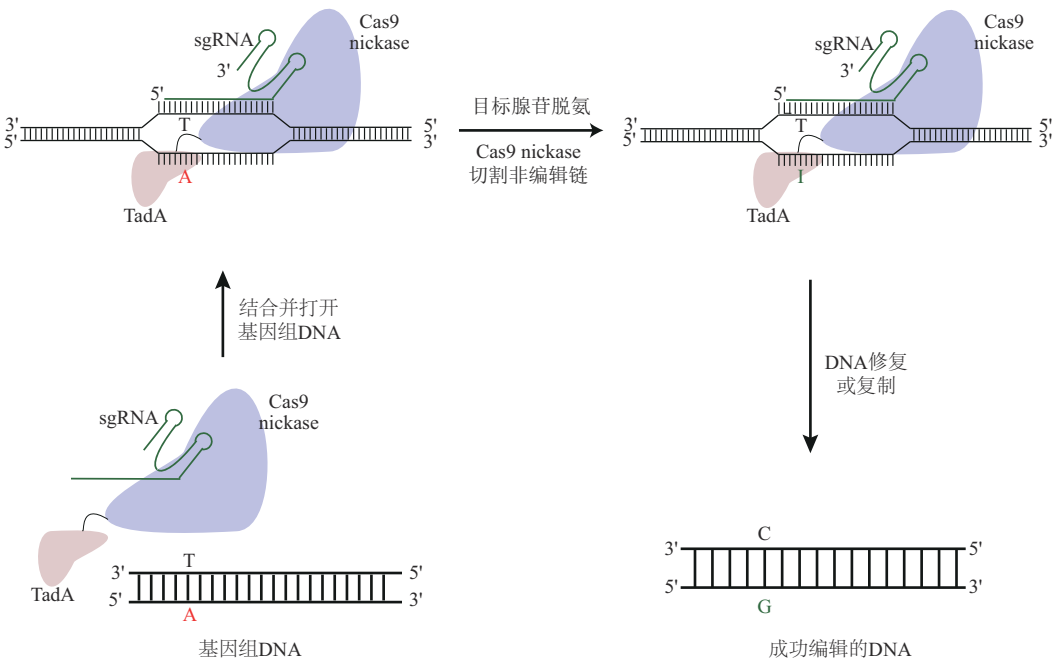


Fig. 1 Adenine base editor principle

图1 腺嘌呤碱基编辑器原理

sgRNA，单指导RNA；Cas9 nickase，Cas9缺口酶；TadA，腺苷脱氨酶。sgRNA引导TadA-dCas9复合物靶向目标DNA序列，其中dCas9将目标序列解旋并切割非编辑链，TadA诱导非靶向链A到I突变，细胞修复机制将I错认为G，并在此基础上继续修复，从而实现A到G的编辑。

2 ABE的研究进展

早期的 ABE 面临着编辑活性低、PAM 限制以

及脱靶效应等问题，为了解决这些问题，研究人员在 TadA 和 Cas9 等方面对其进行了不同的优化，产生了多种不同的突变体（表1）。

Table 1 Evolutionary characteristics of TadA in adenine base editors

表1 腺嘌呤碱基编辑器中TadA的进化

ABE种类	TadA进化特点	编辑活性	脱靶编辑	参考文献
ABE7.10	由ecTadA7进化而来	50%	脱靶编辑水平低于ABE8e	[7]
ABEmax	在ABE7.10的基础上进化	比ABE7.10高1.3~7.9倍	在RNA水平上的脱靶编辑范围为10%~80%	[8]
ABE8e	在TadA7.10的基础上通过PANCE/PACE进化而来	18%~86%	脱靶编辑水平高于ABE7.10	[9]
ABE8s	在ABE7.10的基础上进化	在NGG-PAM位点，与ABE7.10相比，ABE8在原间隔位置A5-A7的编辑提高了约1.5倍，在A3-A4和A8-A10的位置的编辑提高了约3.2倍		[10]

续表1

ABE种类	TadA进化特点	编辑活性	脱靶编辑	参考文献
PhieABE	TadA突变体和单链DNA结合结构域 (DBD) 融合	hyABE8e-NG (TadA8e与DBD融合) 编辑活性为67.8%	hyABE8e-NG平均脱靶编辑接近于0%	[11]
SpRY-ABE8eF148A	SpRY与F148A突变的TadA8e结合	在HEK293T细胞中的编辑效率为50.73%，在HeLa细胞中的编辑效率为42.57%	与SpRY-ABE8e相比，虽然SpRY-ABE8eF148A略微降低了总RNA脱靶SNV数，但显著降低了A到G的RNA脱靶编辑频率	[12]
hyABE	将ABE8e与Rad51 DNA结合域融合	43.0%~94.6%	hyABE和ABE8e之间的平均RNA脱靶编辑效率相似，但hyABE诱导的RNA脱靶事件略多于ABE8e	[13]
apt-ABE8e	用一个含93个氨基酸的连接子将Com融合到TadA8e的N端	该构建体在HIRA和RNF2位点的编辑效率是ABE8e-NG编辑效率的 (77.7±19.3)% 和 (46.1±10.4)%		[14]
NG-ABEmax-KR	结合NG-ABEmax-R和NG-ABEmax-K (TadA结构域N127K突变，TadA*结构域Q154R突变)	40.87%~64.22%	与NG-ABEmax相比，NG-ABEmax-KR的RNA脱靶编辑少量增加	[3]
ABE9	在TadA8e的基础上引入额外的L145T突变	36.08%~62.41%	诱导极小的RNA脱靶效应以及无法检测的Cas9非依赖性DNA脱靶效应	[15]
iABE-NGA	将A56G突变添加到miniABE (V82G)-NG (用TadA* (V82G) 取代ABE-NG中的腺嘌呤脱氨酶二聚体 (ecTadA-ecTadA*))	高于60%，但较ABE8e低	脱靶RNA编辑接近于无	[16]
NG-ABE9e	携带R111T/N127K/Q154R突变体	NG-ABE9e在几乎所有A7位点上的编辑效率都比NG-ABEmax高	与NG-ABE8e相比，NG-ABE9e在测试位点的脱靶编辑降低	[17]
ABE8r	大肠杆菌TadA五轮定向进化	(65.1±11.8)%；在AA、GA和CA环境中，ABE8r的表现与ABE8e相当或优于后者	比ABE7.10产生更多的gRNA依赖性脱靶编辑；非依赖性gRNA脱靶效低于ABE8e	[18]
TaC9-ABE	nCas9与TadAwt*-TALE融合 (TadAwt*催化结构域从ABE7.10转移到TALE)	碱基编辑效率与ABE7.10相似甚至更高	TaC9-ABE可以完全消除Cas9依赖性的脱靶，而不以任何靶向效率为代价	[19]
mitoABE	通过TALE-TadA8e-V106W和TALE缺口酶的组合	mitoABENt.BspD6I(C)在其中一些位点的编辑效率高达40%	脱靶风险较DdCBE低的多	[20]

PANCE/PACE: 噬菌体辅助的非连续/连续进化 (phage-assisted non-continuous/continuous evolution); DBD: DNA结合域 (DNA-binding domains); SNV: 单核苷酸变异 (single nucleotide variation)。

