

DOI: 10.13376/j.cblls/2022158

文章编号: 1004-0374(2022)11-1442-14

# 新型RNA编辑系统在动物基因功能研究中的应用

李登銮, 王 刚\*

(广州大学生命科学学院精准基因编辑工程中心, 广州 510006)

**摘要:** RNA 编辑指遗传信息转录后对 RNA 核苷酸序列的改变, 包括碱基替换、核苷酸的插入和删除等过程。RNA 编辑系统可分为基于 CRISPR-Cas13 和非 CRISPR-Cas13 RNA 编辑系统两种, 该文分别阐述了两种系统的分子机制和编辑过程, 并总结了新型 RNA 编辑系统的优势、缺陷以及应用价值。

**关键词:** RNA 编辑; CRISPR-Cas13; 非 CRISPR-Cas13; 碱基编辑

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A

## Application of novel RNA editing tools in the research of animal gene functions

LI Deng-Luan, WANG Gang\*

(Precise Genome Engineering Center, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** RNA editing can be broadly defined as post-transcriptional modification of RNA nucleotide sequence, including base replacement, insertion and deletion. RNA editing systems can be divided into two kinds of RNA editing systems based on CRISPR-Cas13 included or not. This paper described the molecular mechanism and editing process of these two systems, and summarized the advantages, defects and application of the new RNA editing system.

**Key words:** RNA editing; CRISPR-Cas13; non-CRISPR-Cas13; base editing

RNA 编辑广义地被定义为基因组转录后 RNA 序列中任意特异性位点碱基的改变, 不包括 RNA 拼接和多聚腺苷酸化等过程引起的变化<sup>[1-2]</sup>。大多数生物体中 RNA 序列的改变都是核苷酸的插入和缺失, 以及碱基的替换三种类型, 但其机制各不相同。在不同生物体中发生的不同改变的 RNA 编辑同样有差异性。这些最新进展使我们更好地了解 RNA 编辑系统中细胞因子之间的相似性和差异<sup>[2-3]</sup>。

### 1 不同生物体中的RNA编辑

在不同生物体中, RNA 转录后核苷酸序列的改变, 即 RNA 编辑<sup>[4]</sup>。这些编辑情况包括在线粒体基因组转录后编码的 pre-mRNA 中插入和删除尿嘧啶核苷酸<sup>[5]</sup>。

在绒泡菌属线粒体中发现了胞嘧啶核苷酸插入编辑。研究发现, 动质体目原生动物以外的生物体

线粒体中广泛存在插入类型的 RNA 编辑: 绒泡菌属、非细胞黏菌编码 ATP 合成酶亚基的线粒体 RNA 在 54 位点被插入胞嘧啶<sup>[6]</sup>; 一种类人猿原生动物的线粒体中某些 tRNA 的序列与编码它们的基因不同。这些变化包括单核苷酸替换 (U>A、U>G 和 A>G), 这些替换出现在转录后, 并具有纠正不匹配的碱基对的作用。因此, RNA 编辑可还原此区域中 tRNA 的正确配对<sup>[7]</sup>。

在高等植物线粒体和叶绿体 mRNA 以及有袋动物和大鼠的 tRNA 中发现了类似的 C-U 碱基替换。例如, 小麦线粒体中细胞色素 c 氧化酶的 II 亚基相关 mRNA 多个位置的胞嘧啶转化为尿嘧啶, 表明

收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(82271909)

\*通信作者: E-mail: wanggang.v@gzhu.edu.cn

植物线粒体中存在明显的编码异常的现象<sup>[8]</sup>。哺乳动物载脂蛋白 B mRNA (apolipoprotein B mRNA, ApoB mRNA) 中存在胞嘧啶到尿嘧啶碱基替换, 该过程由 RNA 脱氨酶催化。ApoB mRNA 中 C 到 U 编辑是哺乳动物中最早发现的 RNA 编辑现象, 而编辑 ApoB mRNA 所需的最小蛋白质复合物由载脂蛋白 B mRNA 编辑复合物-1 (apolipoprotein B mRNA editing complex-1, APOBEC-1) 和 apobec-1 互补因子 (apobec-1 complementation factor, ACF) 组成<sup>[9]</sup>; 在哺乳动物谷氨酸受体亚基 mRNA 发现的 A-I 型编辑是由于在高等生物体中广泛存在的双链 RNA 特异性腺苷脱氨酶 (adenosine deaminase acting on double-stranded RNA, ADARs) 的作用<sup>[10-12]</sup>。RNA 编辑在其他系统中的生物学意义与用于调节哺乳动物大脑中非 NMDA 谷氨酸受体的细胞选择性和电生理特征的核苷酸修饰一样重要<sup>[12]</sup>。ADARs 作用于 RNA 使得腺苷转化为肌苷, 这种 A>I 编辑不仅发生在 mRNA 的蛋白质编码区, 而且还经常发生在包含反向 Alu 重复序列的非编码区, 编码序列的编辑可以导致基因组中非编码功能蛋白的表达, 而发生在包含反向 Alu 重复序列的非编码序列的编辑的生物学意义仍然未知<sup>[13]</sup>。某些 microRNA (miRNA) 前体也被编辑, 导致成熟的 miRNA 的表达减少或功能改变。相反最近的研究表明, ADAR1 与 Dicer 酶 (双链核糖核酸内切酶) 形成复合物促进 miRNA 加工, 揭示了 ADAR1 在调节 RNA 干扰中的新功能<sup>[14]</sup>。

