

CRISPR-Cas9 对人类线粒体基因组微同源区切割后产生新生变异

王邦, 谷峰

温州医科大学附属眼视光医院, 眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027

线粒体是真核细胞的一种细胞器, 其含有线粒体基因组(mtDNA, mitochondrial DNA), 是细胞能量制造、多种信号转导及重要代谢物合成的中心。人类 mtDNA 长约 16.6 kb, 编码 13 个呼吸链所必需的蛋白以及 24 个蛋白翻译必需的 RNA。人类 mtDNA 的突变会导致很多种重大疾病, 比如神经退行性疾病、糖尿病、癌症、心血管疾病等^[1]。因此, 线粒体相关疾病是人类重大疾病的重要组成部分。细胞由于有氧呼吸作用产生的氧自由基簇(reactive oxygen species, ROS), 无时无刻不在损伤 mtDNA, 进而诱发 mtDNA 突变。目前利用靶向突变 mtDNA 的核酸酶(如 mito-ZFNs/TALENs, mitochondria-targeted zinc finger nucleases/transcription activator-like effector nucleases)可以有效去除带有突变的线粒体。这在线粒体疾病临床治疗方面具有重要应用前景^[2~4]。这个过程具体包括: 利用 mito-ZFNs/TALENs 切割突变的 mtDNA, 从而产生 DNA 双链断裂, 由此导致突变的 mtDNA 降解, 这样达到去除致病 mtDNA 的目的。例如, Carlos T. Moraes 团队利用 AAV9 进行在体递送 mito-TALENs 到线粒体, 其可特异性切割含有突变 m.5024C>T (*tRNA^{Ala}* 基因)的小鼠 mtDNA, 实现了在肌肉和心脏细胞线粒体中 *tRNA^{Ala}* 表达量的恢复^[3], 有望能治疗该突变导致的心脏疾病。与此类似, 另一个相似工作, 同样是修复能导致心脏疾病的突变 m.5024C>T, 只是使用了 mito-ZFNs^[4]。说明多种核酸酶均可以在哺乳动物线粒体中发挥活性切割。而在水稻和油菜中, 利用特异性切割 mtDNA 上胞质雄性不育相关基因 *orf79* 和 *orf125*, 实现了以同源重组方式对 mtDNA 进行编辑, 恢复了雄性可育性^[5]。同样在 TALE (transcription activator-like effector) 基础上, 融合来自于新洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia*

cenocepacia)的毒素蛋白——胞嘧啶核苷脱氨酶 DddA (double-stranded DNA deaminase toxin A), 使 DddA 能在 TALE 的引导下靶向人类 mtDNA, 催化胞嘧啶碱基(C)转换为尿嘧啶(U), 并在其后 mtDNA 复制中转为胸腺嘧啶(T), 从而实现 mtDNA 的定点碱基转换^[6]。

然而暴露在 ROS 的人类 mtDNA 不仅有碱基官能团的损伤, 还有双链断裂的损伤。在产生双链断裂后, 除了目前被领域广泛认可的 mtDNA 丢失以外, 切割后的 mtDNA 是否能够以某种方式留在细胞中, 目前仍然不清楚。该问题是线粒体生物学中一个非常重要的基础科学问题, 因为该问题关系到线粒体基因组到底有没有 DNA 修复。如果有, 是如何修复的? 同时, 该问题的回答也具有重要临床意义, 因为其关系到以基因组编辑为基础的线粒体临床治疗可能存在潜在的副作用。

针对上述问题, 本团队利用线粒体靶向的信号肽融合了来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的 Cas9 (mito-SaCas9)^[7], 测试了多个 mtDNA 位点, 令人惊讶地发现有些位点会产生小片段缺失或插入(图 1)。进一步的分析发现这些序列具有一定的序列特异性, 即具有微同源序列(5~25 bp)的区域在经过切割后可以形成突变。随后通过限制性内切酶将突变的序列进行富集, 利用一代测序能够检测到缺失或插入突变。且由此导致的 mtDNA 突变随着细胞分裂, 可以稳定地遗传给子代细胞。但是, 利用只能对 DNA 双链中产生缺口的缺口酶 Cas9 (Cas9 nickase)进行作用, 结果显示不能使 mtDNA 产生突变, 这些结果提示突变是由于线粒体中双链断裂修复途径诱发所导致(图 1)。

如何进一步提高突变的发生率呢? 通过联合多重单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA)以及使用