2.1 腺苷脱氨酶 (TadA) 的演变

在ABE被研发之前，研究人员将胞苷脱氨酶与dCas9或nCas9融合，并在尿嘧啶糖基化酶抑制剂 (uracil glycosylase inhibitors, UGI) 的参与下，由sgRNA引导实现胞嘧啶的编辑，即CBE^[15]。基于CBE的构建策略，理论上构建ABE只需将胞苷脱氨酶换成腺苷脱氨酶 (细胞内次黄嘌呤切除率远低于尿嘧啶，无需次黄嘌呤的相关糖基化酶抑制剂参与^[6])。然而，自然界中并不存在天然的单链DNA腺苷脱氨酶^[21]，刘如谦团队^[7]于2017年通过对大肠杆菌TadA进行7轮定向进化，生成了

TadA7.10，该突变体能够进行单链DNA腺苷脱氨。此后，为进一步优化编辑活性，该团队于2018年在ABE7.10的基础上研发了ABEmax^[8]，并于2020年在TadA7.10的基础上额外引入8个突变，成功构建了ABE8e^[9]，其编辑活性显著提高。同样，2020年，Gaudelli团队^[10]在ABE7.10的基础上演化出了ABE8s。从ABE7.10到ABEmax、ABE8e以及ABE8s，编辑器的编辑活性和脱靶效应等问题不断得到改善。

2.1.1 大肠杆菌TadA的进化

2021年，周焕斌团队^[22]将V82S和Q154R突

变整合到 TadA8e 中, 生成了新的突变体——TadA9。与 TadA8e 相比, TadA9 在编辑活性上类似, 但其编辑窗口有所扩大。TadA9 能够与 CRISPR/SpCas9、CRISPR/SpCas9-NG 和 CRISPR/SpRY 以及 CRISPR/ScCas9 缺口酶系统广泛兼容。2021 年, 祝钦洸团队^[11]开发了一种 ABE 工具箱 (PhieABE), 将进化的高活性 TadA8e 与单链 DNA 结合结构域 (DNA-binding domains, DBD) 融合, 分别适配 SpCas9、SpCas9-NG、SpG 和 SpRY 对应的缺口酶突变体。结果表明, DBD 不仅增强了靶向活性, 还降低了脱靶。2022 年, Li 等^[12]通过结合 PAM-less SpRY 核酸酶与 F148A 突变的 TadA8e, 开发出新的编辑器 SpRY-ABE8e^{F148A}。与 SpRY-ABE8e 相比, SpRY-ABE8e^{F148A} 缩小了编辑窗口, 显著降低了 A 到 G 的 RNA 脱靶单核苷酸变异。2022 年, 秦伟团队^[23]生成了 SpRY 介导的腺嘌呤碱基编辑器 zSpRY-ABE8e 并应用于斑马鱼研究。zSpRY-ABE8e 在斑马鱼中显示, A 到 G 的编辑效率最高达 96%。2023 年, 张晓辉团队^[13]通过将 ABE8e 与 Rad51 DNA 结合域融合, 产生了超活性 ABE (hyABE)。该工具在 PAM 附近 (A10-A15) 区域提供了更高的 A 到 G 的编辑效率, 与 ABE8e 相比提高了 1.2~7 倍。hyABE 在规范编辑窗口内的 A 到 G 编辑效率也与 ABE8e 相当。2024 年, Komor 团队^[14]用一个含 93 个氨基酸的连接子, 将一个命名为 Com 的结构融合到 TadA8e 的 N 端 (Com_93-AA_TadA8e)。该构建体在 HIRA 位点的编辑效率为原始 ABE8e-NG 编辑效率的 (77.7±19.3)%, 在 RNF2 位点为原始效率的 (46.1±10.4)%。他们将这一突变体命名为 apt-ABE8e。

2021 年, 笔者所在团队首先建立了基于人类细胞的 ABE 活性评估系统并发现了多个高活性的突变体, 其中包括 NG-ABEmax-R 和 NG-ABEmax-K 突变体, 在此基础上, 构建出 NG-ABEmax-KR (在 TadA 结构域中引入 N127K 突变, 在 TadA* 结构域中引入 Q154R 突变)。NG-ABEmax-KR 在规范编辑窗口内的平均活性提高了 1.1~5.4 倍, 活性范围为 40.87%~64.22% (相比之下, NG-ABEmax 的活性为 7.6%~60.27%)。与 NG-ABEmax 相比, NG-ABEmax-KR 显示出更强的编辑活性 (类似于 ABE8s) 以及更广泛的编辑窗口^[3]。Jeong 等^[24]发现, D108Q 突变降低了 ABE7.10、ABE8e 和 ABE8s 的胞嘧啶脱氨活性, 与 V106W 突变联合能够减少脱靶 RNA 编辑。此外, P48R 突变增加了 ABE7.10

的胞嘧啶脱氨活性, 且显著降低了腺嘌呤编辑率。2022 年, 李大力团队^[15]发现, 带有 N108Q 突变的 ABE8e 能够减少腺嘌呤和胞嘧啶的旁观者编辑, 通过引入额外的 L145T 突变, 构建了 ABE9。ABE9 展示了极小的 RNA 脱靶效应, 并未检测到明显的 Cas9 非依赖性的 DNA 脱靶效应。ABE9 的编辑活性高于 ABE7.10, 虽然略低于 ABE8e, 但显著减少了腺嘌呤旁观者编辑, 并将编辑窗口缩小至 1~2 个核苷酸, 但活性有部分丢失。2021 年, HAN 团队^[16]用 TadA* (V82G) 取代 ABE-NG 中的腺嘌呤脱氨酶二聚体 (ecTadA-ecTadA*) 构建出 miniABE(V82G)-NG, 之后为提高 ABE-NG 的编辑效率和特异性, 在 miniABE(V82G)-NG 中添加 A56G 突变, 生成了 miniABE(GG), 并将其与 nCas9-NGA 结合形成 iABE-NGA。虽然 miniABE(GG) 的编辑效率低于 ABE8e, 但其旁观者编辑显著低于 ABE8e。2022 年, 笔者所在团队通过在 TadA8e 中引入 R111T/N127K/Q154R 突变, 构建了 NG-ABE9e。NG-ABE9e 在不同的基因组背景和细胞环境中表现出更窄的编辑窗口和更低的旁观者编辑, 从而优化了基因编辑工具的特异性和安全性。NG-ABE8e 编辑 A3 至 A12 窗口, 而 NG-ABE9e 仅编辑 A4 至 A7 窗口。当疾病突变位于 A7 时, NG-ABE9e 是首选碱基编辑器^[17]。2024 年, 汤玮欣团队^[18]通过对大肠杆菌 TadA 进行五轮定向进化, 生成了 TadA8r。TadA8r 的脱氨活性扩展至 RA (R=A 或 G), 比 TadA8e 更快速地处理 GA。ABE8r 在无 TA 偏好的情况下显著缩小了活性差距, 在 AA、GA 和 CA 环境中与 ABE8e 表现相当, 甚至优于后者。

2.1.2 转录激活因子样效应蛋白 (transcription activator like effector, TALE) 与 TadA 突变体的融合

2022 年, 邹庆剑团队^[19]将 ABE7.10 中的 SpCas9 (D10A) 替换为 TALE, TALE 可识别目标 DNA 序列但无解螺旋功能, 然后将 nSpCas9 (D10A) 与 TadAwt*-TALE 融合, 形成了 TaC9-ABE, 该突变体显示出与 ABE7.10 相似甚至更高的碱基编辑效率。TaC9-ABE 能够完全消除 Cas9 依赖性的脱靶效应, 而不降低靶向编辑效率。2024 年, 魏文胜团队^[20]将 TALE-TadA8e-V106W 与 MutH 缺口酶 (MutH 为大肠杆菌编码的序列特异性缺口酶) 组合, 构建了 mitoABE^{MutH}, 实现了高效的靶向 A 到 G 的线粒体 DNA 编辑, 从而为多种线粒体疾病