研究发现, CRISPR-Cas13 靶向 RNA 系统同时伴随着剪切 RNA 的作用<sup>[15]</sup>。CRISPR-dCas13 系统经过研究与 ADAR 脱氨酶形成复合物, 组成了用于可编程 A 至 I 替换的 RNA 编辑系统 (RNA editing for programmable A to I replacement, REPAIR) 实现了腺嘌呤到鸟嘌呤的碱基替换<sup>[16]</sup>; 经过对 ADAR 脱氨酶进行突变, CRISPR-dRanCas13b 与 ADAR2 脱氨酶结构域 (ADAR2 deaminase domain, ADAR2DD) 形成新的 CRISPR-Cas13 介导特定 C 到 U 替换 (RNA editing for specific C to U exchange, RESCUE) 的 RNA 编辑系统, 实现了胞嘧啶到尿嘧啶的碱基替换<sup>[17]</sup>。2019 年前后, 基于 ADAR 介导的 RNA 编辑的新型可编程系统在 RNA 编辑领域引起广泛的关注, 前后出现了多个新型系统, 例如 CRISPR-Cas 介导的 RNA 靶向系统 (CRISPR-Cas-inspired RNA targeting system, CIRTS)、CRISPR-Cas13 介导特定 C 到 U 替换 (RNA editing for specific C to U exchange, RESCUE)、招募内源性 ADAR 到特定转录本 (recruiting endogenous

ADAR to specific transcripts for oligonucleotide mediated RNA editing, RESTORE) 和利用内源性 ADAR 用于可编程 RNA 编辑 (leveraging endogenous ADAR for programmable editing of RNA, LEAPER)。这些创新型 RNA 碱基编辑平台被用于哺乳动物细胞的可编程碱基替换<sup>[18]</sup>。本文重点综述基于 CRISPR-Cas13 和非 CRISPR-Cas13 的两种新型可编程的 RNA 编辑系统 (图 1)。

## 2 基于CRISPR-Cas13系统的RNA编辑

### 2.1 CRISPR-Cas

聚集的规则间隔回文重复序列介导的蛋白系统 (clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated proteins system, CRISPR-Cas) 是来源于古细菌和细菌的适应性免疫系统。外来病毒入侵后, 细菌捕获并整合病毒基因组到 CRISPR 阵列中, CRISPR 阵列是重复的基因组序列, 包含多个重复序列、交替的半回文重复序列和“间隔”序列。当病毒再次入侵细菌, CRISPR 阵列经过加工修饰生成 CRISPR RNA (crRNA), Cas 蛋白与 crRNA 形成复合物与外来病毒遗传物质序列配对。此时, Cas 蛋白发挥核酸酶的切割作用, 从而为细菌细胞提供免疫防御机制<sup>[19]</sup>。该系统经过人工改造, 引导编程性的内切酶到目标基因, 以特定序列的方式切割内部 DNA 或者 RNA。CRISPR-Cas 系统分为两类: 第一类为多亚基效应复合物 (I、III 和 IV 型), 第二类为单蛋白效应模块 (II、V 和 VI 型)。然而, VI 型 CRISPR-Cas13 系统是 CRISPR-Cas 变体中第一个专门靶向 RNA 的系统<sup>[20]</sup>。

### 2.2 CRISPR-Cas13系统

CRISPR-Cas13 系统的作用过程分为三个阶段: 适应性阶段、CRISPR RNA (crRNA) 形成阶段、干扰阶段。适应性阶段需要获得外源 DNA 序列到 CRISPR 阵列中, 由整合酶 Cas1、Cas2 蛋白插入; crRNA 形成阶段, CRISPR 阵列转录成 pre-CRISPR-RNA (pre-crRNA), 然后由 Cas 蛋白或宿主因子处理, 生成单个成熟的 crRNA; 干扰阶段, 成熟的 crRNA 与 Cas13 蛋白形成复合物, 使 crRNA 引导扫描细胞中的核酸分子, 当 crRNA 与目标 RNA 碱基互配对时, Cas 效应复合物能够切割和促进核酸分子的降解, 有助于防止进一步感染<sup>[21]</sup>。

