

STRESZCZENIE

Metoda Prime Editing'u polega na wprowadzeniu oczekiwanych edycji w obrębie danego genomu przy zastosowaniu konstruktów zbudowanych z nikazy Cas9, pegRNA oraz odwrotnej transkryptazy, odpowiedzialnej za syntezę odcinka, który ma następnie zostać włączony do edytowanej nici. Technika ta bazuje na wcześniej odkrytej metodzie CRISPR/Cas9. Różni się od CRISPR/Cas9 brakiem generowania podwójnych pęknięć w obrębie helisy DNA co zawdzięcza swojej złożonej konstrukcji, w tym m.in. obecności dodatkowych elementów tj.: odwrotnej transkryptazy oraz matrycy zawartej w obrębie pegRNA. PE wykorzystuje się do wprowadzania modyfikacji w obrębie podwójnej helisy DNA. Praca porusza głównie tematykę kreowania i udoskonalania oraz testowania nowoczesnej metody Prime Editing'u. Podano informacje na temat budowy oraz sposobu funkcjonowania systemu, a także opisano dotychczas przeprowadzone badania z zastosowaniem PE, wykonane w obrębie genomów komórek pochodzących z organizmów roślinnych, zwierzęcych oraz ludzkich. W pracy zawarto również informacje dotyczące potencjalnych korzyści oraz nadziej związane z zastosowaniem tej innowacyjnej metody.

WPROWADZENIE

Prime Editing to innowacyjna metoda pozwalająca na wprowadzanie określonych modyfikacji w obrębie podwójnej helisy w docelowym *loci*, dzięki czemu może służyć jako narzędzie genetyki stosowanej. Zgodnie z definicją PE umożliwia wprowadzenie 12 mutacji punktowych znajdujących się w obszarze 3 pz powyżej i 29 pz poniżej sekwencji PAM oraz sporych delecji, liczących nawet do 44 pz czy insercji, sięgających blisko 80 pz [1]. Potencjalne korzyści wynikające z zastosowania systemu PE są znaczące i obiecujące [2]. Wszelchonność systemu podyktowana jest jego wysoką czułością i umożliwia wprowadzenie oczekiwanych edycji warunkujących np.: wystąpienie przedwczesnego kodonu stop, delecji czy insercji, pojedynczych bądź licznych mutacji punktowych jak również zastąpienie aminokwasów innymi (mutacje zmiany sensu). Dzięki tym zmianom możliwa jest utrata aktywności danego genu, inżynieria białek i korekta wadliwych genów bądź elementów genetycznych [3]. Zdolność do edycji określonych fragmentów DNA może zostać wykorzystana w wielu dziedzinach naukowych, w tym do poprawy jakości roślin uprawnych, w inżynierii metabolicznej, w biologii syntetycznej czy do wielu podstawowych badań laboratoryjnych oraz w medycynie [4,5]. Dotychczas przeprowadzone badania wykazały znaczną przewagę PE, biorąc pod uwagę przede wszystkim dokładność i specyficzność systemu, która warunkuje znacznie mniejszy procent nieoczekiwanych modyfikacji w stosunku do CRISPR/Cas9 oraz większą „czystość otrzymanych produktów” [2,4-6].

TRZY GENERACJE PRIME EDITOR'ÓW

W odpowiedzi na ograniczenia dotychczas stosowanego systemu CRISPR/Cas9 do edycji genów związane w szczególności z dużym zagrożeniem wystąpienia mutacji w efekcie cięcia obu nici polinukleotydowych, podjęto wyzwanie stworzenia systemu działającego w oparciu o cięcie tylko jednego łańcucha helisy DNA. Proces opracowania techniki spełniającej te kryteria przebiegał wieloetapowo, dając tym samym początek trzem generacjom PE (Tab. 1). Każdy z wytworzonych systemów/prototypów składał się z 3 głównych komponentów, do których należały: nikaza Cas9, odwrotna transkryptaza oraz pegRNA [6].

PE pierwszej generacji powstały wskutek fuzji Cas9 H840A nikazy z odwrotną transkryptazą pochodzącą z dzikiej odmiany wirusa mysiej białaczki (M-MLV RT) dając początek białku PEFP (ang. *Prime Editing Fusion Protein*)

lic. Dalia Blicharska¹,
dr Izabela Szućko-Kociuba^{1,2},
dr inż. Ewa Filip^{1,2},
dr Anna Orłowska¹,
dr hab. Lidia Skuza,
prof. US^{1,2}✉

¹Institut Biologii, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

²Centrum Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Institut Biologii, Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

https://doi.org/10.18388/pb.2021_494

✉ autor korespondujący: lidia.skuza@usz.edu.pl

Słowa kluczowe: Prime Editing, pegRNA, inżynieria genetyczna, off-target, nCas9

Wykaz stosowanych skrótów: PAM – Proto-spacer adjacent motif, PBS – primer dla polimerazy RT, PE – Prime Editing, RT – odwrotna transkryptaza

Tabela 1. Efektywność dokonywanych edycji w obrębie poszczególnych generacji prime editorów [1,6,8]

	Wprowadzone modyfikacje w obrębie systemu	Typ dokonanych edycji	Procent wykrywalnych błędów w trakcie działania systemów	Poprawa sukcesywności dokonywanych modyfikacji genetycznych w %
PE1	Wydłużenie sekwencji PBS z jednoczesnym przyłączeniem RT do C-terminalnego końca nCas9	Transwersja	0,2±0,1%	Znaczna (sukcesywność 0,7-5,5% w zależności od długości PBS)
		Insercje i delecje	Brak informacji	Znaczna (sukcesywność dokonywanych modyfikacji 4-17%)
PE2	Inżynieria RT-wytworzenie M3 poprzez wprowadzenie D200N+L603W+T330P do M-MLV Inżynieria M3 poprzez dodanie T306K+W313F Sumarycznie pod dokonaniu zmian	Transwersja i insercja	Brak informacji	6,8-krotna poprawa skuteczności dokonywanych edycji
		Transwersja i insercja	Brak informacji	Od 1,3 do 3,0-krotna poprawa skuteczności dokonywanych edycji
		Mutacje punktowe Insercje i delecje	Brak informacji Brak informacji	1,6-5,1-krotna poprawa w stosunku do PE1 Widoczna poprawa w stosunku do PE1
PE3	Wprowadzenie drugiego cięcia w odległości 14-116 nt od miejsca pierwszego cięcia Wprowadzenie drugiego cięcia w odległości 40-90 nt od miejsca pierwszego cięcia	Edycja genetyczna (ogółem)	Brak informacji	Od 1,5 do 4,2-krotna poprawa skuteczności dokonywanych edycji (55% efektywność dokonywanych edycji)
		Edycja genetyczna (ogółem)	Brak wzrostu częstości występowania mutacji typu indel – 6,8%	Poprawa efektywności o ok.41%
PE3b	Wykorzystanie sgRNA komplementarnego do edytowanej nici Sumarycznie po dokonaniu zmian	Edycja genetyczna (ogółem)	0,74%	13-krotna poprawa skuteczności dokonywanych edycji
		Edycja genetyczna (ogółem)	Brak informacji	13-krotna poprawa skuteczności dokonywanych edycji w porównaniu do PE2

[6, 7]. Przez transfekcje wprowadzono do genomu komórek ssaków z klasy HEK293T dwa plazmidy, z których pierwszy kodował Cas9 z przyłączoną M-MLV RT po C-terminalnej stronie, drugi zaś kodował pegRNA. Domena pochodząca z nikazy Cas9 białka PEFP miała za zadanie przeciąć łańcuch polinukleotydowy, natomiast domena M-MLV RT była odpowiedzialna za syntezę komplementarnego DNA kopiując informację genetyczną zawartą w pegRNA [1,6]. Utworzony fragment miał następnie zostać włączony do wcześniej przeciętego łańcucha helisy. Zdecydowano się również na wydłużenie sekwencji pegRNA, odpowiedzialnej za przyłączenie się konstruktowi do primerowej sekwencji DNA [6]. Pierwsze próby wykorzystania tego systemu w celu wprowadzenia zmian w genomie komórek HEK293T przyniosły ledwie wykrywalne modyfikacje [6,7].

Następnie wprowadzono poprawki przyczyniające się do zwiększenia efektywności działania PE. W celu zwiększenia termostabilności, procesywności oraz powinowactwa DNA-RNA substratu indukowano 5 mutacji w obrębie PEFP, przy jednoczesnym wzroście stopnia inaktywacji obecnych RNAaz [1,6]. W ten sposób powstały PE drugiej generacji, które wykazały 1,6 do 5,1 razy większą efektywność, niż PE1, pod względem przeprowadzania punktowych mutacji oraz znaczną poprawę w przypadku naprawy mutacji typu indel (Tab. 2) [6].

Następnym krokiem była optymalizacja pegRNA, sprawdzając zależność między jej strukturą a efektyw-

nością działania PE2. Okazało się, iż primerowe regiony o niższej zawartości cytozyny i guaniny wymagają dłuższych sekwencji PBS. Jest to spowodowane energetycznymi wymaganiami hybrydyzacji między regionami PBS w pegRNA oraz naciętą nicią DNA. Zaobserwowano również spadek efektywności edycji genów w przypadku, gdy pierwszym nukleotydem dobudowywanym na końcu 3' przez RT jest cytozyna [6].