的基因治疗提供了新的希望。该团队还生成了MutH突变体——MutH*, 只需要5'-GAT-3'即可激活其切割活性, 大大扩展了mitoABE^{MutH}的mtDNA编辑范围。他们进一步发现, Nt.BspD6I(C)是几乎不受任何识别序列限制的酶, 进一步扩大了mitoBEs的靶标范围。

2.2 Cas9的发展

目前, 研究人员最常用的Cas9突变体主要包括化脓性链球菌来源的SpCas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) 和金黄色葡萄球菌来源的SaCas9 (*Staphylococcus aureus* Cas9)。其中, SaCas9具有尺寸较小和活性高等优点^[25], 然而, 脱靶效应和PAM序列限制其应用。为此, 研究人员不断优化Cas9, 产生了一系列突变体。基于SaCas9的突变体包括KKH-SaCas9和efSaCas9 (enhanced-fidelity SaCas9)^[26-27]; 基于SpCas9的突变体包括SpCas9-VQR/EQR/VRER、xCas9 3.7、SpCas9-NG、SpCas9-NRRH/NRCH/NRTH 以及 PAM-less SpRY^[28-32]。随着这些Cas9突变体的优化, PAM限制也逐渐被解决, 脱靶编辑越来越少。

2.2.1 Cas9突变体的进展

在2020年, 张勇团队^[25]使用工程化的SpRY突变体在水稻和大河落叶松上松弛的PAM位点进行基因组编辑。SpRY能够在水稻转基因系中通过NHEJ机制实现高效靶向诱变。此外, 他们基于ABE8e开发了一种高活性的SpRY腺嘌呤碱基编辑器 (SpRY-ABE8e), 对水稻中的PAM位点实现了高达79%的编辑效率且产品纯度高。在2022年, Welker团队^[33]开发了提高保真度的第一代SpCas9突变体, 但这些突变体的保真度提升是以牺牲活性为代价的。结构分析表明, RuvC结构域的一个柔性环稳定了目标DNA-sgRNA杂交螺旋的扭曲端, 允许即使存在不匹配情况也能激活SpCas9。通过破坏这些错配稳定的相互作用以及合理的突变, 他们开发了保真度更高的SpCas9突变体, 如SpCas9-HF和Hypa-SpCas9。新一代突变体名为SuperFi-Cas9, 与第一代突变体相比, 尽管活性显著降低, 但保真度更高。当与高活性的ABE8e结合时, SuperFi-Cas9能实现高效且特异性的DNA编辑, 同时减少了旁观者编辑和SpCas9依赖性的脱靶碱基编辑。

2.2.2 Cas9结构的进化

2019年Huang等^[34]描述了SpCas9中的循环排列碱基编辑器。类似地, 在SpCas9中工程化碱基

编辑器的结构域镶嵌变体已经报道^[35]。2020年, Hewitt团队^[36]通过对循环排列 (circularly permuted) 和结构域嵌入 (domain-inlaid) 的Cas9碱基编辑器的分析, 发现ABE的异常RNA脱靶效应可以根据其整体二级结构和与SaCas9的空间关系进行调节。该团队比较了循环排列和结构域嵌入的Cas9碱基编辑器的编辑特征, 发现结构域嵌入后仍然可以实现靶向编辑。之后, 他们通过结构指导设计了含SaCas9的ABE突变体microABE I744, 与N端连接的SaCas9 ABE突变体相比, 结构域嵌入的突变体显著提高了靶向编辑效率并减少了RNA脱靶。microABE I744的大小为3.8 kb, 适应腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 载体的限制, 并具有足够的包装空间容纳启动子及其同源引导序列。在2021年, Schwank及其团队^[37]开发了新型腺嘌呤碱基编辑器HNHx-ABE, 通过用单体或异二聚体TadA替换SpCas9的HNH核酸酶结构域, 扩大了编辑窗口。HNHx-ABE8e在转染细胞后5 d编辑效率高达19.8%, 7 d达到40.4%^[37]。在2023年, 科学家们开发了一种精度更高、尺寸更小且具有PAM近端移位编辑窗口的新型ABE——sABE。通过删除SpCas9的REC2和HNH结构域, 该突变体显著降低了脱靶编辑, 提高了精度, 并有更宽的PAM编辑窗口^[38]。在2024年, Sontheimer小组^[39]通过结构域嵌入改造了来源于脑膜炎奈瑟菌的Nme2Cas9 (*Neisseria meningitidis*-2 Cas9) 的碱基编辑器 (Nme2-ABE), Nme2-ABE尺寸较小支持单个AAV递送, 且具有最少碱基的PAM, 通过改造后其编辑活性和靶向范围也进一步增加。

2.2.3 Cas9种类的发展

为突破PAM序列的限制, 研究人员开发了多种其他类型的Cas9。2021年, 吉林大学的研究人员发现来源于巴氏链球菌的SpaCas9 (*Streptococcus pasteurianus* Cas9) 能够靶向5'-NNGYRA-3' PAM, 且其尺寸比传统的SpCas9小, 通过AAV一体化递送, 能在成年小鼠中实现高效的基因组编辑^[40]。鉴于AAV递送限制, 刘如谦团队^[41-42]于2022年开发了一系列小尺寸且具有广泛PAM兼容性的ABE, 这些ABEs分别融合来源于空肠弯曲杆菌的CjCas9 (*Campylobacter jejuni* Cas9)、来源于脑膜炎奈瑟菌的Nme2Cas9以及来源于耳氏葡萄球菌的SauriCas9 (*Staphylococcus auricularis* Cas9) 的切口酶, 扩展了靶向范围并能

够对人类基因组中约82%的腺嘌呤进行编辑。在2024年,王永明等^[43]科学家构建了一种能够识别NNG PAM的来源于路邓葡萄球菌的*SlugCas9* (*Staphylococcus lugdunensis* Cas9)的突变体,命名为*SlugCas9*-NNG。此突变体是通过对*SlugCas9*进行两轮进化而获得的。在对*SlugCas9*-NNG的特异性进行检测后,发现其脱靶编辑的频率为*SpCas9*>*SlugCas9*>*SlugCas9*-NNG。这表明,突变不仅扩展了PAM的识别范围,还降低了错配耐受性。随后,研究团队将*TadA8e*与*SlugCas9*-NNG的切口酶融合,形成了*SlugABE*-NNG。该编辑工具的最佳编辑窗口为6~12。*SlugABE*-NNG能够适应NNGN-PAM靶点,具有较宽的编辑窗口,从而扩展了目标范围,但也增加了旁观者编辑的风险。同年,张勇研究团队^[44]研究了来源于啮齿类动物的*FrCas9* (*Faecalibaculum rodentium* Cas9)在植物基因组编辑中的应用,尤其是在水稻中。*FrCas9*能够识别5'-NNTA-3' PAM,并在植物基因组中(特别是在富含回文TA位点的区域)表现出比*SpCas9*更高的编辑效率。

2.3 ABE的其他发展

2.3.1 基于Cas12f的ABE

2022年, Kim团队^[41]发现,针对Cas12f突变体,工程化的sgRNA表现出了高效的可编程核酸内切酶活性,这项技术被称为基于TnpB (transposon-associated transposase B)增强型RNA的基因组编辑技术(TnpB-augment RNA-based genome editing technology, TaRGET)。研究表明,密码子优化的*Tad*-*Tad*** (引入V106 W、D108 Q突变, WQ)结构的A到G的编辑率最高。随后,他们构建了基于TaRGET的ABE——TaRGET-ABE-C3.0。TaRGET-ABE-C3.0的碱基编辑窗口相对较窄,类似于ABEMINI,但总编辑效率显著高于基于dCas12f的ABEMINI^[45],但低于基于*nSpCas9*的ABEs (包括ABE7.10、ABE8e及ABE9)。该团队还将*Tad*-*Tad*8e (WQ)二聚体模块与dCWCas12f (D354A)融合,形成TaRGET-ABE-C3.1。测试显示,总编辑效率显著提升^[41]。值得注意的是, TaRGET-ABEs可通过AAV递送,且在4.7 kb的有限空间内仍可容纳其他功能组分。