### 2.3 CRISPR-Cas13系统分类

最近的研究表明, Cas13 蛋白家族包括 Cas13a、Cas13b 和 Cas13d, 它们都具有天然和独特的 RNA

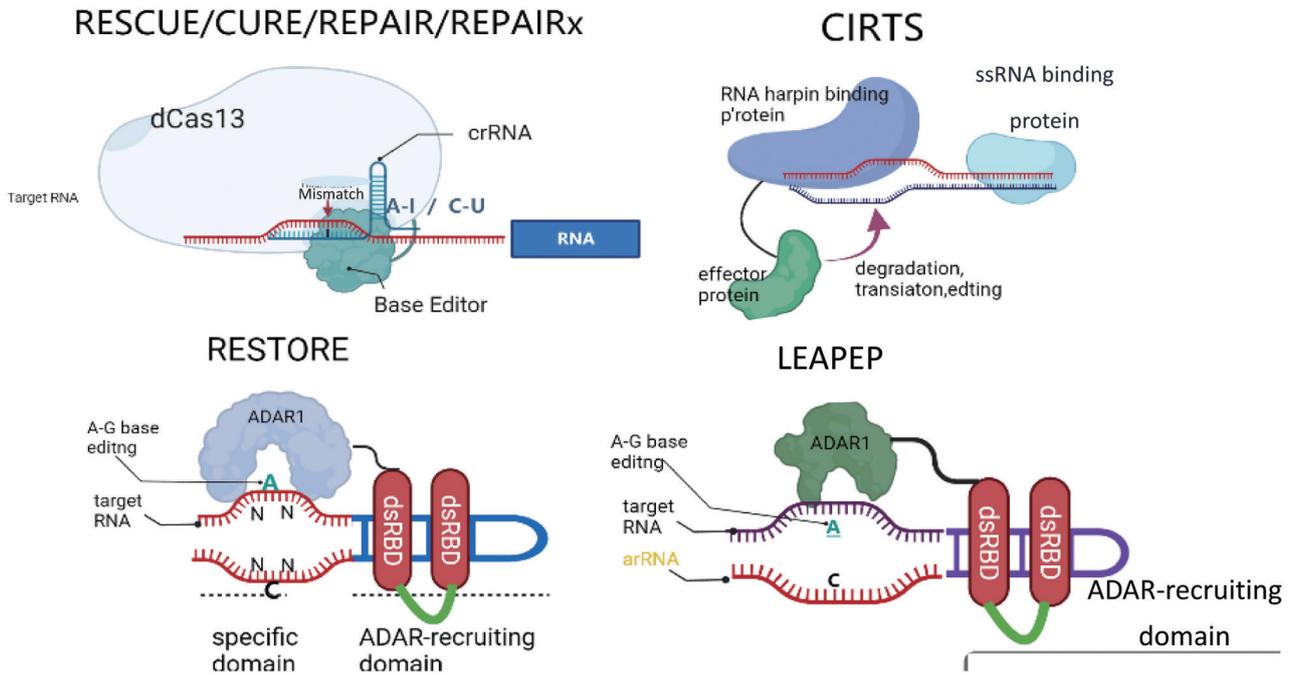


图1 非/基于CRISPR-Cas13的各种RNA碱基编辑器的编辑示意图

靶向能力。

### 2.3.1 CRISPR-Cas13a

CRISPR-Cas13a系统的主要元件有Cas1、Cas2、Cas13a、crRNA。在不同Cas13a(以前称C2c2)同源物介导的 $\beta$ -内酰胺酶(氨苄西林耐药)转录本裂解的报告系统中,来自*Leptotrichia wadei*中的Cas13a(LwaCas13a)最为活跃。LwaCas13a没有明显的原间隔区侧翼序列(protospacer flanking sequence, PFS)限制,直接重复序列长36 nt, crRNA间隔序列为28 nt,在HEK293T细胞中,利用CRISPR-LwaCas13a系统靶向敲除Gluc、KRAS和PPIB全转录本序列:所有靶向敲除Gluc的效率都超过50%,最高为83%;所有靶向敲除内源性靶点KRAS的效率最高达85%;所有靶向敲除内源性靶点PPIB的效率最高达75%。相比于RNAi靶向敲除特定基因,此系统靶向敲除效率与RNAi相当,并且脱靶敲除效率较RNAi显著降低<sup>[15]</sup>。

### 2.3.2 CRISPR-Cas13b

与CRISPR-Cas13a系统不同,CRISPR-Cas13b系统包括Csx27/Csx28、Cas13b、crRNA。Csx27、Csx28分别抑制和促进Cas13b蛋白的核酸酶活性。比较哺乳动物细胞中Cas13酶家族的RNA敲除活性发现,来自普氏菌的Cas13b同源物(Prevotellasp, PspCas13b)敲除活性最高。PspCas13b没有明显的PFS限制,直接重复序列长36 nt, crRNA间隔序

列为30 nt。在HEK293T细胞中,利用CRISPR-PspCas13b系统靶向敲除Gluc和Cluc。crRNA靶向敲除Gluc和Cluc,平均敲除效率为92.3%<sup>[15]</sup>。虽然Cas13a靶向RNA有敲除活性,但在哺乳动物细胞中,PspCas13b被证明靶向敲除RNA的效率更高、更稳定<sup>[15]</sup>。

### 2.3.3 CRISPR-Cas13d

来自黄瘤胃球菌XPD3002的RfxCas13d(*Ruminococcus flavefaciens* XPD3002, RfxCas13d)与核定位信号(nuclear localization sequence, NLS)组成CasRx(RfxCas13d-NLS)。CasRx介导的CRISPR-CasRx基因敲除相对于不同内源性转录本的RNA干扰表现出较高的效率和特异性。CasRx已被用于靶向其他内源性转录本,能够高效敲除目标RNA。CasRx可用于调节内源性转录本的剪切,并且CasRx的编码序列足够小,可以用于腺相关病毒载体(AAV)的包装。同时,CasRx在mCherry报告系统和内源性转录本上有80%~95%的编辑效率<sup>[22]</sup>。

首先,在RNA敲除试验中,CasRx在细胞核中发挥功能良好(而Cas13b更倾向于在细胞质)。这表明基于CasRx的编辑器在细胞核中保持活跃,并且脱靶效应会降低。其次,CasRx包含多个耐受ADAR2DD(E488Q)插入的环状结构,这种融合蛋白构象会产生空间位阻,减少全局脱靶编辑,但仍然保持靶向编辑活性<sup>[16,23]</sup>。与Cas13b相比,CasRx

较小 (967 aa vs 1 090 aa), 较短的 gRNA 间隔 (22 nt 和 40 nt) 足以诱导特定目标 RNA 的最大切割。CasRx 系统更紧凑的尺寸将有助于 AAV 包装, 由于 mRNA 结合的长间隔序列会干扰翻译, 短间隔序列也是可取的<sup>[24]</sup>。CasRx 比野生型 Cas13d、AfxCas13d 更有效地向 B4GALNT1, gRNA 和 pre-gRNA (gRNA 前体) 都可以介导有效的敲除 (82%)<sup>[22]</sup>。

### 2.3.4 CRISPR-Cas13X/Y

CRISPR-Cas 系统的 Cas 蛋白分为 6 个亚型和许多同源物<sup>[25]</sup>, 在未培养的 II 型和 V 型家族微生物中发现的更小的 CRISPR 系统, 进一步扩展了我们对不同 CRISPR 机制和 Cas 蛋白之间广泛共同进化的认识<sup>[26]</sup>。Cas13 是最近在 VI 型 CRISPR 系统中发现的一个单一效应物, 具有 RNA 干扰活性<sup>[27]</sup>。此外, 由于用 AAV 病毒包装外源基因大小的限制, Cas 蛋白需要足够小才能包装进 AAV<sup>[28]</sup>。在 2021 年, 杨辉课题组利用宏基因组数据集中筛选出两个较小的 CRISPR-Cas13 家族 Cas13X/Y, 并将它们设计用于哺乳动物细胞中的 RNA 敲除和 RNA 碱基编辑。Cas13X/Y 与 Cas13b 核糖核酸酶结构域相似, crRNA (CRISPR RNA) 的直接重复序列同样是在 3' 端。根据结构预测, Cas13X/Y 与其他 Cas13 相似, 也存在两个较高等真核生物和原核生物核苷酸结合结构域 (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain, HEPN)。突变 RxxxxH 序列可形成无核酸酶活性的 Cas13X/Y 蛋白 (dead Cas13X/Y, dCas13X/Y)。两个家族中靶向敲除 RNA 的效率最高的是 Cas13X.1。具有两个直接重复序列或单直接重复序列的 crRNA 前体都可以介导有效的敲除。Cas13X.1 与核定位系统 (NLS) 显著提高了 Cas13X.1 的敲除活性。Cas13X.1 敲除任意目标 RNA, 对 PFS 无活性偏倚。crRNA 的最优间隔序列长度是 30 nt, 最短限度为 15 nt。与其他同源物敲除 RNA 效率比较, Cas13X.1 和 RfxCas13d 的敲除效率略高于 LwaCas13a 和 Psp-Cas13b 靶向编辑内源性基因靶点时, 其没有附带非特异的核糖核酸酶活性 (collateral ribonuclease activity)。在体外, Cas13X.1 表现出比 RfxCas13d 和 LwaCas13a 更低的核糖核酸酶活性。