PE trzeciej generacji zostały wzbogacone o dodatkowy komponent w postaci sgRNA, którego głównym zadaniem było naprowadzenie nikazy Cas9 na sekwencję znajdującą się naprzeciwko edytowanego miejsca, lecz w łańcuchu niepodlegającym edycji [4,6]. Zabieg ten miał na celu naznaczenie nieedytowanego łańcucha polinukleotydowego dając informacje o jego wadliwości, dzięki czemu system naprawczy mógłby użyć edytowanego wcześniej łańcucha jako matrycy do naprawy powstałego błędu [6,8]. Element ten został zastosowany w celu uniknięcia niedopasowania między nicią DNA, która uległa już modyfikacji, a drugą, oryginalną nicią w niezmienionej formie, co mogłoby prowadzić do represji edycji tego fragmentu genomu [6,7]. W celu ulepszenia PE3 stworzono sgRNA, które będzie komplementarne do zmodyfikowanej sekwencji w edytowanej nici DNA. Dzięki temu cięcie mogło nastąpić dopiero po hybrydyzacji edytowanego odcinka [4]. Tak powstałe PE3b obniżyły 0,74% ryzyko wystąpienia mutacji typu indel [6].

Tabela 2. Efektywność dokonywanych edycji w PE3. Wyniki testów przeprowadzonych na komórkach z linii HEK3 [6]

	Procent wykrywalnych mutacji typu indel/ błędów w trakcie działania systemów	Efektywność dokonywanych modyfikacji genetycznych
Substytucje pojedynczych nukleotydów w pozycji od +1 do +8 od miejsca cięcia z wykorzystaniem 10-nt matrycy	7,5±1,8%	33±7,9%
Substytucje pojedynczych nukleotydów w pozycjach +12, +14, +17, +20, +23, +24, +26, +30, +33 z zastosowaniem matrycy 35-nt	8,6±2,0%	36±8,7%
Małe insercje 1 pz oraz 3 pz	6,8±5,4%	Dla 1 pz 32±9,8% Dla 3 pz 39±16%
Małe delecje 1 pz oraz 3 pz	6,8±5,4%	Dla 1 pz 29±14% Dla 3 pz 32±11%
Duże delecje 5-80 pz	11±4,8%	Średnia wartość dla delecji odcinków długości 5-, 10-, 15-, 25- oraz 80 pz 52-78%
Zdolność przeprowadzania 12 kombinacji insercji, delecji oraz mutacji punktowych	6,4%	55%

TESTOWANIE ORAZ WDRAŻANIE NOWEJ GENERACJI MECHANIZMU DO MANIPULACJI GENETYCZNEJ

Zanim przystąpiono do konstrukcji prototypów każdego z PE, dokonano licznych analiz przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i z wykorzystaniem komórek drożdży, w celu potwierdzenia hipotez dotyczących konwencji nowej generacji urządzenia do edycji genów [6]. Pierwszym etapem badań było zsyntetyzowanie innowacyjnej wersji sgRNA wzbogaconej o dodatkowe elementy konstrukcyjne. Podjęto więc próbę wytworzenia pegRNA, konstrukt powstałego w wyniku przyłączenia do klasycznego sgRNA fragmentu o długości 5-6 nt zwanego PBS (ang. *primer binding site*) – odcinka, dzięki któremu możliwa jest hybrydyzacja końca 3' naciętej nici z pegRNA. Do tak wytworzonego elementu dołączono również matrycę o długości 7-22 nt, niezbędną do syntezy cDNA przy pomocy RT, otrzymując przy tym gotowy element w postaci pegRNA. Na tym etapie testowano, który wariant pegRNA jest bardziej korzystny pod względem przyłączania się nukleolitycznego białka oraz sukcesywności cięcia helisy DNA. Zaobserwowano większą efektywność wiązania dCas9 do substratu elementów pegRNA z przedłużeniem na końcu 5'. Wykazano również taką samą skuteczność cięcia docelowego zarówno w przypadku zastosowania konstruktów pegRNA z przedłużeniem na końcu 5' jak i na końcu 3'. Jednocześnie kontroli poddano dostępność końca 3'-ciętej nici polinukleotydu dla RT, kluczowy dla całego projektu aspekt, decydujący o zdolności białka do syntezy zmodyfikowanego odcinka DNA. W kolejnym kroku badano sukcesywność syntezy oraz przyłączania cDNA do specyficznych, odpowiednio wyznakowanych przy użyciu 5'-5Cys substratów w postaci dsDNA, poddanych uprzedniemu cięciu. W tym celu zastosowano wytworzone wcześniej warianty pegRNA wraz z M-MLV RT oraz dCas9 – białka odgrywającego decydującą rolę w aspekcie wyznakowania fragmentu, do którego ma zostać dołączony nowo zsyntetyzowany odcinek. W wyniku doświadczenia otrzymano przedłużone o dodatkowe nukleotydy produkty (powstałe w wyniku prawidłowego

działania RT oraz hybrydyzacji cDNA ze znakowanym substratem) uwidocznione na żelu. Następnie do dalszej analizy funkcjonalności kreowanego systemu wykorzystano substrat dsDNA (lecz nie poddany wcześniejszemu cięciu) oraz nikazę Cas9 H840A, której głównym zadaniem jest cięcie nici zawierającej sekwencje PAM. Test ten miał na celu sprawdzenie zdolności obu wariantów pegRNA, zarówno tych z przedłużeniem występującym na końcu 5' jak i tych z przedłużeniem na końcu 3', do odpowiedniego nakierowania peptydu Cas9 na sekwencję docelową oraz prawidłowo przeprowadzonej odwrotnej transkrypcji, których efektem byłby prawidłowo zmodyfikowany produkt. Doświadczenie przebiegło pomyślnie w przypadku pegRNA z wydłużeniem na końcu 3', dając tym samym jeden oczekiwany produkt, który został odpowiednio zidentyfikowany przy użyciu metody sekwencjonowania. Drugi rodzaj użytych pegRNA wykazał się niską skutecznością przeprowadzanej odwrotnej transkrypcji. Ostatni etap prowadzonych badań wymagał użycia reporterowych plazmidów oraz komórek drożdży. Gotowy konstrukt niezbędny do wprowadzenia określonych zmian w podwójnej helisie składał się z 3'-pegRNA, RT oraz Cas9. Kluczowym elementem tego badania było skonstruowanie plazmidów wyposażonych w geny kodujące EGFP-białko zielonej fluorescencji oraz mCherry – monomeryczne białko czerwonej fluorescencji, odseparowanych linkerem niosącym kodon stop występujący w ramce odczytu, kodon stop warunkujący przesunięcie ramki odczytu o jeden nukleotyd do przodu (+1) oraz kodon stop dyktujący przesunięcie ramki odczytu do tyłu (-1). Wszystkie te działania miały na celu oszacowanie potencjalnych rezultatów wprowadzonych modyfikacji w komórkach drożdży w celu oceny skuteczności wygenerowanego systemu oraz obserwacji reakcji systemów naprawczych danych komórek na wprowadzone zmiany. Odpowiednio skonstruowane plazmidy zostały następnie poddane procesowi Prime Editing'u z użyciem gotowego systemu. W dalszej kolejności dokonano transformacji edytowanych cząsteczek do komórek drożdży [6]. W rezultacie zaobserwowano:

- ekspresję obu genów (GFP oraz mCherry) u 37% komórek u których zastosowano proces naprawy niedojrzalego kodonu stop przy użyciu transwersji
- efektywność edycji u 15% komórek, w których dokonano insercji jednego nukleotydu
- efektywność edycji u 29% komórek, w których dokonano delecji jednego nukleotydu.

Ten sam eksperyment przeprowadzony z wykorzystaniem pegRNA z przedłużeniem na końcu 5' przyniósł znacznie gorsze wyniki, wykazując sukcesywność edycji u jedynie 9% wszystkich komórek.

Odkrycia te zaowocowały dalszymi pracami w celu udoskonalenia skonstruowanego narzędzia do manipulacji genetycznej, dając tym samym początek 3 generacjom PE opisanym powyżej.