2.3.2 调控版ABE

为解决ABE持续激活可能增加脱靶风险的问题,2023年, Zou等^[46]基于光遗传学原理,将光与遗传编码的光开关结合,构建了MAGA-ABE系

统。该系统展现出蓝光激活碱基编辑效率和低背景活性。MAGA-ABE不仅能够对增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 报告基因和多种内源基因进行高效编辑,还具有较高的时空精度,克服了化学诱导方法的局限性。

2023年, Wang等^[47]发现,将人类e18蛋白 (一种RING结构域E3泛素连接酶突变体)与ABE融合,可通过降低碱基编辑器蛋白质丰度显著提高编辑准确性并缩小编辑窗口。与传统ABE相比, ABE_{max}-e18和ABE_{8e}-e18的Cas9依赖性和非依赖性脱靶效应明显降低。此外, e18与ABE_{8e}的融合可有效减少ABE介导的胞嘧啶编辑,提高编辑产物纯度,并进一步缩小编辑窗口^[47]。

2.4 腺嘌呤碱基颠换编辑器

2.4.1 诱导A到C/T突变的碱基编辑器 (A-to-Y base editor, AYBE)

为克服常规ABE无法实现嘌呤到嘧啶颠换的限制,研究者开发了多种腺嘌呤碱基颠换编辑器。2023年,杨辉团队^[48]猜测,通过触发细胞内碱基切除修复 (base excision repair, BER) 途径, ABE诱导的脱氧腺苷的切除可能会得到更多碱基编辑结果,之后基于这一猜想该团队将ABE_{8e}与野生型人N-甲基嘌呤DNA糖基化酶 (methylpurine DNA glycosylase, MPG; 也称为烷基腺嘌呤DNA糖基化酶 (alkyladenine DNA glycosylase, AAG)) 融合,构建了AYBE (诱导A到C/T突变)。虽然AYBE的编辑活性和产物纯度还有待提到,但其能将A转化为所有其他类型的嘧啶碱基,适用于饱和诱变。其中, AYBE_{v3}在A7和A8位置表现出较高的A到Y颠换的编辑效率,而在其他A位置主要导致A到G的编辑。2023年,周焕斌团队^[49]开发了pAKBE系统,实现了水稻中高效的A到K (K=G/T) 碱基编辑。其中, rBE120 (*TadA9-SpRYn-MPGv3*) 在转基因水稻的三个靶标上诱导了64.29%~100%的A到G的突变。2024年,陆钰明团队^[50]对人源性MPG (hMPG) 和密码子优化的玉米MPG (maize MPG, MzMPG) 进行工程设计,将其融合到玉米腺嘌呤碱基编辑器ZmABE_{8e}的C端,构建了初始AYBE编辑器ZmAYBE_{v1} (诱导A到C/T突变)。随后,通过将hPolη和ZmPolη序列 (human and maize Polη) 纳入ZmAYBE_{v1}中,分别构建了ZmAYBE_{v2}和ZmAYBE_{v3}。在玉米胚胎中的测试显示, ZmAYBE_{v3}显著提高了A到T和A到C突变的编辑效率,其中ZmPolη的加入进一

步提升了A到Y的编辑效率。

2.4.2 诱导A到C突变的碱基编辑器 (A-to-C base editor, ACBE)

2023年,李大力团队^[51]将小鼠烷基腺嘌呤DNA糖基化酶(mouse alkyladenine DNA glycosylase, mAAG)与nCas9和脱氨酶TadA-8e融合,构建了ACBE系统,可在特定序列背景下催化腺嘌呤转化为胞嘧啶。ACBEs(包括高精度的ACBE-Q)表现出最小的Cas9非依赖性脱靶效应。在评估的所有靶标中,引入N108Q突变的ACBE-Q将脱靶编辑降低到接近背景水平(平均<0.3%)。此外,高通量测序数据显示,与AYBEv3相比,ACBE-Q表现出相似的A到C的编辑活性,但大大减少了A到G的旁观者编辑^[51]。

3 ABE在疾病治疗中的应用

3.1 ABE在血液病治疗中的应用

3.1.1 β 地中海贫血和镰状细胞病

β 地中海贫血(beta-thalassemia, BT)是全球最常见的遗传性疾病之一,由 β 球蛋白基因突变引起。IVS1-110(G>A)是中东和地中海地区BT最普遍的突变之一,导致 β 球蛋白表达显著降低。在BT中, β 球蛋白产生不足引起未配对的 α 球蛋白链过量积累,进而导致严重溶血和潜在致命的并发症。2023年,Hardouin等^[4]利用SpRY-ABE8e碱基编辑器成功纠正了IVS1-110(G>A)突变,在复合杂合子中修复了 $\beta^{IVS1-110(G>A)}$ 等位基因,显著改善了红细胞生成。同年,Liao等^[52]通过诱导胎儿血红蛋白(HbF, $\alpha_2\gamma_2$)的产生,治疗了输血依赖性 β 地中海贫血(transfusion-dependent β -thalassemia, TDT)。他们利用ABE8e-SpRY RNP直接纠正患者来源的CD34⁺造血干细胞中的HbE(G>A)和IVS II-654(C>T)突变。

镰状细胞病(sickle cell disease, SCD)是一种由 β 球蛋白基因(*HBB*)突变引起的常染色体隐性遗传病。*HBB*通常编码成人 β 球蛋白,在低氧条件下,突变的 β 珠蛋白导致红细胞内血红蛋白聚合,形成特征性的镰状红细胞,引发红细胞镰状变形、慢性溶血和血管闭塞等^[53]。2021年,刘如谦团队^[54]使用ABE8e-NRCH将SCD等位基因(*HBB*^S)转化为非致病性的Makassar β 珠蛋白(*HBB*^G)突变体。将编码碱基编辑器的mRNA与靶向sgRNA在体外传递到SCD患者的造血干细胞和祖细胞(hematopoietic stem and progenitor cells,

HSPCs)后,80%的HBB发生转化。接受编辑的小鼠与未编辑的对照组相比,血液学参数接近正常且脾脏病理得到改善。

SCD和BT均由*HBB*基因突变引起,该基因编码成人血红蛋白(HbA, $\alpha_2\beta_2$)的 β 珠蛋白亚基^[55]。随着胎儿 γ 珠蛋白基因(*HBG1/HBG2*)表达转变为突变的 β 珠蛋白(HBB),这些疾病在出生后逐渐显现症状^[56]。2023年,Mayuranathan等^[57]使用优化的ABE8e修饰体外分化的CD34⁺细胞。编辑来自健康供体的CD34⁺造血干细胞中 γ 球蛋白-175A>G后显示,ABE7.10的编辑效率为(36 $\pm$ 11)%,ABE8e的编辑效率为(56 $\pm$ 9)%。