## 2.4 基于 CRISPR-Cas13 系统 RNA 碱基编辑 (A>I)

### 2.4.1 REPAIR

基于 CRISPR 系统的 DNA 碱基编辑系统 (CBEs、ABEs) 可以实现 C-T 和 A-G 两种碱基的替换, 靶向 DNA 碱基编辑是不可逆且可遗传的。而 RNA 编辑不可遗传, 所以 RNA 碱基编辑系统可更安全地应

用于基因治疗。在人类中, 最常见的 RNA 编辑类型是将腺苷转化为肌苷。这种编辑由两个 RNA 腺苷脱氨酶 (ADAR) 介导: ADAR1 和 ADAR2。因为肌苷被拼接和翻译读作鸟苷, ADAR 还可以修改拼接模式和修改氨基酸序列<sup>[13]</sup>。研究报道 REPAIR 系统能有效地对 RNA 中的腺嘌呤 (A) 进行单碱基编辑。PspCas13b 是从普雷沃氏菌属中筛选出的 Cas13b 的同源物。经过设计的一种 PspCas13b 的失活变体 (dPspCas13b) 仍然与 RNA 的特定核苷酸结合, 但缺乏剪切 RNA 的功能。PspCas13b 的失活变体融合到 ADAR2DD, 该复合体参与 RNA 转录本中 A-I 的替换<sup>[16]</sup>。通过优化 ADAR2DD 发现, 发生 ADAR2DD (E488Q) 提高了编辑活性。将 dPsp-Cas13b 与 ADAR2DD (E488Q) 结合形成了 REPAIRv1 (REPAIR version 1) 系统。为了证明 REPAIRv1 系统在哺乳动物细胞 RNA 编辑中的广泛适用性, 研究人员设计了 REPAIRv1 靶向治疗两种疾病相关突变: 伴 X 染色体肾源性尿崩症中的 878G>A (AVPR2W293X)、范可尼贫血中的 1517G>A (FANCCW506X)<sup>[16]</sup>。在贫血突变 DNA 的细胞系中, REPAIRv1 能够纠正 23% 的突变 RNA 序列。在糖尿病患者的细胞系中, REPAIRv1 能够纠正 35% 的突变 RNA 序列。REPAIRv1 靶向 Gluc 报告系统的编辑效率可达 89%, 但在靶向内源基因 PPIB 时, 其编辑效率只有 28%<sup>[16]</sup>。通过在 ADAR2 上引入新突变 (ADAR2DD-E488Q-T375G) 形成 REPAIRv2 系统, 该系统在靶向 Gluc 时, 其脱靶率约是 REPAIRv1 系统的 1/900, 但编辑效率也随之降低。升级后的 REPAIRv2 达到了 20%~40% 的预期编辑效率, 51% 的目标 RNA 没有发现显著的脱靶活性。REPAIRv2 能够将整个转录组中可检测的脱靶编辑从 18 385 减少到仅 20, 相比之前描述的 RNA 编辑平台有更高的特异性<sup>[29-30]</sup>。

### 2.4.2 REPAIRx

基因编辑系统在特异性、效率、脱靶率、编辑窗口等多个方面不断被优化形成更加有效且精确的编辑系统。Liu 等<sup>[23]</sup> 研究出新型 RNA (A>I) 的碱基编辑系统 REPAIRx。REPAIRx 系统由 REPAIR 系统优化而来。REPAIRx 系统将 REPAIR 中 dCas13b 替换为失去切割活性的 CasRx (dead CasRx, dCasRx)。将脱氨酶结构域插入到 dCasRx 的中间, 同时连接 NLS, 新创建的编辑器被称为 REPAIRx (Vx), 精确且高效。不同长度的 gRNA 和 spacer 靶向 mRNA 或核内 RNA 时, Vx 都优于其他的各种版本 (V1-V6)。Vx 系统依赖 gRNA 间隔序列 30 nt, 靶向序

列 3' 端第 17 nt 为目标编辑碱基时, 编辑效率最高。利用 GFP 报告系统靶向 PPKN 序列上 A45 时实现了 78% 的编辑, 在直接重复序列 (direct repeat, DR) 删除后, 编辑效率大幅降低到只有 6%, 这也表明了 Vx 系统发挥编辑功能时依赖 DR 的存在。在 N2a 细胞中靶向内源性转录本 PPIB, Vx 在两个测试位点的编辑效率分别为 36% 和 46%, 都大于等于其他版本 (V1-V6)。同时靶向内源性转录本 Gusb, Actb Vx 系统普遍大于其他版本或相当 (V1)。Vx 系统表现出高于其他版本的编辑效率, 并且 Vx 系统在靶向 gRNA 存在的情况下, 在整个转录本中, 测序脱靶效应数最低 (721)。与其他四个编辑平台 (分别基于 MS2 外壳蛋白 (MS2 coat protein, MCP)、外源全长 ADAR (exogenous full-length ADAR, ExoADAR) 和长反义寡核苷酸、CIRTS) 比较, Vx 在其他编辑系统的非代表性位点进行测试时, 表现优于其他编辑系统。在其他编辑系统的代表性位点进行测试时, 除利用 151 nt 寡核苷酸、MCP-ADAR2DD-NES 和 CIRTS 分别靶向编辑 PPIB5'UTR、RAB7A 和荧光素酶报告基因上的代表性位点外, Vx 使用通用 50-17gRNA 都比使用优化 gRNA 的其他编辑系统更活跃<sup>[22]</sup>。MCP 平台由 Tsukahara 等人首创, 最近由 Azad 等人优化<sup>[31]</sup>。优化后的编辑器为 MCP-ADAR2DD-NES 和 MCP-ADAR2DD-NLS (分别位于细胞质和细胞核中), 细胞质版本的编辑效率比核版本高 2 倍。在 PRKN 报告基因和 PPIB 位点, Vx (60% 和 77%) 系统编辑效率分别是 CIRTS (26% 和 41%) 的 2 倍。