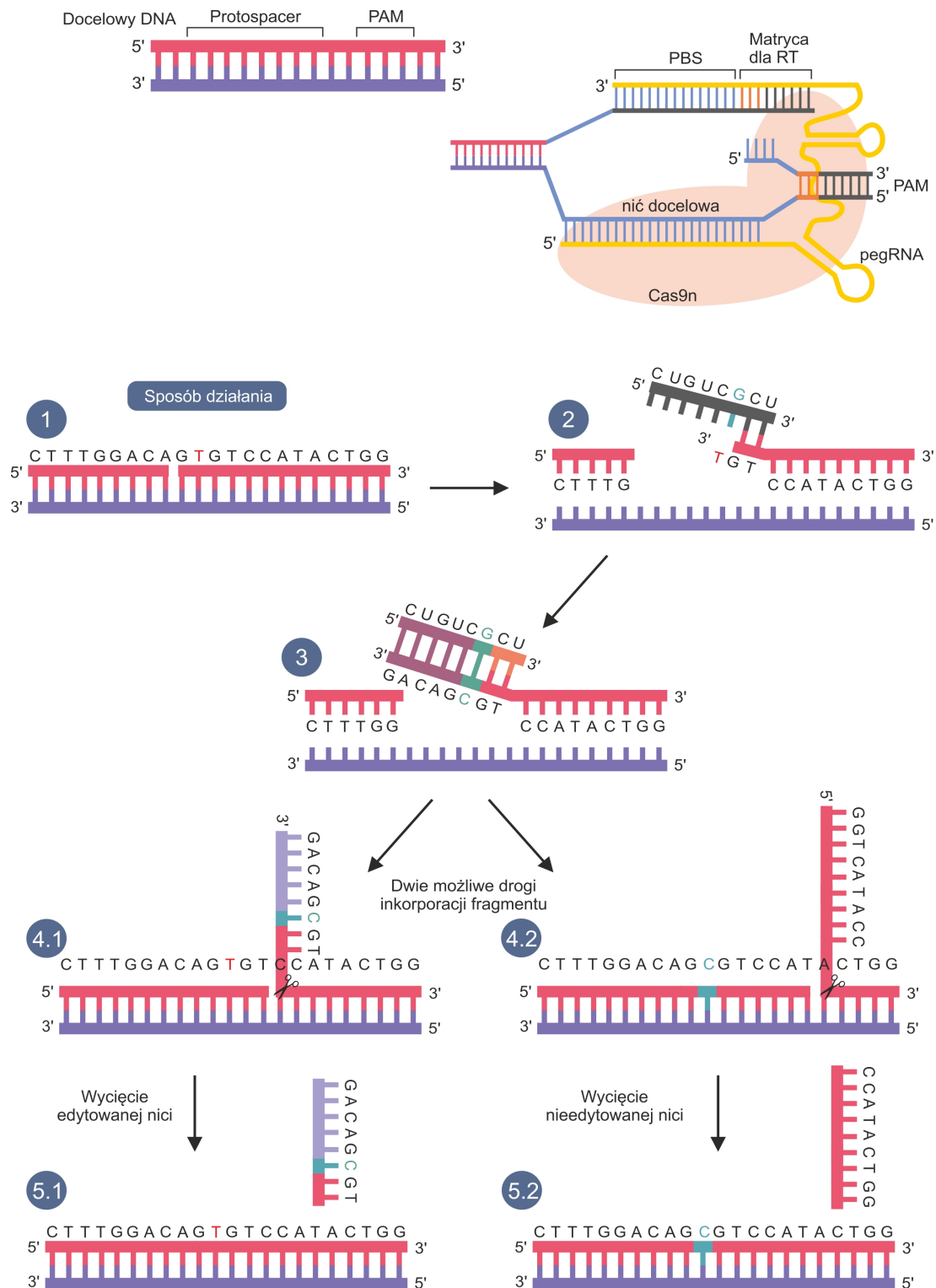
SPOSÓB DZIAŁANIA SYSTEMU ORAZ GŁÓWNE ELEMENTY SKŁADOWE

Pomysł na stworzenie nowej technologii został zainspirowany metodą edycji z wykorzystaniem systemów CRISPR/Cas9. Ze względu na znaczne ograniczenia starszego systemu zdecydowano się wykorzystać tylko niektóre elementy używane w technice CRISPR/Cas9, poddane odpowiednim modyfikacjom tak, aby osiągnąć jak największą sukcesywność wprowadzanych zmian genetycznych ograniczając jednocześnie częstość edycji występujących poza docelowym *loci*. Głównym zamiarem było wykreowanie takiego systemu, który nie wymagałby wprowadzania DSB w oczekiwanym odcinku podwójnej helisy, co w znacznym stopniu ograniczyłoby występowanie błędów wywołanych działaniem mechanizmu naprawczego NHEJ. W efekcie skonstruowano nowe urządzenie do manipulacji genetycznej dające obiecujące rezultaty [6-8].

Główny mechanizm działania w skrócie nazwano „search and replace” („znaleźć i zastąpić”). System działa w oparciu o zdolność odpowiednio przystosowanych konstruktywów do rozpoznania odcinka DNA, który ma ulec modyfikacjom oraz jednoczesnej przebudowie fragmentu podwójnej helisy w celu naprawy wadliwych mutacji obecnych w genomie [4]. Działanie to jest możliwe dzięki obecności dwóch głównych elementów składowych systemu: pegRNA oraz kompleksu białkowego (Ryc. 1) [3]. pegRNA jest zbudowany z trzech głównych składowych, z których każda odgrywa istotną rolę w procesie edycji genów. Pierwszy komponent stanowi sgRNA, zawierające spacer – region komplementarny do konkretnej sekwencji DNA w modyfikowanym genomie. Kolejnym elementem jest matryca dla RT, niezbędna do przebiegu procesu odwrotnej transkrypcji przy udziale tego enzymu. Matryca ta niesie informację dotyczącą edycji, która po odczytaniu przez odwrotną transkryptazę oraz po syntezie zostaje przyłączona do DNA geno-

mowego, zastępując odcinek helisy obdarzony wadliwą mutacją [6,8,9]. Ostatnim komponentem pegRNA jest region PBS - Primer Binding Site, o długości 8-16 nt, stanowiący pewnego rodzaju starter wyznaczający miejsce przyłączenia RT do konstruktowi [3,4,8]. PBS jest komplementarne do odcinka jednej nici DNA ulokowanego powyżej sekwencji PAM [5]. Kompleks białkowy powstał w wyniku fuzji odpowiednio zaprogramowanej nikazy (*Streptococcus pyogenes* Cas9-H840A) z odwrotną transkryptazą (M-MLV RT) [2,6]. Nikaza pełni rolę nukleolityczną i odpowiedzialna jest za wykonanie nacięcia nici deoksyrybonukleinowej w wyznaczonym miejscu, RT natomiast przeprowadza transkrypcję fragmentu zapianego na matrycy zawartej w pegRNA [3].

Proces edycji rozpoczyna się w momencie, gdy gotowy konstrukt zostaje nakierowany na docelowe miejsce w danej komórce przy pomocy pegRNA [10]. Następnie Cas9n dokonuje cięcia w obrębie nici zawierającej PAM, generując tym samym zwisający koniec 5' (Ryc. 1 punkty 1-3 oraz 4) [8,11]. W następnym kroku do naciętej nici zostaje przyłączony docinek PBS stanowiący primer dla polimerazy (RT), która po związaniu z odpowiednim odcinkiem rozpoczyna transkrypcję informacji zawartej w matrycy stanowiącej element pegRNA. Powstały produkt reakcji tworzy drugi zwisający w miejscu cięcia DNA odcinek 3' z oczekiwaną sekwencją nukleotydową [5,6]. Kluczowym momentem w całym procesie edycji jest reakcja przeprowadzana przez komórkowe endonukleazy (np.: FEN1 lub EXO1), aktywowane w momencie wytworzenia rozgałęzionego intermediatu odwrotnej transkrypcji do podwójnej helisy, które odpowiadają za wycięcie jednego z zwisających fragmentów [6]. Jak zaobserwowano enzymy te preferencyjnie wybierają odcinki 5' (Ryc. 1 punkt 4.2 i 5.2) jako substraty swojej reakcji, które na tym etapie ulegają degradacji w wyniku trawienia enzymatycznego, umożliwiając w ten sposób ligację odcinków 3' [5,8]. W przypadku PE1 oraz PE2 od tego momentu system nie uczestniczy w dalszym przebiegu doświadczenia. Efekt końcowy jest jedynie zależny od komórkowego mechanizmu naprawczego (MMR), który może wykorzystać zarówno edytowaną jak i nieedytowaną nić w celu reparacji błędów [5]. Natomiast w przypadku PE3 powstały heterodupleks w postaci podwójnej helisy, z jedną nicią nieedytowaną oraz drugą z wprowadzoną modyfikacją, ulega następnie cięciu przy użyciu Cas9n. Polipeptyd po nakierowaniu na nieedytowaną nić przez odpowiednio skonstruowane sgRNA, komplementarne do łańcucha zawierającego wprowadzone modyfikacje (w przypadku PE3b), dokonuje zerwania ciągłości helisy [10,12]. Zabieg odbywa się dopiero po integracji edytowanego odcinka do helisy i ma na celu nakierowanie systemu naprawczego na edytowany łańcuch, wskazując jednocześnie wadliwość tego drugiego. Dzięki temu naprawa odbywa się z wykorzystaniem zmodyfikowanego odcinka jako matrycy, czego rezultatem jest otrzymanie komórek z prawidłowo edytowanym DNA [4-7]. W przypadku PE3 drugie cięcie następuje również w nieedytowanej nici, natomiast sgRNA



Rycina 1. Budowa oraz zasada działania PE

nie wykazuje komplementarności ze zmodyfikowanym fragmentem łańcucha, przez co drugie cięcie może nastąpić jeszcze przed degradacją końca 5', wpływając tym samym negatywnie na wynik doświadczenia [6,7].

PE trzeciej generacji zostały dokładnie przetestowane w celu określenia skuteczności dokonywanych modyfikacji

(Tab. 1) [3,6]. Zaobserwowano znacznie mniejszy procent nieoczekiwanych modyfikacji (ang. *off-target effects*) w stosunku do sytemu CRISPR/Cas9 [7]. Ma to związek z specyficznymi wymogami mechanizmu, w którym hybrydyzacja z docelowym DNA zachodzi przy udziale 3 komponentów, co stanowi 3 punkty kontrolne parowania z podwójną helisą, ograniczając tym samym

prawdopodobieństwo nieprawidłowego dopasowania skutkującego wystąpieniem mutacji poza docelowym fragmentem łańcucha deoksyrybonukleinowego. W przypadku starszego systemu jedynym wymogiem niezbędnym do sparowania jest komplementarność pomiędzy sgRNA (region protospacer) a odcinkiem helisy zaopatrzoną w sekwencję PAM, która występuje dość często w obrębie wielu genomów. W przypadku PE pierwszym punktem kontrolnym sparowania jest komplementarność pomiędzy spacer'em w obrębie DNA a łańcuchem podwójnej helisy. Kolejny etap weryfikujący dotyczy hybrydyzacji PBS z łańcuchem deoksyrybonukleinowym. Ostatnim wymogiem niezbędnym do przeprowadzenia prawidłowo edycji jest zdolność hybrydyzacji pomiędzy zwisającym fragmentem zawierającym oczekiwaną modyfikację a genomowym DNA. Taki system weryfikacyjny w znacznym stopniu ogranicza ryzyko niepowodzenia modyfikacji genetycznych dając tym samym sporą przewagę PE nad CRISPR/Cas9 [1].