3.1.2 范可尼贫血

范可尼贫血(Fanconi anemia, FA)是一种严重的遗传性疾病,主要特征包括发育异常、癌症易感性和骨髓衰竭。该疾病由参与FA/BRCA DNA损伤修复途径的22个基因中任一基因突变引起^[58]。2022年,Corn团队^[59]通过优化碱基编辑,成功恢复了*FANCA*基因的表达、FA通路的分子功能以及对交联剂的抗性。在经编辑的FA-55淋巴母细胞系(lymphoblastoid cell lines, LCLs; FA-55携带*FANCA*基因纯合突变(c.295C>T))中,研究人员观察到*FANCA*蛋白重新表达、FA通路重新激活的分子证据,以及相比未编辑细胞显著的增殖优势。

3.2 ABE在遗传性眼病治疗中的应用

Leber先天性黑蒙(Leber congenital amaurosis, LCA)是儿童遗传性失明的主要原因之一,特征为进行性视网膜变性和视力丧失。*RPE65*基因编码视网膜色素上皮特异性65kDa蛋白(retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein, RPE65),该酶在视觉循环中将全反式视黄醇酯转化为11-顺式视黄醇^[60]。RPE65缺失突变会破坏视觉循环,导致视网膜色素变性。RPE65突变的LCA患者表现为锥体光感受器功能障碍和死亡,引起早期视力丧失。此外,Suh等^[61]在成年小鼠视网膜下注射表达ABE和sgRNA的慢病毒,针对Rpe65基因无义突变进行纠正,效率达29%,且indels和脱靶编辑最小化。经ABE处理的小鼠Rpe65逐渐表达以及类维甲酸异构酶活性恢复,视网膜和视觉功能接近正常水平。2022年,该团队进一步研究了碱基编辑进行了分子治疗。他们通过视网膜下注射将ABE和sgRNA导入rd12 *Gnat1*^{-/-}小鼠^[62]。rd12小鼠模型由于RPE65缺陷,它的锥体

光感受器早期便快速退化、锥体视蛋白也显示定位错误。由于锥体死亡在rd12小鼠中显著且迅速地发生,因此rd12小鼠可以作为评估碱基编辑对锥体保护有效性的理想模型^[62]。

类似地, Leber先天性黑蒙16型(LCA16)是一种罕见的儿童遗传性失明疾病,由KCNJ13基因点突变所引起。这种突变导致视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)钾通道(Kir7.1)功能丧失,而Kir7.1通道对维持RPE和光感受器健康至关重要^[63]。2023年Pattnaik团队^[64]研究表明,使用二氧化硅纳米胶囊(silica nanocapsules, SNCs)将编码ABE8e的mRNA传递到RPE,有效校正了KCNJ13^{W53X/W53X}突变。患者成纤维细胞和人诱导多能干细胞来源的RPE的编辑效率分别达到47%和17%,同时显示出最小的脱靶效应。此外,在编辑后的LCA16-iPSC-RPE中检测到了功能性的Kir7.1通道。

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种常染色体隐性遗传病,其中一种类型由编码杆状磷酸二酯酶 β 亚基(β subunit of the rod phosphodiesterase, PDE6B)的基因突变所引起。rd10小鼠带有PDE6B基因突变。研究表明,在rd10小鼠模型中使用优化的双腺相关病毒系统递送腺嘌呤碱基编辑器(*SpRY*-ABE8e),可有效纠正神经视网膜中的致病性单核苷酸变异(single nucleotide variation, SNV),编辑效率高达49%^[65]。

3.3 ABE在代谢性疾病治疗中的应用

PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type-9) 基因是体内基因编辑的重要靶点之一,2021年,Kathiresan团队^[66]使用脂质纳米颗粒在体内递送ABE8.8,有效且精确地引入PCSK9功能缺失突变。研究发现,单次输注脂质纳米颗粒后,肝脏中PCSK9几乎完全消失。血液中PCSK9和低密度脂蛋白胆固醇水平分别降低了约90%和60%,这些变化在单剂量治疗后至少8个月内保持稳定。同年,Schwank团队^[67]探究了ABEs在小鼠和食蟹猕猴肝脏中降低血液低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)水平的有效性和安全性。他们使用脂质纳米颗粒将编码ABEmax的mRNA和靶向PCSK9的sgRNA递送入小鼠体内。结果显示,小鼠血浆PCSK9和LDL水平分别稳定降低了95%和58%,而猕猴血浆中这两项指标分别降低了32%和14%。值得注意的是,编码ABEmax的mRNA

被快速清除,且在基因组DNA中未检测到脱靶突变。

3.4 ABE在心脏病治疗中的应用

肥厚性心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)是一种原发性心肌疾病,发病率约为1/500。它会导致左心室肥厚、左心室体积减少和心肌纤维化增加。心脏肌球蛋白重链的显性错义致病变异可导致HCM^[68]。这种目前无法治愈的疾病会增加中风、心力衰竭和心源性猝死的风险。2023年,Seidman团队^[69]使用双AAV9载体将ABE8e递送入携带杂合子HCM致病性变异(肌球蛋白R403Q)的小鼠中。这种方法纠正了70%以上室心肌细胞的致病变异,从而防止小鼠HCM的形态学、组织病理学和分子特征发生。此外,肌球蛋白重链7(myosin heavy chain 7, MYH7)基因致病变异(pathogenic variant, PV)是一种常见且研究较清楚的变异^[68]。这些PVs通常是常染色体显性错义变异,导致致病性肌凝蛋白头并入心脏肌节,从而引起HCM能量消耗增加、高收缩性和疾病进展。Eric N. Olson等^[70]开发了ABEmax-VRQR和sgRNA系统,该系统可以在选定位点有效纠正人类PVs,同时使旁观者编辑和脱靶效应最小化。

*Scn5a*基因的致病变异可导致3型长QT间期综合征^[71],这是一种危及生命的遗传性疾病。2024年Qi等^[71]通过在*Scn5a*基因中引入T1307M致病变异,成功构建了长QT综合征3型小鼠模型。随后将靶向*Scn5a* T1307M PV的ABE通过AAV9-ABEmax递送至3型小鼠模型的心脏,突变的转录本几乎完全被纠正(mRNA高达99.20%,DNA高达61.77%)^[71]。

3.5 ABE在肿瘤治疗中的应用

TERT (telomerase reverse transcriptase) 基因编码产物为一种逆转录酶,该酶在染色体3'端添加六聚体重复序列^[72]。*TERT*编码区的体细胞突变在人类肿瘤中并不常见,但胚系中启动子和体细胞突变在多种人类癌症中比例较高,如83%的原发性胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)^[73]。这些突变主要发生在ATG起始位点-124和-146碱基对处的两个热点位置(分别为-124G>A和-146G>A;反义链为-124C>T和-146C>T)。这些突变为E26/ETS转录因子家族成员(包括ETS1和GABPA)创造了一个新的共识结合位点(GGAA),从而增强TERT启动子活性。2020年吕志民团队^[74]通过局部注射含CjCas9-ABE的AAV,

成功抑制了携带 TERT 启动子突变的脑肿瘤生长。2023 年, 该团队再次应用这一方法, 成功纠正了肝肿瘤中的 TERT 启动子突变。有趣的是, 突变纠正后, TERT 启动子活性和端粒酶活性均受到抑制, 导致 TERT 表达下降和细胞增殖减缓^[75]。