### 2.4.3 xABE、mxABE

minidCas13X.1 (445 aa) 和 dCas13X.1 (775 aa) 与高保真的 ADAR2DD (E488Q/T375G) 融合形成 A>I RNA 碱基编辑器 (xABE、mxABE)。相较于 REPAIR 系统靶向内源性靶点, xABE/mxABE 编辑器可以更有效地实现依赖于 crRNA 的 A 到 I 编辑, mxABE 编辑效率高达 60% (FANCC-1 位点)<sup>[32]</sup>。

## 2.5 基于 CRISPR-Cas13 系统 RNA 碱基编辑 (C>U)

### 2.5.1 RESCUE-S

RESCUE 系统是基于 REPAIR 系统进化而来的 C 到 U RNA 编辑器。虽然能够催化 C 转化为 U 的天然酶已经被用于 DNA 碱基编辑<sup>[33]</sup>, 但它们只作用于单链底物<sup>[34]</sup>, 且有明显的脱靶效应, 并在一个窗口内脱去多个碱基<sup>[35]</sup>。采用合成方法进化 ADAR2 的腺嘌呤脱氨酶结构域 (ADAR2DD)。进化的 ADAR2 突变体作用于双链 RNA 底物, 优先将 gRNA 与目标 RNA 胞嘧啶形成错配的胞嘧啶编辑为尿嘧啶。

将这种进化的胞苷脱氨酶与 dCas13 融合, 在哺乳动物细胞中开发出了用于特异性 C 到 U 替换的可编程 RNA 编辑器。在 HEK293T 细胞中, 利用 RESCUE 系统靶向内源性转录本, 其中在 9 个基因的 24 个位点检测 RESCUE 系统的编辑效率最高达 42%; 调节关键的磷酸化残基来改变 STAT 和 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路的激活, 从而抑制泛素化和降解<sup>[36]</sup>, 靶向编辑磷酸化残基上的  $\beta$ -连环蛋白转录本 (CTNBN1), RESCUE 的编辑效率最高为 28%; 全转录组 RNA 测序分析了脱靶率, 发现 RESCUE 在 Gluc 转录本上有 80% C 到 U 编辑, 但有 188 个其他位点 C 到 U 脱靶, 1 695 个 A 到 I 脱靶; RESCUS-S 是 RESCUE 通过合理诱变进化来的一个高度特异性和精确的 C 到 U RNA 编辑工具。RESCUE-S 突变体在荧光素酶报告系统中靶向荧光素酶转录本 C 到 U 的编辑效率高达 76%, 只有 103 个 C 到 U 的脱靶, 139 个 A 到 I 的脱靶<sup>[37]</sup>。RESCUE-S 相较于 RESCUE 系统在保证编辑效率不降低的情况下, 降低了 C 到 U 和 A 到 I 的脱靶率。RESCUE 系统的出现扩展了可靶向的氨基酸种类以及使得更多翻译后修饰 (甲基化、糖基化、磷酸化) 得以调节。RESCUE 也是新的碱基编辑功能的 RNA 靶向工具包, 增加了治疗遗传疾病新的选项。<sup>[17]</sup>。

### 2.5.2 CURE

Huang 等<sup>[38]</sup>于 2020 年发现了第一个胞苷特异性的 C>U 的 RNA 编辑器 (first cytidine-specific C-to-U RNA editor, CURE)。CURE 是胞苷脱氨酶 APOBEC3A (A3A) 与 dCas13b 融合, 并与非常规的 gRNA (gRNAs) 共同作用, 旨在靶位点引入环式结构。A3A 优先编辑特定形式的 C (UC 二核苷酸), 例如, SDHB mRNA 中的发夹结构包含一个 5-bp 茎, 茎连接着包含靶向目标 C 的四环, A3A 优先编辑带有四环的 UC 二核苷酸的胞嘧啶。A3A 介导的 RNA 编辑对靶位点有严格的结构要求。在 SDHB 发夹环中移动 UC 二核苷酸, 向上游移动一个核苷酸, 编辑效率降低为原来的 1/10。重要的是, CURE 不会脱氨腺苷, 这使得 CURE 的高特异性版本在转录组范围内比 RESCUE-S 产生更少的错义突变<sup>[36]</sup>。

CURE 在 GFP 报告基因和 PPIB 上更活跃, 编辑效率为 30%~50%, 而 RESCUE-S 的编辑效率为 10%。靶向 TYMS、ACTB、CTNBN1、KRAS、SMARCA4、GAPDH 六个位点, CURE 编辑效率较高。CURE-N 除了对 KRAS 和 SMARCA4 的编辑效率略低外, 其他 4 个位点与 RESCUE-S 相当, CURE-X 除了 CTNBN1