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA PRIME EDITING'U

Większość poważnych schorzeń jest uwarunkowana genetycznie. Nieprawidłowo wstawione pojedyncze nukleotydy, delecje bądź insercje określonych fragmentów DNA przyczyniają się do powstania choroby. Istotnym czynnikiem mającym również wpływ na upośledzenie funkcji danego organizmu są czynniki środowiskowe, będące częstą przyczyną inicjacji procesu nowotworzenia. Rozwój nauk biologicznych w tym inżynierii genetycznej, biochemii czy genetyki oraz ciągły postęp w dziedzinie medycyny zapoczątkował ideę wynalezienia technologii zdolnej do naprawy wszelkich mutacji warunkujących wystąpienie choroby.

Obecnie system PE uznawany jest za najnowocześniejsze i jednocześnie najbardziej uniwersalne narzędzie do wprowadzania manipulacji genetycznych. „System ten umożliwia wprowadzenie 12 mutacji punktowych znajdujących się w obszarze 3 pz powyżej oraz 29 pz poniżej sekwencji PAM oraz wprowadzenie sporych delecji liczących nawet do 44 pz czy insercji sięgających blisko 80 pz” [1].

BADANIA Z ZASTOSOWANIEM PRIME EDITING'U

BADANIA NA MATERIALE ROŚLINNYM

Odkrycie nowej technologii do manipulacji genetycznej wywołało spore zainteresowanie naukowców, skłaniając ich do przeprowadzenia własnych testów potwierdzających bądź obalających słuszność teorii zarówno na organizmach roślinnych jak i zwierzęcych (Tab. 3.). Każde z przeprowadzanych doświadczeń wymagało licznych testów i modyfikacji prowadzących do zwiększenia odsetka prawidłowo wprowadzonych modyfikacji. W większości przeprowadzonych na organizmach roślinnych badań głównym ich przedmiotem był ryż uprawny, uznany za idealną roślinę modelową do weryfikacji wprowadzanych modyfikacji.

Badania dotyczące ryżu obejmowały ocenę łącznie trzech wariantów PE, wykorzystując przy tym zarówno technologie PE2 [13] oraz PE3 [10,13]. Przeprowadzone modyfikacje dotyczyły egzogenego genu kodującego nieaktywne EGFP wprowadzonego do genomu rośliny oraz endogenego genu ALS kodującego enzym - syntazę acetylomleczanową [13]. Pierwszą analizę przeprowadzono z wykorzystaniem kasety kodującej nieaktywne EGFP, zmodyfikowane poprzez wprowadzenie mutacji nonsensownych w sekwencjach kodujących reszty chromoforowe Y67 oraz G68 białka oraz Sp-PE2 i Sp-PE3 wytworzonych z zastosowaniem m-MLV RT uzyskanej metodami inżynierii genetycznej z różnych wariantów enzymu (warianty D200N/I603W/T306K/W313F/T330P). Głównym celem doświadczenia było przywrócenie funkcjonalności EGFP po zastosowaniu PE, objawiającej się w postaci rejestrowanych sygnałów GFP. W badaniu zastosowano matrycę oraz pegRNA o długości 13 nt zaaplikowane do tkanki kalusowej ryżu przy użyciu transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium*. Edycja w przypadku obu konstruktów miała dotyczyć precyzyjnej substytucji pojedynczych zasad azotowych, a jedyną różnicą w sposobie działania obu systemów było wprowadzenie dodatkowego cięcia przez PE3 47 nt od pierwszego cięcia helisy DNA. W wyniku badań zaobserwowano emisję sygnałów w ponad 50% komórek kalusowych, zarówno w przypadku zastosowania PE2 jak i PE3. Następnie po regeneracji komórek wykazujących odporność na hygromycynę oraz po ich genotypowaniu oszacowano sukcesywność edycji w obrębie uzyskanych linii komórkowych na poziomie 15,6% w przypadku PE2 oraz 17,1% w przypadku PE3. W dalszej kolejności podjęto próbę wprowadzenia mutacji S627N w obrębie ALS wykorzystując w tym celu Sp-PE3 z PBS o długość 13 nt oraz 16 nt matrycę. Docelowa modyfikacja miała warunkować odporność na herbicydy imidazolinowe. Zastosowane w tym przypadku sgRNA wyznaczało drugie miejsce cięcia ulokowane 84 nt poniżej pierwszego. Analiza wykazała sukcesywność tranzycji G-A w 9,1% komórek kalusowych (4 z 44 otrzymanych linii). Następne badania nie wykazały żadnych efektów dokonywanych edycji w tym w próbach wprowadzania małych insercji czy delecji. W celu otrzymania bardziej zadowalających wyników przetestowano wykorzystanie SaCas9, które wykazuje zdolność do szybszego cięcia docelowych substratów [13,14]. Wynik dokonanej analizy nie przyniósł jednak obiecujących rezultatów [13].

W przypadku testów w celu oceny funkcjonalności systemu z wykorzystaniem PE trzeciej generacji, przeprowadzono sprawdzenie zdolności wprowadzenia prawidłowych modyfikacji w uszkodzonym egzogenym genie *hptII* warunkującym odporność na hygromycynę, w którym uprzednio dokonano mutacji w obrębie tripletów kodujących Gly45 oraz Tyr46 [10]. Wprowadzone zmiany o charakterze nonsensownym, miały być odpowiednio naprawione przy użyciu pegRNA, w którego skład wchodziły sgRNA dokonujące cięcia 50 pz powyżej miejsca pierwszego cięcia, 13 nt PBS oraz matrycy o dłu-

Tabela 3. Badania efektywności edycji genów w materiale roślinnym

Rodzaj PE/organizm	Gen	Rodzaj edycji/ drugie cięcie	Długość PBS	Długość matrycy RT	Efektywność	Piśmiennictwo
PE2/ryż	HPT	Substytucja C-T w pozycji +1	13 pz	10 pz	59,9%	
PE2/ryż	HPT	Substytucja C-T w pozycji +20	13 pz	34 pz	12%	
PE2/ryż	OsPDS	Insercja T w pozycji +2	-	-	7,3%	
PE2/ryż	OsACC1	Transwersja G-C	13 pz	10 pz	14,6%	
PE2/ryż	OsWX	Transwersja T-G	15 pz	31 pz	0%	
PE2/ryż	OsPDS	Insercja AT		13 pz	12,5%	
PE2/ryż	OsPDS	Insercja ATG		14 pz	19,8%	
PE2/ryż	OsPDS	Delecja 28pz		11 pz	0%	
PE2/ryż	OsPDS	Transwersja A-T		11 pz	31,3%	
PE2/ryż	OsPDS	Transwersja A-C		11 pz	0%	[18]
PE2/ryż	OsACC		10 pz	13 pz	3,1%	
PE2/ryż	OsACC		13 pz	20 pz	1%	
PE2/ryż	OsACC		15 pz	34 pz	0%	
PE3/ryż	OsWX	Transwersja T-G/ drugie cięcie w pozycji +59	15 pz	31 pz	0%	
PE3/ryż	OsACC	drugie cięcie w pozycji -31			18,8%	
PE3/ryż	OsACC	drugie cięcie w pozycji +78			10,4%	
PE3/ryż	OsACC	drugie cięcie w pozycji +116			16,7%	
PE3b/ryż	OsACC	drugie cięcie w pozycji -7	13 pz	10 pz	6,3%	
PE3/ryż	hptII	Transwersja T-G (Gly 45) i transwersja G-T (Tyr 46)/50 nt	13 pz	28 pz	9,38%	[10]
PE3/ryż	OSESPS	Supstytucja 3 aminokw. (TIAVPS)/+66 poniżej	13 pz	59 pz	2,22%	
PE2/ryż	EGFP	Transwersja T-G i G-C	13 pz	13 pz	15,6%	
PE3/ryż	EGFP	Transwersja T-G i G-C/47 nt	13 pz	13 pz	17,1%	[13]
PE3/ryż	ALS	Tranzycja G-A	13 pz	16 pz	9,1%	
PE2/ziemniak	StALS1 StALS2	Substytucje zasad azotowych – przekształcenie Pro186 w Ser	13 pz	15 pz	50%	[17]
PE3/ziemniak	StALS1 StALS2	Tranzycja i transwersja – przekształcenie Pro186 w Ser	13 pz	15 pz	0%	
PE3/ryż	OsALS, OsKO2, OsDEP1, OsPDS	Substytucje i insercja/ 100pz	13 pz	13 pz	0,05-0,15%	[16]
PE3b/ryż	OsEPSPS,	6 modyfikacji	13 pz	23 pz	0,4%	
PE3/ryż	OsDEP1	Insercja TGA w pozycji +2	16 pz	14 pz	1,55%	
PE2/ryż	OsALS	Transwersja G-T (tryp-leu) i G-A tranzycja	13 pz	15 pz	0,26-2%	
PE2/ryż	OsIPA	Substytucje AG- GA	13 pz	20 pz	Sukces	[12]
PE2/ryż	OsTB1	Transwersja C-G oraz C-T, insercja AA	13 pz	20 pz		
PE3/pomidor	NanoLuc-egzogenny	Liczne modyfikacje	13 pz oraz 14 pz	23 pz	0,26%	[19]
PE3/pomidor	PDS1	Insercja CG /+3	14 pz	17 pz	3,4%	

gości 28 pz. Gotowy konstrukt został wytworzony tak, aby pegRNA zostało odseparowane od sgrRNA przy użyciu tRNA tworząc tym samym tRNA-pegRNA-tRNA-sgrRNA-tRNA-PolyA. Kompleks ten został obdarzony dodatkowo promotorem *Actin* pochodzącym z genomu ryżu oraz terminatorami w postaci *PolyA* oraz *Nos*. Tak wytworzony mechanizm został następnie wklonowany do odpowiednio przystosowanego wektora (pCXU-N-Ubi-NLS-nCas9(H840A)-Linker1(33aa)-M-MLV-RT-Linker2(14aa)-NLS-PolyA-E9-Actin-Nos). Zastosowanie sekwencji NLS (nuclear localization signal) miało na celu optymalizację nCas9. W technologii wykorzystano sekwencje promotorowe – *ubi* (pochodzące z genomu kukurydzy) i *Actin* oraz terminatorowe *Nos* oraz *E9* (genom

grochu). Tkanę kalusową zainfekowano metodą bombardowania cząsteczkowego, potem poddano tygodniowej inkubacji w roztworze zawierającym 50mg/L higromycyny a następnie kolejnej 2–3 tygodniowej inkubacji w roztworze 75 mg/L higromycyny. W obrębie tkanki kalusowej zachodziły procesy indukcji i selekcji, dzięki którym możliwa była wizualna ocena efektów dokonanych modyfikacji przy użyciu PE3. Efektem doświadczenia było otrzymanie 32 tkanek kalusowych z nabytą odpornością (objawiającą się w postaci rozwoju badanej tkanki) spośród 148 poddanych doświadczeniu. Końcowa analiza przeprowadzona z wykorzystaniem procesu sekwencjonowania wykazała stopień efektywności naprawy kodonów stop sięgający 9,38% [10].