3.6 ABE在早衰综合征治疗中的应用

Hutchinson-Gilford 早衰症综合征 (Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS) 是由 *LMNA* 基因特定的点突变 (c.1824, C>T) 所导致, 这种突变使 RNA 错误剪接, 产生一种称为早衰素的有毒蛋白质, 进而诱导快速衰老^[76]。此外, 2020 年刘如谦团队^[77] 利用慢病毒递送 ABEmax-VRQR, 成功纠正了培养的早衰儿童纤维细胞和 HGPS 小鼠模型中的致病性 HGPS 突变。在患者来源的培养细胞中, 观察到约 90% 的基因组 DNA 得到有效修复, *LMNA* 转录本的致病性错误剪接得到改善, 早衰素蛋白含量减少, 细胞核形态恢复正常。2022 年 Eriksson 团队^[78] 使用非整合的慢病毒载体系统递送 ABEmax-VQR, 纠正 HGPS 小鼠皮肤中的 HGPS 突变。结果显示, 20.8%~24.1% 的皮肤细胞突变得得到校正。分娩后 4 周, HGPS 小鼠的皮肤表型得到改善, 并检测到早衰蛋白阴性的角质形成细胞簇。同时, 该突变在祖细胞和分化的皮肤细胞中均得到纠正。虽然小鼠和人类的皮肤存在差异, 但 HGPS 小鼠晚期的皮肤表型与 HGPS 患者相似, 因此该小鼠模型可作为研究该疾病治疗的疾病模型。

3.7 ABE在其他遗传病治疗中的应用

精氨酸琥珀酸裂解酶缺乏症 (arginine succinate lyase deficiency, ASLD) 是一种由精氨酸琥珀酸裂解酶 (arginine succinate lyase, *ASL*) 基因变异引起的隐性代谢疾病。*ASL* 在尿素合成过程中扮演关键角色, 负责分解精氨酸琥珀酸 (arginosuccinic acid, ASA)。严重的 *ASL* 突变可导致高氨血症、神经损伤, 甚至早期死亡^[79]。2024 年, Wartiovaara 团队^[80] 利用脂质纳米颗粒递送 ABE8e, 成功治疗了 ASLD。这种方法有效编辑了成纤维细胞中的 *ASL* 变异, 且没有明显的细胞毒性, 脱靶效应也极小。治疗后, ASA 水平显著下降至健康供体水平, 尿素循环功能得到恢复。

血色素沉着病 (hemochromatosis, HC) 是白种人中最常见的遗传性代谢疾病之一, 主要由 *HFE* 基因中的纯合子 C282Y 突变引起。这种突变导致 HFE 蛋白错误折叠, 进而无法定位到细胞膜。

因此, 突变的 HFE 蛋白无法与反式铁蛋白受体 1 和 2 相互作用, 最终引起全身铁超载。患者可能出现肝硬化、糖尿病和心肌病等症状^[81]。2022 年 Ott 团队^[81] 发现, 利用 AAV8 递送 ABE7.10 后, 成功纠正了小鼠 HFE 基因中的 C282Y (c.845G>A) 突变, 基因矫正率达到近 10%, 且血液和肝组织中的铁相关参数得到显著改善。

杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种致命的遗传性肌肉萎缩疾病, 由缺乏维持肌膜完整性的抗肌萎缩蛋白引起^[82]。2021 年 Olson 团队^[83] 利用 ABEmax-SpCas9-NG 修改抗肌萎缩蛋白的剪接供体位点。在源自人诱导多能干细胞的心肌细胞中, 他们成功实现了第 51 号外显子常见 DMD 缺失突变 (Δ Ex51) 的跳过, 从而恢复了抗肌萎缩蛋白的表达。

4 总结与展望

目前 ABE 技术越来越成熟, 但是不管是细胞中、胚胎中还是在体治疗, 高效精准编辑单个靶碱基仍然有挑战, 特别是旁观者编辑问题, 这些严重地限制着 ABE 的应用。除了编辑器本身可能需要进一步优化以外, 如何高效地递送到靶器官也是 ABE 介导的临床治疗中重要研究内容之一。为了更好地推进 ABE 在生命科学中应用, 不断强化新型 ABE 的研发是必需的。关于 ABE 的优化, 笔者认为有以下策略: 一方面对现有编辑器的改造, 对脱氨酶的定向进化, 利用不同识别靶序列的 Cas 家族成员; 另一方面, 通过宏基因组学结合 alphafold 深度挖掘新型脱氨酶和 Cas 家族成员也是很值得开展的工作。研发高效筛选高活性高保真 ABE 对应的平台对于研发新一代 ABE 非常重要。另外, 基于人类细胞的定向进化体系对于发现新型 ABE 以及开展人类临床试验意义重大。在靶向递送方面, 目前腺相关病毒、脂质纳米颗粒和病毒样颗粒是最重要的 ABE 递送系统, 基于人类细胞内蛋白质的递送也有报道, 但是如何满足临床的需求, 特别是如中枢神经系统相关疾病的治疗, 仍然是挑战性极强的研究。优化相关的递送系统自然是 ABE 临床应用最需要考虑的问题, 因为其关系着基因编辑的效率和脱靶性。综上所述, 新一代 ABE 有望成为基因编辑工具箱中的“利器”和“新质生产力”的代表, 最终这些革命性成果将为生物技术的变革提供有力的支持。

参 考 文 献

- [1] Cho S I, Lee S, Mok Y G, *et al.* Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, 2022, **185**(10): 1764-1776.e12
- [2] Jia K, Cui Y R, Huang S, *et al.* Phage peptides mediate precision base editing with focused targeting window. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1662
- [3] Fu J, Li Q, Liu X, *et al.* Human cell based directed evolution of adenine base editors with improved efficiency. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 5897
- [4] Hardouin G, Antoniou P, Martinucci P, *et al.* Adenine base editor-mediated correction of the common and severe IVS1-110 (G>A) β -thalassemia mutation. *Blood*, 2023, **141**(10): 1169-1179
- [5] Zhang C, Yang Y, Qi T, *et al.* Prediction of base editor off-targets by deep learning. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 5358
- [6] Anzalone A V, Koblan L W, Liu D R. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 824-844
- [7] 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. *Nature*, 2017, **551**(7681): 464-471
- [8] Koblan L W, Doman J L, Wilson C, *et al.* Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(9): 843-846
- [9] 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. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 883-891
- [10] Gaudelli N M, Lam D K, Rees H A, *et al.* Directed evolution of adenine base editors with increased activity and therapeutic application. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(7): 892-900
- [11] Tan J, Zeng D, Zhao Y, *et al.* PhieABEs: a PAM-less/free high-efficiency adenine base editor toolbox with wide target scope in plants. *Plant Biotechnol J*, 2022, **20**(5): 934-943
- [12] Li G, Cheng Y, Li Y, *et al.* A novel base editor SpRY-ABE8c^{F148A} mediates efficient A-to-G base editing with a reduced off-target effect. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2022, **31**: 78-87
- [13] Xue N, Liu X, Zhang D, *et al.* Improving adenine and dual base editors through introduction of TadA-8e and Rad51DBD. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 1224
- [14] Cowan Q T, Gu S, Gu W, *et al.* Development of multiplexed orthogonal base editor (MOBE) systems. *Nat Biotechnol*, 2024. DOI: 10.1038/s41587-024-02240-0
- [15] Chen L, Zhang S, Xue N, *et al.* Engineering a precise adenine base editor with minimal bystander editing. *Nat Chem Biol*, 2023, **19**(1): 101-110
- [16] Xu L, Zhang C, Li H, *et al.* Efficient precise *in vivo* base editing in adult dystrophic mice. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 3719
- [17] Tu T, Song Z, Liu X, *et al.* A precise and efficient adenine base editor. *Mol Ther*, 2022, **30**(9): 2933-2941
- [18] Xiao Y L, Wu Y, Tang W. An adenine base editor variant expands context compatibility. *Nat Biotechnol*, 2024, **42**(9): 1442-1453
- [19] Liu Y, Zhou J, Lan T, *et al.* Elimination of Cas9-dependent off-targeting of adenine base editor by using TALE to separately guide deaminase to target sites. *Cell Discov*, 2022, **8**(1): 28
- [20] Yi Z, Zhang X, Tang W, *et al.* Strand-selective base editing of human mitochondrial DNA using mitoBEs. *Nat Biotechnol*, 2024, **42**(3): 498-509
- [21] Neugebauer M E, Hsu A, Arbab M, *et al.* Evolution of an adenine base editor into a small, efficient cytosine base editor with low off-target activity. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(5): 673-685
- [22] Yan D, Ren B, Liu L, *et al.* High-efficiency and multiplex adenine base editing in plants using new TadA variants. *Mol Plant*, 2021, **14**(5): 722-731
- [23] Liang F, Zhang Y, Li L, *et al.* SpG and SpRY variants expand the CRISPR toolbox for genome editing in zebrafish. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 3421
- [24] Jeong Y K, Lee S, Hwang G H, *et al.* Adenine base editor engineering reduces editing of bystander cytosines. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(11): 1426-1433
- [25] Ren Q, Sretenovic S, Liu S, *et al.* PAM-less plant genome editing using a CRISPR-SpRY toolbox. *Nat Plants*, 2021, **7**(1): 25-33
- [26] Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, *et al.* Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat Biotechnol*, 2015, **33**(12): 1293-1298
- [27] Xie H, Ge X, Yang F, *et al.* High-fidelity SaCas9 identified by directional screening in human cells. *PLoS Biol*, 2020, **18**(7): e3000747
- [28] Kleinstiver B P, Prew M S, Tsai S Q, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 2015, **523**(7561): 481-485
- [29] Hu J H, Miller S M, Geurts M H, *et al.* Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, **556**(7699): 57-63
- [30] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, **361**(6408): 1259-1262
- [31] Miller S M, Wang T, Randolph P B, *et al.* Continuous evolution of SpCas9 variants compatible with non-G PAMs. *Nat Biotechnol*, 2020, **38**(4): 471-481
- [32] Walton R T, Christie K A, Whittaker M N, *et al.* Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, 2020, **368**(6488): 290-296
- [33] Kulcsár P I, Tálas A, Ligeti Z, *et al.* SuperFi-Cas9 exhibits remarkable fidelity but severely reduced activity yet works effectively with ABE8e. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6858
- [34] Huang T P, Zhao K T, Miller S M, *et al.* Circularly permuted and PAM-modified Cas9 variants broaden the targeting scope of base editors. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**(6): 626-631
- [35] Wang Y, Zhou L, Liu N, *et al.* BE-PIGS: a base-editing tool with deaminases inlaid into Cas9 PI domain significantly expanded the editing scope. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, **4**: 36
- [36] Nguyen Tran M T, Mohd Khalid M K N, Wang Q, *et al.* Engineering domain-inlaid SaCas9 adenine base editors with