位点和 RESCUE-S 一样活跃, 其他位点都低于 RESCUE-S。CURE 系统最高的编辑效率达到 55%<sup>[36]</sup>。

CURE 和 RESCUE-S 这两种编辑方法表现出重叠的编辑序列偏好, CURE 和 RESCUE-S 分别能够编辑 UCC (下划线代表编辑位点) 和 AC 序列。核定位版本的 CURE 相较于 RESCUE-S 可以更有效地编辑核 RNA。当 RESCUE-S 靶向目标序列为 GC 和 CC 时, 其编辑效率较低, 仅为 2%。虽然 RESCUE-S 可以同时编辑目标 AC、UC, 但是 UC 编辑效率低至 4%。利用 A3A 开发了 CURE 的 3 个版本, 其中 CURE-C 是编辑效率最高的版本, CURE-X 是最具体的, CURE-N 是平衡的。对于目标编辑, CURE 与 RESCUE-S 相比有几个优势。具体来说, CURE 在一些 UC 靶点上更活跃, 也能够进行 UCC 编辑。关于脱靶编辑, CURE-N 和 CURE-X 都比 RESCUE-S 特异性好, 特别是 CURE-X 特异性更好。CURE 相对于 RESCUE-S 的主要缺点是它不能编辑 AC。然而, 编辑 UCC 这种独特的 C 编辑能力弥补了这种不足。CURE 是 RESCUE-S 在功能上的补充。例如, CURE-X 和 CURE-N 分别是特异性最高和编辑核 RNA 的首选, 而 CURE 是编辑 UCC 的唯一选择。另一方面, 对于多重 C>U 和 A>I 编辑, CURE 效率低, RESCUE-S 更好些。由于碱基切除修复 (base-excision repair, BER), CURE-N 使 DNA 碱基改变后并不会导致 DNA 发生突变。

### 2.5.3 xCBE、mxCBE

minidCas13X.1 (445 aa) 和 dCas13X.1 (775 aa) 与进化的 ADAR2RNA 胞嘧啶脱氨酶融合形成 C 到 U RNA 碱基编辑器 (xCBE、mxCBE)。在内源性靶点中相较于 RESCUE 系统, xCBE/mxCBE 编辑器可以更有效地实现 C 到 U 编辑, xCBE 编辑效率高达 70% (PPIB 位点)。mxCBE 相较于 xCBE 减少了 RNA 脱靶编辑。RNA 碱基编辑器 mxABE 和 mxCBE 有更小、更高效、更安全的特点, 能够促进基于 AAV 的基因治疗。

表 1 和 2 综合比较了基于 CRISPR-Cas13 系统的不同 RNA 碱基编辑器。

## 3 非CRISPR-Cas13系统RNA碱基编辑

转录后 RNA 修饰中最常见的形式之一是腺苷向肌苷 (A>I) 的转化, 它是由腺苷脱氨酶 (ADAR) 作用于 RNA 介导的。CIRTS (CRISPR-Cas 启发 RNA 定位系统)、RESTORE (招募内源性 ADAR 特定转

录本, 利用寡核苷酸介导 RNA 编辑)、LEAPER (利用内源性 ADAR 可编程编辑 RNA) 是创新的 RNA 碱基编辑平台, 在哺乳动物细胞中实现可编程的碱基替换, 也是利用工程脱氨酶进行精确的碱基编辑的新方法。此外, 这些系统允许编辑包含致病点突变的全长转录本, 而不丢失基因组信息。如果能适当解决脱靶编辑问题, 则为体内研究和治疗环境提供了一个有吸引力的替换方案。

### 3.1 CIRTS

在最近的一项发表在 *Cell* 研究中, Rauch 等<sup>[40]</sup> 描述了受 CRISPR-Cas 启发的 RNA 靶向系统 (CIRTS) 的工程设计, 作为一种模块化的蛋白质工程策略, 完全由人类蛋白质部分发展而来。这种可编程 RNA 靶向系统包括: (1) 作为该系统核心的一种 RNA 发夹结合蛋白, 可以选择性并高度亲和地与特异性的 RNA 结构结合; (2) 一个具有特定 RNA 结构的 gRNA, 与工程发夹结合蛋白相互作用, 与目标 RNA 序列互补; (3) 一种可以与 gRNA 结合, 在目标相互作用之前与 gRNA 结合, 稳定和它的蛋白质; (4) 一种作用于靶向 RNA 的表观转录组调节因子。通过碱基互补配对, gRNA 靶向 RNA, 4 种组分构成核糖核蛋白复合物, 效应蛋白发挥作用。效应蛋白包括: 核糖核酸酶、RNA 降解蛋白、用于 A>I 编辑的 RNA 编辑蛋白<sup>[38]</sup>。CIRTS 为表观转录组提供了一个易于编程的新平台, 它可以结合多个蛋白质结构域, 其中一个特定的结构域可以作为 “writer”、“reader” 或 “eraser”, 可针对几乎任何感兴趣的转录本<sup>[40]</sup>。CIRTS 可以通过多个 gRNAs 靶向编辑不同的 RNA 分子。

CIRTS 的氨基酸序列大小为 432 aa, 比迄今为止发现的最小的 Cas14a 蛋白 (529 aa) 还要小, 这表明这个模块系统即使在最小的配置下也是有效的<sup>[41]</sup>。如果用于体内表观转录组, CIRTS 的人源性特性将避免免疫问题。关于这一点, 已经有研究预测了构建人源化多肽诱导免疫反应的风险性<sup>[38]</sup>。具体来说, 通过对主要组织相容性复合体 I 类 (MHC I 类) 结合肽的分析, 发现其引起免疫反应的倾向较低, 对于治疗干预特别有吸引力<sup>[38]</sup>。

由于 CRISPR-Cas13 的 RNA 编辑系统中 Cas 蛋白的分子量较大, 使得病毒包装以及蛋白转运变得困难; 其次是 Cas 蛋白来源于细菌, 使得长期临床应用时易产生免疫原性。这两点使得基因编辑的基础研究应用和临床治疗面临着困难。CIRTS 是一个完全由人类蛋白成分合成的、可设计的、模块化

表1 基于CRISPR-Cas13系统的RNA碱基编辑(A>I)