Dodatkowo sprawdzono efektywność edycji dokonywanych w obrębie endogennych genów dokonując przy tym modyfikacji w obrębie genu *OsEPSPS* kodującego syntazę (EPSPS) [10]. Wykorzystano w tym celu pegRNA skonstruowany z matrycy dla RT o długości 59 pz, PBS zbudowane z 13 pz oraz sgRNA dokonujące cięcia 66 pz poniżej miejsca pierwszego cięcia [10]. Podobnie jak w przypadku pierwszego doświadczenia wykorzystano schemat, w którym pegRNA zostało odseparowane od sgRNA, a gotowy konstrukt został wklonowany do tego samego typu wektora (pCXUN-Ubi-NLS-nCas9(H840A)-Linker1(33aa)-M-MLV-RT-Linker2(14aa)-NLS-PolyA-E9-Actin-Nos). W tym przypadku testowano wpływ wprowadzonych zmian w postaci trzech substytucji (T169I, A170V oraz P173S) na wzrost poziomu odporności na glifosat [15]. Zastosowano tą samą metodę infekowania tkanek ryżu, a otrzymane produkty zsekwencjonowano. Efektywność dokonywanej edycji oszacowano na 2,22%. W doświadczeniu otrzymano jedną heterozygotyczną linię z jednym allelem zawierającym docelową edycję. Zdecydowano się również na analizę otrzymanych linii komórkowych pod względem potencjalnych nieoczekiwanych edycji. Wynik pomiaru nie wykazał jednak żadnych nieprawidłowości [10].

Testowano również efektywność edycji przeprowadzanej przy użyciu PE3 wprowadzając modyfikacje w obrębie genów *OsALS*, *OsKO2*, *OsDEP1* oraz *OsPDS* w genomach ryżu [16]. Wykonano analizę przy użyciu PE3, a następnie z wykorzystaniem PE3b ze względu na niski procent sukcesywnie dokonanej edycji (0,05–0,15%) uzyskanej w pierwszym badaniu. Pierwsze doświadczenie przeprowadzono z zastosowaniem pegRNA, którym długość matrycy RT oraz PBS wynosiły 13 pz, drugie cięcie nieedytowanej nici następowało w odległości 100 pz od pierwszego. Ekspresję pegRNA uzyskano poprzez wprowadzenie do systemu promotora *OsU3*. W przypadku sgRNA za odczytanie informacji odpowiedzialny był promotor *OsU6*. Drugie doświadczenie miało przynieść bardziej obiecujące efekty modyfikacji ze względu na zastosowanie sgRNA komplementarnego do już edytowanego łańcucha. W tej strategii wykorzystano 4 inne geny wprowadzając zmiany również w 5 docelowych miejscach. Druga analiza otrzymanych wyników wykazała wzrost wartości efektywności systemu do 0,4%. Podczas tego badania zastosowano również różne warianty matrycy RT o długości od 13 do 23 nt. Zaobserwowano też spadek częstości nieoczekiwanych edycji. Najwyższy procent sukcesywnie dokonanych edycji (1,55%) otrzymano po wprowadzeniu znacznych modyfikacji w obrębie konstruktów poprzez zastosowanie odpowiednio zoptymalizowanych kodonów dla M-MLV RT oraz Cas9 jak również sygnałów NLS czy specjalnie przystosowanych promotorów i terminatorów dla genu *Cas9H840-M-MLV-RT* oraz kilku innych modyfikacji. Do testów wykorzystano łącznie 5 wariantów systemów utworzonych z wykorzystaniem różnej długości matrycy RT oraz

PBS w celu przetestowania zależności między sukcesywnością edycji a długością obu konstruktów [16].

Badania dokonane na materiale roślinnym w postaci komórek tetraploidalnego ziemniaka (*Solanum tuberosum*) wykazały większą efektywność edycji dokonanej z wykorzystaniem PE2 niż systemów trzeciej generacji [17]. Obserwacji tych dokonano podczas testowania efektywności edycji Pro 186 z wytworzeniem Ser w obrębie genów *StALS1* oraz *StALS2*. Zastosowano w tym przypadku pegRNA z PBS o długości 13 pz oraz matrycę dla RT o długości 15 pz. W przypadku PE3 do gotowego plazmidu pDePPE poza pegRNA-*StALS* dołączono jeszcze sgRNA, następnie oba konstrukty (PE2 oraz PE3) przeniesiono do komórek ziemniaka przy pomocy *Agrobacterium*. Po tygodniowej inkubacji na podłożu z kanamycyną, dwie trzecie zainfekowanych komórek przeniesiono do medium zawierającego 30 ng/ml chlorosulfuronu w celu weryfikacji sukcesywności dokonanej edycji, której oczekiwanym efektem byłoby nabranie odporności na inhibitory ALS. Wyniki zebrane z całego doświadczenia obejmującego 40 transgenicznym organizmów roślinnych traktowanych PE3 jak i PE2 wskazały zaledwie jedną prawidłowo wykonaną edycję w obrębie genomu zregenerowanej rośliny hodowanej na podłożu zawierającym inhibitor. W DNA roślinnym zidentyfikowano prawidłową substytucję 3 nukleotydów, ale obecną na jednym allelu oczekiwanego genu. Prawidłowa manipulacja genetyczna została osiągnięta przy pomocy PE2, ostatecznie wykazując 50% skuteczność dokonanej edycji (próba ta obejmowała 2 zregenerowane rośliny). Na podstawie dokonanych badań wykluczono twierdzenie głoszące o większej skuteczności systemu PE3 niż PE2 w obrębie organizmów roślinnych [17].

U ryżu wykonano również serie badań i testów mających na celu określenie skuteczności dokonywanych edycji w zależności od ich rodzaju, długości matrycy RT oraz PBS, a także rodzaju używanego systemu [18]. Analizie poddano zdolność systemu PE2 do wprowadzania w obrębie genu *OsPDS* drobnych insercji 2–3pz, delekcji o długości 28 pz oraz transwersji w pozycji +1, wykorzystując w tym celu pięć wariantów systemu, różniących się między sobą matrycą RT. Badania przeprowadzone zostały w każdym przypadku dla 96 prób. Analiza otrzymanych wyników wykazała 31,3% efektywność transwersji A-T przy zastosowaniu wariantu pePDS5 oraz 0% skuteczności edycji genomu (transwersja A-C) z zastosowaniem pePDS6. W przypadku insercji skuteczność dokonanych zmian wynosiła 12,5% oraz 19,8% w zależności od zastosowanej matrycy. Nie powiodła się natomiast próba wprowadzenia delekcji. Kolejna analiza dotyczyła wpływu długości matrycy RT oraz PBS na efektywność dokonywanych modyfikacji. Otrzymane wartości wykazały pewną rozbieżność wyników, dając rezultaty w postaci 3,1%, 1% bądź 0% efektywnie dokonanych edycji w zależności od zastosowanych długości sekwencji PBS oraz matrycy RT jak i sekwencji PBS. Podczas badań zaobserwowano pozytywny wynik doświadczenia warunkującego nabycie tolerancji na herbicydy poprzez sukce-

sywne wprowadzenie mutacji W2125C w obrębie genu *OsACC1* zaobserwowane u 14% prób badanych. Prawidłowa transwersja G na C wywołała oczekiwany efekt w postaci braku reakcji ze strony roślin na poddanie ich działaniu 5 μ M haloxyfop-R-metylu, nie zaobserwowano inhibicji wzrostu. Testowano również system PE3 dodając sgRNA do wcześniej stosowanych PE2. Pierwsze doświadczenie z zastosowaniem strategii cięcia w pozycji +59 wektora PE2-peWX1 oraz promotora TaU3 do ekspresji sgRNA, nie powiodło się, dając negatywny wynik dokonywanych edycji. Zastosowano więc 3 różne sgRNA, w celu sprawdzenia najbardziej optymalnego dla dokonywanych edycji cięcia, które warunkowałyby najwyższy procent wprowadzonych edycji. W badaniu wykorzystano peACC1 pegRNA, z zastosowaniem sgRNA warunkującym cięcie w pozycji -31, +78, oraz +116. Najwyższą wartość procentową (18,8%) zaobserwowano w przypadku cięcia w pozycji -31. Dwa warianty w analizie wykazały kolejno 10,4% oraz 16,7% efektywności dokonywanych modyfikacji [18].