- reduced RNA off-targets and increased on-target DNA editing. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4871
- [37] Villiger L, Schmidheini L, Mathis N, *et al.* Replacing the *Sp* Cas9 HNH domain by deaminases generates compact base editors with an alternative targeting scope. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021, **26**: 502-510
- [38] Qian Y, Wang D, Niu W, *et al.* A new compact adenine base editor generated through deletion of HNH and REC2 domain of *Sp*Cas9. *BMC Biol*, 2023, **21**(1): 155
- [39] Bamidele N, Zhang H, Dong X, *et al.* Domain-inlaid Nme2Cas9 adenine base editors with improved activity and targeting scope. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 1458
- [40] Liu Z, Chen S, Xie W, *et al.* Versatile and efficient *in vivo* genome editing with compact *Streptococcus pasteurianus* Cas9. *Mol Ther*, 2022, **30**(1): 256-267
- [41] Kim D Y, Chung Y, Lee Y, *et al.* Hypercompact adenine base editors based on transposase B guided by engineered RNA. *Nat Chem Biol*, 2022, **18**(9): 1005-1013
- [42] 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. *Nat Biomed Eng*, 2022, **6**(11): 1272-1283
- [43] Qi T, Wang Y, Yang Y, *et al.* Phage-assisted evolution of compact Cas9 variants targeting a simple NNG PAM. *Nat Chem Biol*, 2024, **20**(3): 344-352
- [44] He Y, Han Y, Ma Y, *et al.* Expanding plant genome editing scope and profiles with CRISPR-FrCas9 systems targeting palindromic TA sites. *Plant Biotechnol J*, 2024, **22**(9): 2488-2503
- [45] Zhang S, Song L, Yuan B, *et al.* TadA reprogramming to generate potent miniature base editors with high precision. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 413
- [46] Zou Q, Lu Y, Qing B, *et al.* Photoactivatable base editors for spatiotemporally controlled genome editing *in vivo*. *Biomaterials*, 2023, **302**: 122328
- [47] Wang Z, Yuan H, Yang L, *et al.* Decreasing predictable DNA off-target effects and narrowing editing windows of adenine base editors by fusing human Rad18 protein variant. *Int J Biol Macromol*, 2023, **253**(Pt 7): 127418
- [48] 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. *Nat Biotechnol*, 2023, **41**(8): 1080-1084
- [49] Wu X, Ren B, Liu L, *et al.* Adenine base editor incorporating the N-methylpurine DNA glycosylase MPGv3 enables efficient A-to-K base editing in rice. *Plant Commun*, 2023, **4**(6): 100668
- [50] Zhong D, Pan H, Li K, *et al.* Targeted A-to-T and A-to-C base replacement in maize using an optimized adenine base editor. *Plant Biotechnol J*, 2024, **22**(3): 541-543
- [51] 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. *Nat Biotechnol*, 2024, **42**(4): 638-650
- [52] Liao J, Chen S, Hsiao S, *et al.* Therapeutic adenine base editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 207
- [53] Brandow A M, Liem R I. Advances in the diagnosis and treatment of sickle cell disease. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 20
- [54] Newby G A, Yen J S, Woodard K J, *et al.* Base editing of haematopoietic stem cells rescues sickle cell disease in mice. *Nature*, 2021, **595**(7866): 295-302
- [55] Frangoul H, Altshuler D, Cappellini M D, *et al.* CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *N Engl J Med*, 2021, **384**(3): 252-260
- [56] Taher A T, Musallam K M, Cappellini M D. β -Thalassemias. *N Engl J Med*, 2021, **384**(8): 727-743
- [57] Mayuranathan T, Newby G A, Feng R, *et al.* Potent and uniform fetal hemoglobin induction via base editing. *Nat Genet*, 2023, **55**(7): 1210-1220
- [58] Altintas B, Giri N, McReynolds L J, *et al.* Genotype-phenotype and outcome associations in patients with Fanconi anemia: the national cancer institute cohort. *Haematologica*, 2023, **108**(1): 69-82
- [59] Siegner S M, Ugalde L, Clemens A, *et al.* Adenine base editing efficiently restores the function of Fanconi anemia hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6900
- [60] Kiser P D. Retinal pigment epithelium 65 kDa protein (RPE65): an update. *Prog Retin Eye Res*, 2022, **88**: 101013
- [61] 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. *Nat Biomed Eng*, 2021, **5**(2): 169-178
- [62] Choi E H, Suh S, Foik A T, *et al.* *In vivo* base editing rescues cone photoreceptors in a mouse model of early-onset inherited retinal degeneration. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1830
- [63] Kabra M, Pattnaik B R. Sensing through non-sensing ocular ion channels. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(18): 6925
- [64] Kabra M, Shahi P K, Wang Y, *et al.* Nonviral base editing of KCNJ13 mutation preserves vision in a model of inherited retinal channelopathy. *J Clin Invest*, 2023, **133**(19): e171356
- [65] Wu Y, Wan X, Zhao D, *et al.* AAV-mediated base-editing therapy ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 4923
- [66] Musunuru K, Chadwick A C, Mizoguchi T, *et al.* *In vivo* CRISPR base editing of PCSK9 durably lowers cholesterol in Primates. *Nature*, 2021, **593**(7859): 429-434
- [67] Rothgangl T, Dennis M K, Lin P J C, *et al.* *In vivo* adenine base editing of PCSK9 in macaques reduces LDL cholesterol levels. *Nat Biotechnol*, 2021, **39**(8): 949-957
- [68] Yotti R, Seidman C E, Seidman J G. Advances in the genetic basis and pathogenesis of sarcomere cardiomyopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2019, **20**: 129-153
- [69] Reichart D, Newby G A, Wakimoto H, *et al.* Efficient *in vivo* genome editing prevents hypertrophic cardiomyopathy in mice. *Nat Med*, 2023, **29**(2): 412-421
- [70] Chai A C, Cui M, Chemello F, *et al.* Base editing correction of hypertrophic cardiomyopathy in human cardiomyocytes and humanized mice. *Nat Med*, 2023, **29**(2): 401-411
- [71] Qi M, Ma S, Liu J, *et al.* *In vivo* base editing of *Scn5a* rescues type 3