RNA碱基编辑类型	RNA碱基编辑系统	RNA编辑机制	Cas蛋白大小(aa)	PFS	crRNA间隔序列(nt)	靶向目标错配类型效率最高	错配碱基位置(离间隔序列3'末端的距离)(nt)	报告系统编辑效率(“+”多少代表效率高低)	HEK293-PP1B内源性靶点编辑效率(“+”多少代表效率高低)	脱靶率(HEK293T, “+”多少代表效率高低)	文献
A-I	REPAIRv1	dPspCas13b-ADAR2 (E488Q)	1 090	无	50	A-C	16/22/24/ 34/40	++	++++	++++	[16]
	REPAIRv2	dPspCas13b-ADAR2 (E488Q-T375G)	1 090	无	50	A-C	16/22/24/ 34/40	+	+	+++	[16]
	REPAIRx	dCasRx-ADAR2 (E488Q)	967	无	30/50	A-C	17	+++	++++	N2a细胞中脱靶性高于 REPAIRv1/v2	[22]
	xABE	dCas13X.1-ADAR2dd (E488Q/T375G)	775	无	50	A-C	15~25	++++	++	++	[32]
	mxABE	dmCas13X.1-ADAR2 (E488Q/T375G)	445	无	50	A-C	15~25	+++++	+++	+	[32]

表2 基于CCRISPR-Cas13系统系统的RNA碱基编辑(C>U)

RNA碱基编辑类型	RNA碱基编辑系统	RNA编辑机制	Cas蛋白大小(aa)	PFS	crRNA间隔序列(nt)	靶向目标错配类型	错配碱基位置(离间隔序列3'末端的距离)	报告系统编辑效率(“+”多少代表效率高低)	HEK293-PP1B内源性靶点编辑效率(“+”多少代表效率高低)	脱靶率(HEK293T, “+”多少代表效率高低)	文献
C-U	RESCUE	dRanCas13b-ADAR2 (RESCUE)	1 094	无	30	C-C/U	20/22/24/26/28	++	++	++++(C>U和A>I脱靶)	[17]
	RESCUE-S	dRanCas13b-ADAR2 (RESCUE+S375A)	1 094	无	30	C-C/U	20/22/24/26/28	++	+	+++ (C>U和A>I脱靶)	[17]
	CURE-C	NLS-dPspCas13b-NES Apobec3A-	1 090	无	32	6/12/10/ 14 nt-loop	靶向C位于环的6-9	+++	++++	+++++(C>U脱靶)	[36]
	CURE-N	NLS-dPspCas13b-NES Apobec3A-NLS	1 090	无	32	6/12/10/ 14 nt-loop	靶向C位于环的6-9	+++	++++	++(C>U脱靶)	[36]
	CURE-X	dCasRx-Apobec3A	967	无	28/32/24	8/14/ 10 nt-loop	靶向C位于环的6-9	+++	+++	+(C>U脱靶)	[36]
	xCBE	dCas13X.1-ADAR2 (RESCUE+S375A)	775	无	50	C-C/U	20/22/24/26/28	无介绍	高于RESCUE-S	低于RESCUE-S	[39]
	mxCBE	dmminiCas13X.1-ADAR2 (RESCUE+S375A)	445	无	50	C-C/U	20/22/24/26/28	无介绍	高于RESCUE-S	低于RESCUE-S	[39]

的、RNA 引导的 RNA 靶向效应器，克服了 CRISPR-Cas 系统的大分子量和免疫原性的限制性，为 RNA 调控的研究和利用提供了新的工具，为未来临床治疗提供了新机遇<sup>[42]</sup>。

### 3.2 RESTORE

RESTORE 系统将内源性 ADAR 招募到特异性转录本中，利用寡核苷酸介导进行 RNA 编辑。RESTORE 由化学修饰的反义寡核苷酸 (ASOs) 组成，具有发挥不同作用的两个结构域：(1) 一个可编程的特异性结构域，与目标 mRNA 结合；(2) 一个稳定的 ADAR 招募域，引导内源性人类 ADAR 到 ASO : mRNA 复合体来编辑转录本<sup>[43]</sup>。

RESTORE 已应用于人类细胞系和原代人类细胞，编辑率在 75%~85% 之间，是依赖于细胞系的定点 RNA 编辑。利用这个系统修复了一个导致 1-抗胰蛋白酶缺乏的临床相关突变，并编辑了 HeLa 和原代细胞中 STAT1 的磷酸化酪氨酸 701 位点 (5'UAU-3')。RESTORE，这种 RNA 编辑技术在治疗纠正疾病相关转录本中的点突变方面有很大潜力<sup>[43]</sup>。RESTORE 介导的 RNA 编辑只能通过使用 ADAR 招募的 ASOs 而不需要异位表达 ADARs 来实现，这使得该方法可以尽量减少这些 RNA 编辑酶过表达引起的脱靶编辑效应<sup>[44]</sup>。

RESTORE 系统解决了基于 CRISPR-Cas13 的 RNA 编辑系统蛋白分子量过大使得病毒载体递送困难、蛋白过表达引起的 DNA/RNA 水平的脱靶效应、外源蛋白表达引起的机体免疫反应及损伤、机体内的预存抗体使外源编辑酶或效应蛋白被中和从而导致基因编辑失败等问题。

### 3.3 LEAPER

LEAPER 利用内源性 ADAR 可编程编辑 RNA，采用 ADAR 招募的短 RNA (arRNAs) 参与内源性 ADAR1 酶改变特定的 A 到 I，并且实现编辑效率高达 80%。整体的脱靶效率较低，靶位点的非目标 A 被有效地限制编辑<sup>[45]</sup>。

研究证明了 ADAR 蛋白可以单独发挥靶向 RNA 进行编辑的作用。这种情况是因为长 gRNAs (长度为 111~151 nt) 可以与目标转录本退火形成 dsRNA 底物，进而招募内源性 ADAR 蛋白进行靶向编辑。因此，gRNAs 被称为 arRNAs。