W genomie ryżu wykonano doświadczenie, którego założeniem było wywołanie odporności na herbicydy poprzez wprowadzenie substytucji G-T w obrębie genu *OsALS* kodującego syntazę acetylomleczanową, odpowiedzialną za biosyntezę rozgałęzionych aminokwasów w genomie roślinnym [12]. Modyfikacja ta ma na celu przekształcenie tryptofanu w leucynę w łańcuchu polipeptydowym enzymu w celu wywołania odporności na BS [12]. Zabieg ten wykonano z zastosowaniem prime editor'a drugiej generacji z pegRNA, w którego skład wliczały się matryca RT o długości 15 pz oraz PBS o długości 13 pz ulegający ekspresji dzięki zastosowaniu promotora *OsU3*. Po zainfekowaniu tkanki roślinnej i inkubacji, przystąpiono do analizy otrzymanych wyników. Uzyskano 0,26-2% sukcesywności dokonywanych modyfikacji (różnica wynikająca z obecności w różnej ilości komórek nieedytowanych naczyń hodowlanych). Zespół wykonał również badania z zastosowaniem systemu PE2 w celu wprowadzenia zmian w obrębie promotora genu *OstBS1*, wpływających na zahamowanie transkrypcji tego genu, negatywnie wpływającego na powstawanie pąków bocznych. Kolejne przeprowadzone przez Butt'a i wsp. (2020) badania wskazały brak zwiększenia skuteczności/taką samą skuteczność/równą skuteczność dokonywanych edycji w obrębie genomów roślinnych po zastosowaniu PE3 w stosunku do prime editor'ów drugiej generacji. Analizy dokonano z wykorzystaniem obu typów PE, w obrębie genu *OsALS*. PE3 generacji z dodatkowym sgRNA dokonującym cięcia w pozycji +55 oraz PE2 użyto do zainfekowania tkanki. Po odpowiednim okresie inkubacji w medium zawierającym 0.75 μ M BS, zaobserwowano prawie równą liczbę zregenerowanych roślin z wbudowaną odpornością na BS zarówno w przypadku zastosowania PE3 jak i PE2 [12].

Podjęto również próbę wykonania eksperymentu z wykorzystaniem nowoczesnej technologii do manipulacji genetycznej w genomie pomidora [19]. W pierwszym

etapie badań w doświadczeniu zastosowano system PE przystosowany do komórek ssaków, wszczepiony do roślinnego binarnego wektora. W eksperymencie wykorzystano sekwencje kodującą zmodyfikowaną w wyniku licznych mutacji lucyferazę, niezdolną do pełnienia swojej funkcji. Skonstruowany system zbudowany został z dwóch rodzajów pegRNA różniących się między sobą długością PBS (13 pz oraz 14 pz) oraz cięciem podyktowanym przez sgRNA (32 nt oraz 49 nt poniżej miejsca pierwszego cięcia). Oba konstrukty wyposażone były w tej samej długości matryce RT - 23 nt. Celem doświadczenia była naprawa mutacji, efektem czego lucyferaza odzyskałaby utraconą funkcję. Wynik eksperymentu wykazał jednak dość niską efektywność edycji sięgającą 0,26%. Z tego względu wprowadzono jeszcze kilka poprawek mających zwiększyć sukcesywność dokonywanych manipulacji genetycznych - wymianę pochodzącej z genomu człowieka odwrotnej transkryptazy hMMV na roślinną pMMV i zmianę promotora na S5A, które ostatecznie spowodowały wzrost wartości sukcesywnie dokonanych zmian do 2,6%. Testowano również zdolność systemu do edycji endogennych genów - *GAI*, *ALS2* oraz *PDS1*, wykorzystując w tym przypadku siedem rodzajów pegRNA, różniących się między sobą długością matrycy. Po etapie selekcji i regeneracji zaobserwowano wstąpienie oczekiwanych modyfikacji w przypadku miejsc podyktowanych tylko przez 4 rodzaje pegRNA, dając tym samym wartość sukcesywnej edycji sięgającą od 0,025-1,66% [19].

W genomie kukurydzy badano efektywność edycji genów z pomocą odpowiednio zmodyfikowanych systemów, wykorzystując w tym celu 6 różnych zaprojektowanych wektorów, których zastosowanie odpowiadałoby za wystąpienie odporności na herbicydy [20]. Edycję przeprowadzano w obrębie genów kodujących ALS (*ZmALS1* oraz *ZmALS2*). Wprowadzono dwie różne modyfikacje, testując przy tym różne strategie dokonywanych manipulacji. Pierwszą zmianą była pojedyncza mutacja P165S. Zastosowano w tym celu system PE3 oraz PE3b w celu porównania sukcesywności dokonanych edycji. Jednocześnie badaniu poddano zdolność PE do wprowadzania mutacji podwójnej, obejmującej mutacje W542L oraz S621I, konstruując w tym celu wektory kodujące dwa warianty pegRNA oraz sgRNA. Systemy te stworzono z wykorzystaniem 2 różnych koncepcji, mających na celu zwiększenie stopnia ekspresji pegRNA. Pierwsza zakładała podwojenie liczby kaset ekspresyjnych pegRNA, druga warunkowała skonstruowanie technologii wyposażonej w system podwójnych promotorów oraz *Csy4*. Ostatnie dwa systemy wykorzystujące technologie PE3 oraz PE3b stworzono w oparciu o koncepcję wykorzystującą system podwójnych promotorów, uwzględniając jednak w tym przypadku ich zastosowanie do wprowadzenia mutacji pojedynczej P165S. Tak powstałe technologie wykorzystano do zainfekowania genomu kukurydzy. W wyniku tego postępowania otrzymano 7 z 16 linii komórkowych z sukcesywnie wprowadzoną modyfikacją S621I (wprowadzoną z

wykorzystaniem systemu z podwójnym systemem kaset ekspresyjnych). Jedna z transgenicznymi liniami wykazała również sukcesywnie dokonaną homozygotyczną edycję na obu genach. Natomiast próby edycji określonych mutacji z zastosowaniem wektorów obdarzonych w system Csy4 oraz z wykorzystaniem systemów PE3 i PE3b odpowiedzialnych za mutację 165S nie powiodły się [20]. Wyniki wykonanych badań potwierdziły jednak zdolność systemów do dokonywania jednocześnie dwóch nieallelicznych edycji w obrębie jednego genomu.

Wszystkie wyżej opisane badania wykazały zdolność systemów do wprowadzania oczekiwanych manipulacji genetycznych, jednak ze względu na wciąż ograniczoną wiedzę na ten temat oraz niskie wartości sukcesywnie wykonanych edycji, technologie PE wciąż wymagają ulepszenia i sporego nakładu pracy.

BADANIA NA MATERIALE ZWIERZĘCYM

Pierwsze badania z wykorzystaniem systemów PE wykonano również na organizmach zwierzęcych. Przeprowadzono analizy w celu opracowywania najbardziej optymalnej i najbardziej skutecznej metody do wykonywania modyfikacji genetycznych w obrębie organizmów zwierzęcych.

Weryfikacji poddano zdolność do wprowadzania modyfikacji w genach *Ar* oraz *Hoxd13* w obrębie genomu myszy, testując przy tym strategię systemu PE3 oraz PE3b [21]. Wstępny etap analiz wymagał przetestowania systemu w warunkach *in vitro*. W tym celu skonstruowano kilka wariantów systemów wykonujących 3 docelowe transwersje: G-C i G-T w obrębie *Hoxd13* oraz G-T w genie kodującym receptor androgenowy (*Ar*). W doświadczeniu zastosowano różnej długości matryce RT liczące 10–20 nt oraz PBS o długości 10–17 nt, w celu wynalezienia najbardziej optymalnego wariantu konstruowanego systemu. Wyniki analiz wykazały największą skuteczność po zastosowaniu systemów z matrycą o długości 14–17 nt oraz sekwencją PBS zbudowaną z 12-, 13- bądź 16 nt. Mniejszy stopień prawidłowo dokonanych edycji zaobserwowano w przypadku strategii PE3b, dlatego też zdecydowano się na zastosowanie technologii PE3 do dalszych analiz. W kolejnym etapie przystąpiono do badań *in vivo* wykorzystując w tym celu mysie embriony, do których wszczepiono odpowiednio przystosowane systemy z rezultatem 44% prawidłowo dokonanej edycji G-C oraz 75% skutecznie wprowadzonej modyfikacji G-T w obrębie genu *Hoxd13* u badanych blastocyst. Następnie embriony przeniesiono do macic matek zastępczych. Ostateczny wynik badania potwierdził prawidłowo dokonaną transwersję G-C u 8 spośród 30 otrzymanych myszy, natomiast u 2 z 19 badanych osobników zaobserwowano prawidłowo wprowadzoną modyfikację G-T (gen *Hoxd13*) [21].

Genom myszy został przebadany również pod względem wszystkich 3 strategii PE (PE2, PE3 oraz PE3b) wykorzystanych w celu wprowadzenia edycji w obrębie

genów *Dnmt1* oraz *Chd2* [22]. W doświadczeniu zastosowano chemicznie zszyntetyzowane i zmodyfikowane pegRNA oraz sgRNA, które następnie wszczepiono embrionom myszy. Sukcesywnie dokonane modyfikacje zaobserwowano w przypadku zastosowania strategii PE3, dając ostateczne rezultaty w postaci 47,4% sukcesywnie wprowadzonych modyfikacji w obrębie *Chd2* oraz 41,3% prawidłowych modyfikacji w przypadku *Dnmt1*. W obu wariantach zaobserwowano jednak nieoczekiwane mutacje typu indel, jedynie niewielki procent osobników nie wykazał ich obecności (13% dla *Dnmt1* oraz 10,5% dla *Chd2*). Wykorzystanie technologii PE2 w celu dokonania modyfikacji w obrębie tych samych genów wykazało natomiast znacznie niższy procent efektywnie wprowadzonych mutacji. Zaobserwowano 2 zamierzone modyfikacje w obrębie genu *Dnmt1* spośród 22 badanych oraz 5 w przypadku genu *Chd2* spośród 25 badanych embrionów. Edycja z zastosowaniem tej strategii nie wykazała natomiast obecności mutacji typu indel. Zastosowanie technologii PE3b przyniosło znaczny spadek częstości nieoczekiwanych mutacji w stosunku do PE3 oraz nieco wyższy procent edycji dokonanych w docelowym *loci* (91,7% w przypadku *Dnmt1* oraz 47,5% *Chd2*) [22].