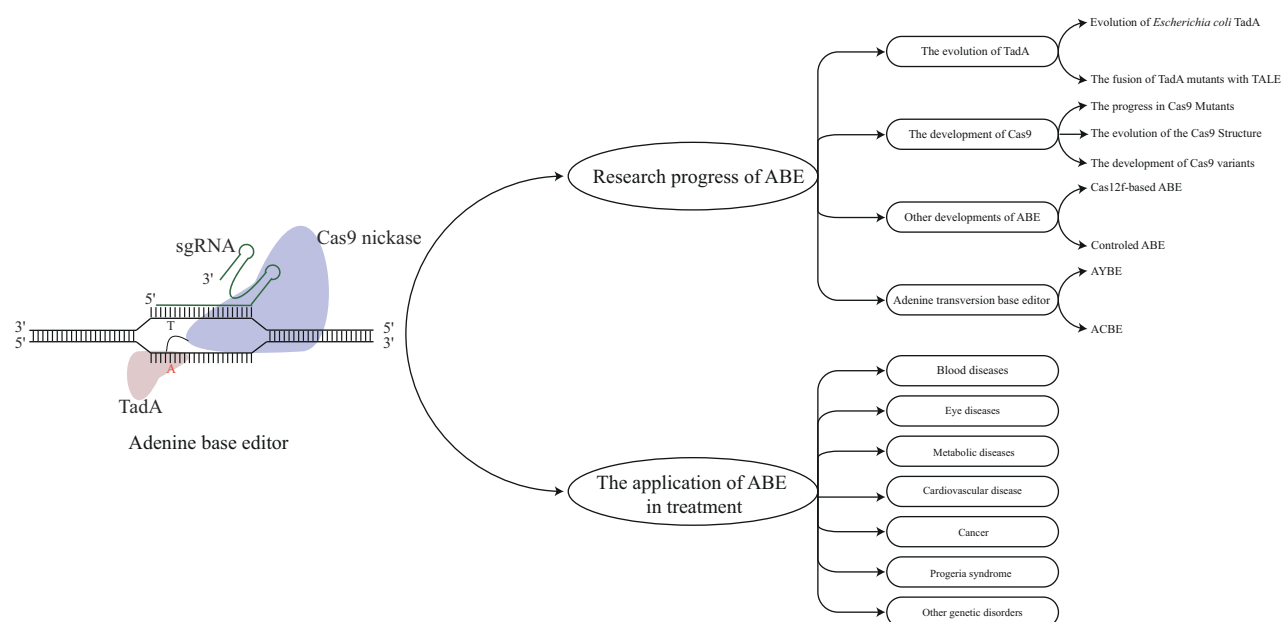
- long QT syndrome in mice. *Circulation*, 2024, **149**(4): 317-329
- [72] Cesare A J, Reddel R R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*, 2010, **11**(5): 319-330
- [73] Bell R J, Rube H T, Kreig A, *et al.* Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*, 2015, **348**(6238): 1036-1039
- [74] Li X, Qian X, Wang B, *et al.* Programmable base editing of mutated TERT promoter inhibits brain tumour growth. *Nat Cell Biol*, 2020, **22**(3): 282-288
- [75] Zhao G, Ma Q, Yang H, *et al.* Base editing of the mutated TERT promoter inhibits liver tumor growth. *Hepatology*, 2024, **79**(6): 1310-1323
- [76] Ferreira-Marques M, Carvalho A, Franco A C, *et al.* Ghrelin delays premature aging in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell*, 2023, **22**(12): e13983
- [77] Koblan L W, Erdos M R, Wilson C, *et al.* *In vivo* base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature*, 2021, **589**(7843): 608-614
- [78] Whisenant D, Lim K, Revêchon G, *et al.* Transient expression of an adenine base editor corrects the Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation and improves the skin phenotype in mice. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 3068
- [79] Baruteau J, Diez-Fernandez C, Lerner S, *et al.* Argininosuccinic aciduria: recent pathophysiological insights and therapeutic prospects. *J Inher Metab Dis*, 2019, **42**(6): 1147-1161
- [80] Jalil S, Keskinen T, Juutila J, *et al.* Genetic and functional correction of argininosuccinate lyase deficiency using CRISPR adenine base editors. *Am J Hum Genet*, 2024, **111**(4): 714-728
- [81] Rovai A, Chung B, Hu Q, *et al.* *In vivo* adenine base editing reverts C282Y and improves iron metabolism in hemochromatosis mice. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 5215
- [82] Roberts T C, Wood M J A, Davies K E. Therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, **22**(11): 917-934
- [83] Chemello F, Chai A C, Li H, *et al.* Precise correction of Duchenne muscular dystrophy exon deletion mutations by base and prime editing. *Sci Adv*, 2021, **7**(18): eabg4910

Adenine Base Editor and Its Clinical Application*

WANG Hui-Ling, CHEN Lei, GU Feng**

(Engineering Research Center of Reproduction and Translational Medicine of Hunan Province, Hunan Provincial Key Laboratory of Model Animal and Stem Cell Biology, Hunan Normal University School of Medicine, Changsha 410013, China)

Graphical abstract



Abstract The mutations in human disease-causing genes are predominantly caused by point mutations, with more than half of them being transitions between guanine (G) and adenine (A). Precise and efficient in situ repair of these mutations is the most ideal approach for the treatment of genetic diseases. Given that most point mutations are transitions between G and A, adenine base editors (ABEs) based on the CRISPR/Cas9 system, which convert A to G, are particularly important for repairing these mutations in the treatment of human genetic diseases. In recent years, ABEs have been continuously optimized, with both activity and fidelity being improved. Here we summarize the progress of ABEs, especially those key mutants developed during the process of ABE optimization. It also reflects on the existing defects in current ABEs. Additionally, the article reviews the clinical applications (including preclinical studies) of ABE. Overall, the article aims to provide references for the discovery and optimization of new ABEs and their applications.

Key words adenine base editor, gene therapy, CRISPR/Cas9 technology

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0345

* This work was supported by grants from National Science and Technology Major Project (2023ZD0500502), The National Natural Science Foundation of China (82271910), and Hunan Natural Science Foundation (2024JJ3024).

** Corresponding author.

Tel: 86-731-88912412, E-mail: fgu@hunnu.edu.cn

Received: July 26, 2024 Accepted: September 9, 2024