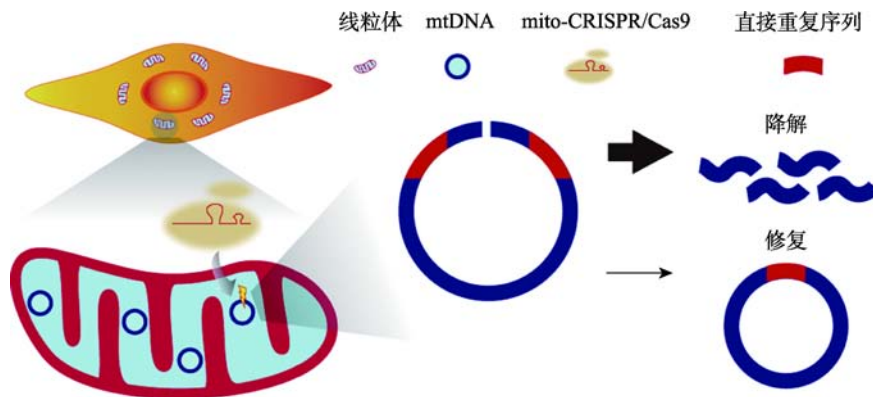


图 1 线粒体基因组微同源区域双链断裂诱发的新生突变

Fig. 1 De novo mutagenesis induced by double-stranded breaks at the microhomologous regions of mtDNA

线粒体基因组微同源区域(由 5~25 bp 直接重复序列构成, 图中红色标记片段)在 mito-CRISPR/Cas9 切割产生双链断裂后, 大部分会走入线粒体降解途径; 少量在线粒体基因组双链断裂修复机制的作用下, 被修复, 同时可能产生缺失或插入的新生突变。

双链断裂修复的小分子抑制剂, 可以显著提高突变的发生率(0.01%~0.03%), 显示 mtDNA 双链断裂修复过程中, 突变发生的可塑性。此项工作为线粒体基因组 DNA 修复机制提供了新的认识, 并对目前利用基因编辑技术治疗线粒体遗传病具有重要参考价值。需要指出的是, 本研究中 mtDNA 突变的效率远低于前文所提及的 DddA 介导的单碱基编辑效率^[6], 表明在线粒体中 mtDNA 双链断裂诱导的修复活性不如碱基切除修复。未来开发高效、简便的 mtDNA 编辑工具仍然是线粒体基因编辑的重要研究内容。该工作于 2020 年 11 月 26 日提前在线发表在 *Science China Life Sciences* (<http://engine.scichina.com/doi/10.1007/s11427-020-1819-8>)。温州医科大学王邦博士为该论文第一作者, 谷峰研究员为论文通讯作者。该研究得到了国家重点研发计划和浙江省自然科学基金资助。

参考文献(References):

- [1] Russell OM, Gorman GS, Lightowlers RN, Turnbull DM. Mitochondrial diseases: Hope for the future. *Cell*, 2020, 181(1): 168–188. [DOI]
- [2] Reddy P, Ocampo A, Suzuki K, Luo JP, Bacman SR, Williams SL, Sugawara A, Okamura D, Tsunekawa Y, Wu J, Lam D, Xiong X, Montserrat N, Esteban CR, Liu GH, Sancho-Martinez I, Manau D, Civico S, Cardellach F, Del Mar O'Callaghan M, Campistol J, Zhao HM, Campistol J, Moraes CT, Belmonte JCI. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, 2015, 161(3): 459–469. [DOI]
- [3] Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, Nissanka N, Miranda M, Pinto M, Williams SL, Larsson NG, Stewart JB, Moraes CT. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1696–1700. [DOI]
- [4] Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, Costa ASH, Gaude E, Powell CA, Van Haute L, McCann BJ, Rebelo-Guimaraes P, Cerutti R, Zhang L, Rebar EJ, Zeviani M, Frezza C, Stewart JB, Minczuk M. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo*. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1691–1695. [DOI]
- [5] Kazama T, Okuno M, Watari Y, Yanase S, Koizuka C, Tsuruta Y, Sugaya H, Toyoda A, Itoh T, Tsutsumi N, Toriyama K, Koizuka N, Arimura SI. Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nat Plants*, 2019, 5(7): 722–730. [DOI]
- [6] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, Bosch DE, Kotrys AV, Raguram A, Hsu F, Radey MC, Peterson SB, Mootha VK, Mougous JD, Liu DR. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. *Nature*, 2020, 583(7817): 631–637. [DOI]
- [7] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu XB, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546): 186–191. [DOI]