U muszki owocowej testowano systemy PE2 oraz PE3 w celu sprawdzenia zdolności nowoczesnej technologii do wprowadzania oczekiwanych edycji [23]. Do badań z zastosowaniem PE2 wykorzystano komórki z linii S2R+ PT5. Celem tego doświadczenia było dokonanie insercji odcinka o długości 23 pz w obrębie genu *ebony*. Analiza PCR wskazała efektywność dokonanej modyfikacji sięgającą 0,42% w przypadku zastosowania specjalnego systemu ekspresji Gal4/UAS, w którym do ekspresji PE2 dochodzi w przypadku obecności *pACT-Gal4* (sygnał ulega w tym przypadku amplifikacji) oraz 0,006% z wykorzystaniem systemu wykorzystującego *Actin5c* jako promotor. Kolejne przeprowadzone modyfikacje obejmujące *loci ebony* miały na celu wprowadzenie kodonu stop przy zastosowaniu strategii PE3. Wyniki doświadczenia wskazały na 6% efektywność dokonanej edycji. To samo doświadczenie przeprowadzone z zastosowaniem technologii PE2 przyniosło lepsze rezultaty, dając tym samym 8,4% efektywnie dokonanych edycji przy jednocześnie mniejszej częstości występowania błędów w postaci mutacji typu indel. Kolejna analiza obejmowała testowanie systemów PE w warunkach *in vivo*. Badaniu poddano różne geny warunkujące łatwe w obserwacji efekty fenotypowe. Za pomocą PE2 oraz PE3 wprowadzono modyfikacje mające na celu wywołać wystąpienie niedojrzałego kodonu stop w obrębie genów warunkujących umaszczenie *ebony*, biały kolor oczu oraz forky. Największy procent efektywności dokonanych edycji wykazała strategia PE3, procent sukcesywnie wprowadzonych zmian oszacowano na 35,2% w przypadku *ebony*, 11,6% w przypadku genu *white* oraz 21,9% w genie *forky* [23].

Pierwsze badania dotyczące wykorzystania systemu w celu naprawy błędów genetycznych obecnych w komórkach ludzkich zostały przeprowadzone przez Anzalone (2019) na komórkach z linii HEK293T z zastosowaniem PE w leczeniu schorzeń tj. choroba Taya-Sachsa czy też anemia sierpowata. Dodatkowo badaniom poddano inne linie komórkowe tj. K562, U2OS, HeLa, w celu sprawdzenia zdolności systemów do wprowadzania oczekiwanych mutacji w liniach innych niż HEK293T [6]. W komórkach z linii HEK293T wprowadzono mutację HBB E6V, odpowiadającą za wystąpienie anemii sierpowatej. Zabieg ten wykazał się 44% skutecznością warunkując powstanie genomu obdarzonego wadliwą mutacją (Matsoukas, 2020). Po wytworzeniu modelu chorobowego przystąpiono do naprawy wcześniej dokonanych modyfikacji przy zastosowaniu technologii PE3. Efektem tego działania otrzymano linie obdarzone oczekiwaną modyfikacją (zawierające HBB typu dzikiego). Każde z 14 wykorzystanych pegRNA wywołało oczekiwany rezultat z różną efektywnością (26–52%) oraz z częstością mutacji indel sięgającą $2,8 \pm 0,8\%$. Zastosowanie cichych mutacji w obrębie PAM zagwarantowało jeszcze większą specyficzną i dokładność systemu [6,7]. Wykonano również badania nad potencjalnym wykorzystaniem systemu w celu naprawy mutacji wywołującej chorobę Tay'a-Sachs'a w pierw dokonyjąc insercji 4 pz w genie *HEXA* wywołujących efekt chorobowy. Analiza wprowadzonych modyfikacji wykazała niski procent mutacji indel (0,8%) przy jednoczesnej efektywności sięgającej 31% [7]. Następnie w celu naprawy wcześniej dokonanej mutacji w postaci gromadzenia się gangliozydu w komórkach nerwowych mózgu zastosowano technologie PE3 oraz PE3b wykorzystując w tym celu 3 różne sgRNA oraz ponad 40 wariantów pegRNA. Spośród wykorzystanych pegRNA 19 wykazało sukcesywność równą bądź większą niż 20% [6]. Największa sukcesywność wykazała strategia PE3b, dzięki której najwyższy procent efektywnie dokonanej edycji sięgał 33% [7]. Kolejne doświadczenia z zastosowaniem pozostałych 3 linii komórkowych potwierdziły zdolność systemu do wprowadzania oczekiwanych modyfikacji w genomie, wskazując jednocześnie największą sukcesywność edycji w obrębie komórek HEK293T [6].

Analizom poddano również użyteczność systemu w celu wprowadzania modyfikacji w obrębie komórek hiPS (Human Induced Pluripotnt Stem Cells – ludzkie indukowane komórki macierzyste) [24]. Doświadczenie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem komórek z linii AAVS1-eGFP hiPS oraz HEK293T-EGFP (kontrola), obdarzonych pojedynczą kopią genu *GFP*, w których przy pomocy 3 różnych pegRNA (różnica w długości PBS), miała nastąpić substytucja dwóch par zasad z wytworzeniem tyrozyny zamiast tryptofanu. Rezultatem takiej modyfikacji było wytworzenie CFP w badanej populacji HEK293T-EGFP z efektywnością sięgającą nawet do 6% poprawnie dokonanej edycji, przy czym największa wartość sukcesywnie wprowadzonych zmian zaobser-

wowano w przypadku zastosowania pegRNA z najkrótszą sekwencją PBS (11 nt), a najniższy procent wykazało pegRNA z najdłuższą sekwencją PBS (15 nt). W przypadku komórek hiPS najwyższy procent prawidłowo wprowadzonych modyfikacji wynosił 7,5%. Przeprowadzone doświadczenie dało więc pozytywny wynik wykazując użyteczność systemu w celu wprowadzania edycji w komórkach hiPS [24].

Dokonano również porównania efektywności PE2 w stosunku do częstości występowania mutacji typu indel generowanych przez nukleazę Cas9 w komórkach linii HEK293T [25]. W doświadczeniu zastosowano 6 strategii wprowadzania modyfikacji przy użyciu systemu PE2 obejmujących delecję bądź insercję pojedynczego nukleotydu, delecję bądź insercję 3 nukleotydów oraz dwa różne typy substytucji pojedynczego nukleotydu. Zaobserwowano znacznie mniejszy procent błędów w przypadku wykorzystania systemu PE w stosunku do Cas9 oraz większą sukcesywność dokonanych edycji z wykorzystaniem systemu Cas9. Osiągnięto rezultaty w postaci $9,1 \pm 2,1\%$ sukcesywnie wprowadzonych insercji, $10,5 \pm 3,4\%$ prawidłowo wykonanych delecji oraz $15,6 \pm 3,3\%$ udanych substytucji z zastosowaniem technologii PE2. Prowadzono również badania nad specyficzną systemu PE2, analizując przy tym jego zdolność do tolerowania niedopasowania pomiędzy sekwencją docelową a spacer'em. Badania wykazały mniejszą tolerancję niedopasowania PE w stosunku do Cas9, potwierdzając tym samym większą dokładność systemów PE. Przeprowadzona analiza stosunku długości sekwencji PBS oraz matrycy RT do specyficzności wykazała brak wpływu długości matrycy RT na specyficzność PE2 [25].

System PE3 przebadano również pod względem wprowadzania oczekiwanych mutacji w organoidach stworzonych z dorosłych komórek macierzystych pobranych od pacjentów, w celu generowania modeli chorobowych oraz edycji genów warunkujących występowanie chorób [26]. Pierwszej modyfikacji dokonano w genie *CTNNB1* kodującym β -kateninę, w obrębie, którego obserwuje się częste występowanie mutacji odpowiadających za inicjację kancerogenezy, w szczególności w przypadku raka wątroby. Edycja miała polegać na wprowadzeniu delecji nie prowadzącej do przesunięcia ramki odczytu. W doświadczeniu zastosowano różnej długości sekwencje PBS oraz matryce RT. Analiza otrzymanych wyników potwierdziła obecność oczekiwanej mutacji w badanych komórkach. Następnie wprowadzono mutację ABCB11^{D482G} w obrębie organoidów wątrobowych, odpowiedzialną za wystąpienie deficytu BSEP (bile salt export pump – deficytu pomp eksportu soli żółciowych/kwasów). Prawidłowo wprowadzoną mutację zaobserwowano w 20% hepatocytów. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdziły użyteczność systemów PE3 w celu generowania modeli chorobowych. Kolejnym etapem badań było wykonanie doświadczeń mających na celu wykorzystanie PE3 do wprowadzania mutacji w obrębie wadliwych genów, warunkujących wystąpie-

nie choroby. Przystąpiono do wprowadzenia insercji obejmującej 3 nukleotydy w obrębie 7 egzonu w genie kodującym DGAT1 (ang. *diacylglycerol-acyltransferase 1*) – enzym odpowiedzialny za przekształcenie diacyloglicerolu oraz Acylo-CoA do triacyloglicerolu, co prowadzi do włączenia kwasów tłuszczowych do kropelek lipidowych. Mutacje obejmujące gen kodujący DGAT1 prowadzą do upośledzenia jego funkcji, czego efektem jest lipotoksyczność i śmierć komórek, objawiająca się u chorych w postaci wrodzonej biegunki. Zabieg wprowadzenia brakujących nukleotydów zakończył się sukcesem, warunkując tym samym ekspresję dojrzałego enzymu DGAT1. Następnie wykonano doświadczenie mające na celu usunięcie duplikacji pojedynczego nukleotydu w genie *ATP7B*, odpowiedzialnej za wystąpienie choroby Wilsona, w wyniku której proces odkładania się miedzi w organizmie może prowadzić do marskości wątroby, w skrajnych przypadkach nawet do przeszczepu. Badania przeprowadzono na organoidach wątrobowych. Wyniki potwierdziły obecność sukcesywnie dokonanej edycji w przypadku jednej z wykonywanych prób. Badania wykazały użyteczność systemów PE3 w celu naprawy błędów genetycznych prowadzących do powstawania chorób [26].

Pojawiła się również idea wykorzystania systemu w celu leczenia osób chorujących na GSD (glikogenoza) typu pierwszego [27]. Na podstawie analizy częstości mutacji warunkujących występowanie choroby, wykonanej na 57 pacjentach narodowości tureckiej, zaproponowano wykorzystanie systemu PE3 w celu leczenia tego schorzenia. Przedstawiono wizję potencjalnego Prime Editor'a skonstruowanego w odpowiedzi na pojedyncze substytucje nukleotydów warunkujące ostatecznie deficyt fosfatazy glukozowej odpowiedzialnej za metabolizm glukozy w organizmie. Jako alternatywę przedstawiono możliwość dostarczania odpowiednio skonstruowanego mRNA warunkującego ekspresję brakującego enzymu. W pracy skupiono się w szczególności na mutacji R83C/H, uznanej za najbardziej powszechną modyfikację w genie *G6PC*, stanowiącą blisko 60% mutacji obserwowanej wśród grupy badanej. Wizja wykorzystania PE3 w celu walki z GSD jest jedynie hipotezą, która wymaga przeprowadzenia odpowiednich badań *in vivo* i *in vitro* w celu odpowiedniej optymalizacji oraz potencjalnego rozpatrzenia technologii w aspekcie terapeutycznym [27].

PIŚMIENNICTWO

- Marzec M, Braszewska-Zalewska A, Hensel G (2020) Prime editing: a new way for genome editing. *Trends Cell Biol* 30(4): 257–259
- Yan J, Cirincione A, Adamson B (2020) Prime editing: precision genome editing by reverse transcription. *Mol Cell* 77(2): 210–212
- Hassan MM, Yuan G, Chen J, Tuskan GA, Yang X (2020) Prime editing technology and its prospects for future applications in plant biology research. *BioDesign Res* 2020: 9350905
- Yang L, Yang B, Chen J (2019) One prime for all editing. *Cell* 179(7): 1448–1450
- Abdullah, Jiang Z, Hong X, Zhang S, Yao R, Xiao Y (2020) CRISPR base editing and prime editing: DSB and template-free editing systems for bacteria and plants. *Synth Syst Biotechnol* 5(4): 277–292
- Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, Sousa AA, Koblan LW, Levy JM, Chen PJ, Wilson C, Newby GA, Raguram A, Liu DR (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576(7785): 149–157
- Matsoukas IG (2020) Prime editing: genome editing for rare genetic diseases without double-strand breaks or donor DNA. *Front Genet* 11: 528
- Kantor A, McClements M E, & MacLaren R E (2020) CRISPR-Cas9 DNA base-editing and prime-editing. *Int J Mol Sci* 21(17): 6240
- Cohen J (2019) Prime editing promises to be a cut above CRISPR. *Science* 366(6464): 406
- Li H, Li J, Chen J, Yan L, Xia L (2020) Precise modifications of both exogenous and endogenous genes in rice by prime editing. *Mol Plant* 13(5): 671–674
- Hosfield DJ, Mol CD, Shen B, Tainer JA (1998) Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. *Cell* 95(1): 135–146
- Butt H, Rao GS, Sedeek K, Aman R, Kamel R, Mahfouz M (2020) Engineering herbicide resistance via prime editing in rice. *Plant Biotechnol J* 18(12): 2370–2372
- Hua K, Jiang Y, Tao X, Zhu JK (2020) Precision genome engineering in rice using prime editing system. *Plant Biotechnol J* 18(11): 2167–2169
- Yourik P, Fuchs RT, Mabuchi M, Curcuro JL, Robb GB (2019) *Staphylococcus aureus* Cas9 is a multiple-turnover enzyme. *RNA* 25(1): 35–44
- Perotti VE, Larran AS, Palmieri VE, Martinatto AK, Alvarez CE, Tusca D, Permingeat HR (2019) A novel triple amino acid substitution in the EPSPS found in a high-level glyphosate-resistant *Amaranthus hybridus* population from Argentina. *Pest Manag Sci* 75(5): 1242–1251
- Tang X, Sretenovic S, Ren Q, Jia X, Li M, Fan T, Yin D, Xiang S, Guo Y, Liu L, Zheng X, Qi Y, Zhang Y (2020) Plant prime editors enable precise genome editing in rice. *Mol Plant* 13(5): 667–670
- Perroud PF, Guyon-Debast A, Veillet F, Kermarrec MP, Chauvin L, Chauvin JE, Gallois JL, Nogué F (2022) Prime editing in the model plant *Physcomitrium paten* and its potential in the tetraploid potato. *Plant Sci* 316: 111162
- Xu R, Li J, Liu X, Shan T, Qin R, Wei P (2020) Development of plant prime-editing systems for precise genome editing. *Plant Commun* 1(3): 100043
- Lu Y, Tian Y, Shen R, Yao Q, Zhong D, Zhang X, Zhu JK (2021) Precise genome modification in tomato using an improved prime editing system. *Plant Biotechnol J* 19(3): 415–417
- Jiang YY, Chai YP, Lu MH, Han XL, Lin Q, Zhang Y, Zhang Q, Zhou Y, Wang XC, Gao C, Chen QJ (2020) Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. *Genome Biol* 21(1): 257
- Liu Y, Li X, He S, Huang S, Li C, Chen Y, Liu Z, Huang X, Wang X (2020) Efficient generation of mouse models with the prime editing system. *Cell Discov* 6: 27
- Aida T, Wilde JJ, Yang L, Hou Y, Li M, Xu D, Lin J, Qi P, Lu Z, Feng G (2020) Prime editing primarily induces undesired outcomes in mice. [bioRxiv 20200806239723](https://doi.org/10.1101/20200806239723);
- doi: <https://doi.org/10.1101/20200806239723>
- Bosch JA, Birchak G, Perrimon N (2020) Precise genome engineering in *Drosophila* using prime editing. *PNAS* 118(1): e2021996118
- Sürün D, Schneider A, Mircetic J, Neumann K, Lansing F, Paszkowski-Rogacz M, Hänchen V, Lee-Kirsch MA, Buchholz F (2020) Efficient generation and correction of mutations in human iPS cells utilizing mRNAs of CRISPR base editors and prime editors. *Genes* 11(5): 511
- Kim DY, Moon SB, Ko JH, Kim YS, Kim D (2020) Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells. *Nucleic Acids Res* 48(18): 10576–10589
- Schene IF, Joore IP, Oka R, Mokry M, van Vugt AHM, van Boxtel R, van der Doef HPJ, van der Laan LJW, Versteeg MMA, van Hasselt

PM, Nieuwenhuis EES, Fuchs SA (2020) Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. *Nat Commun* 11(1): 5352
28. Mantas A, Ucaryilmaz C, Demir BS, Guler FN, Mengi S, Inci CC, Kilic O, Babar HA, Ceylaner G, Ceylaner S, Tastan C (2020) Analyzing the

distribution of mutations for glycogen storage disease type 1a in turkey and suggested gene therapy methods for its treatment. *Preprints.org* 2020090723; <https://doi.org/10.20944/preprints202009.0723.v1>

Prime Editing – a new method of editing genes

Dalia Blicharska¹, Izabela Szućko-Kociuba^{1,2}, Ewa Filip^{1,2}, Anna Orłowska¹, Lidia Skuza^{1,2}✉

¹Institute of Biology, University of Szczecin

²Center for Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biology, University of Szczecin

✉corresponding author: lidia.skuza@usz.edu.pl

Keywords: Prime Editing, pegRNA, genetic engineering, off-target

ABSTRACT

The prime editing method introduces the expected manipulations within a given genome with a Cas9-nicase and pegRNA structure and a reverse transcriptase, which is responsible for the synthesis of the segment, which is then incorporated into the edited strand. This technique is based on the previously discovered CRISPR/Cas9 method. It differs from CRISPR/Cas9 in the absence of double cracks within the DNA helix, which is due to its complex structure, including the presence of additional elements, i. e. the reverse transcriptase and the matrix within the pegRNA. PE is used to modify the DNA double helix. The work deals mainly with the creation and improvement as well as testing of the modern Prime Editing method. Information on the structure and functioning of the system is provided, as well as the research carried out so far with the use of PE, carried out within the genomes of cells derived from plant, animal, and human organisms, is described. The paper also contains information on the potential benefits and hopes related to the use of this innovative method.

PRIME EDITING- nowa metoda edycji genów

Trzy generacje
Prime Editor'ów

Testowanie oraz
wdrażanie nowej
generacji
mechanizmu do
manipulacji
genetycznej

Sposób działania
systemu oraz
główne elementy
składowe

Możliwości
zastosowania
Prime Editing'u

Badania z
zastosowaniem
Prime Editing'u