通过使用不同长度核苷酸的 arRNAs，LEAPER 可以对内源性转录本 PPIB、KRAS、SMAD4 和 FANCC 进行有效编辑，编辑效率逐个提高。此外，与那些具有单个 arRNAs 的位点相比，LEAPER 通过两个

arRNAs 的共表达，可以同时针对不同的位点进行编辑，并具有协同效应<sup>[45]</sup>。笔者靶向肿瘤抑制基因 TP53 发生突变导致过早终止，LEAPER 能够修复 TP53 中与癌症相关的过早终止的密码子，并恢复其功能，这是肿瘤学的一种很有前途的策略<sup>[46]</sup>。LEAPER 不影响内源 ADAR 蛋白的正常功能，也不会激活细胞中的天然免疫反应<sup>[46]</sup>。

在 LEAPER 的基础上开发的 LEAPER2.0 同样使用内源性 ADAR 酶和工程化的 ADAR 招募 RNA (arRNAs)。然而，二者不同之处在于 LEAPER2.0 所用到的 arRNAs 是共价闭合的环状 RNA (circular RNA)，LEAPER 系统中 arRNAs 是线性 RNA。编辑效率取决于 arRNAs 是否充足和是否稳定。环状 RNA 是一类非编码 RNA，因为其共价闭环结构保护其免受外切酶的影响，所以高度稳定。因此，研究人员测试了共价闭环 arRNAs (图 2)。证明无论是在细胞中表达或作为体外转录的 arRNAs，LEAPER2.0 平均编辑效率比 LEAPER 高 3.1 倍。LEAPER2.0 系统的脱靶编辑范围 80% 都在目标转录本附近区域，因此研究人员删除了 arRNAs 中靶向目标碱基周围的与目标 RNA A 匹配的 U。对于临床研究有重要意义的是，其活性在多个靶标转录本和细胞系中持续更长时间，最高可达 21 d。在细胞培养中，LEAPER2.0 提高了编辑内源性 CTNBN1 和突变体 TP53 转录本的效率和特异性。在 Hurler 综合征小鼠模型中，使用腺相关病毒包装环状 arRNAs 纠正致病点突变，恢复了  $\alpha$ -L-腺苷酸酶的催化活性，降低了肝脏中糖胺聚糖的积累。LEAPER 2.0 中 arRNAs 的新设计可实现更精确、更高效的 RNA 编辑，并在治疗和基础研究领域具有广泛的适用性<sup>[47]</sup>。

Yi 等<sup>[48]</sup>设计开发与 LEAPER2.0 相似的环状 ADAR 招募 gRNA (circular ADAR-recruiting guide RNAs, cadRNAs)，与 LEAPER2.0 机制相似，cadRNA 由反义结构域和 ADAR 招募结构域组成；反义结构域结合目标 RNA；招募结构负责招募 ADAR，实现 A 到 I 的编辑；此系统提高了 A 到 I 的 RNA 编辑效率，且不需要任何外源性蛋白的共同作用。其编辑示意图如图 2。与 LEAPER2.0 相似，cadRNAs 在多个细胞系中多个位点实现了稳定和持久的 RNA 编辑，并且具有较高的靶向编辑特异性。为了减少脱靶编辑，研究人员在 cadRNAs 与靶向目标碱基周围的 A 与 U 配对中加入分离的环，减少了脱靶编辑。在整个转录组水平上，只观察到几十个脱靶

编辑。研究人员通过腺相关病毒包装 cadRNAs 到体内, 靶向编辑 C57BL/6J 小鼠肝脏中的 mPCSK9 转录本, 效率达到 53%, 以及靶向 IDUA- W392XI 型 I-Hurler 综合征黏多糖病小鼠模型中 UAG>UGG, 编辑效率达到 12%<sup>[48]</sup>。此系统能够在 mRNA 的非翻译区和编码区以及跨多个 RNA 靶点和细胞系进行高度稳健的 RNA 编辑。相比于线性 cadRNA 在转染后的 48 h 和 96 h 维持高效的 RNA 编辑编辑率, 线性 gRNA 在转染后 96 h 几乎无法检测到 RNA 的编辑。cadRNA 可在体内实现高效的可编程 RNA 编辑, 具有多种蛋白质调节和基因治疗应用。

为了实现高效和高精度的 RNA 编辑, 这些系统大多数需要一个脱氨酶 (通过内源性或非位表达) 和一个或多个与靶 RNA 配对的 gRNAs。因此, 需要在效率和特异性方面改进, 从而提升在临床和生物医学研究中的潜在应用价值。表 3 总结了基于 CRISPR-Cas13 系统的 RESCUE 系统与 CIRTS、RESTORE、LEAPER、LEAPER2.0、cadRNA 五个系统的区别。

#### 4 总结与展望

目前发现许多人类疾病由基因点突变、片段插入、片段删除所造成。基于 CRISPR-Cas 系统的 ABEs、CBEs、PE、CGBE 等靶向 DNA, 并实现了

多种碱基的替换。然而, CRISPR-Cas13 的发现实现了在 RNA 层面上进行基因修饰和基因编辑。相较于基于 CRISPR-Cas 靶向 DNA 系统, RNA 编辑是可逆的, 不可遗传的, 而靶向 DNA 编辑是有遗传性的, 不可逆 (表 4)。

RNA 编辑在转录后的基因调控是可持续、可重复、多次调控, 且多个靶点同时进行, 这对表观遗传领域有重大帮助。我们不仅发现了自然界中新的 CRISPR-Cas 免疫系统, 而且其更小版本碱基编辑器实现了快速进化, 以及能够以可编程的方式设计复杂的 RNA 编辑系统。目前, 我们还不能说这些新方法中的一种比另一种方法好, 因为所有的方法都可以根据不同研究需要, 选择某种目前最优的编辑系统。因此, 这些碱基编辑平台可调节 RNA 活性、编辑或纠正与人类疾病相关的突变, 这将对现有 CRISPR/Cas 系统有价值的补充。无论是 CRISPR 相关的 RNA 编辑系统, 还是非 CRISPR 相关的 RNA 编辑系统, 在接下来的研究中, 提升靶向编辑效率、降低全转录组的脱靶率、优化编辑窗口、减小发挥核酸酶功能的蛋白大小、解决临床应用外源蛋白表达引起的机体免疫反应及损伤、机体内抗体中和外源编辑酶或效应蛋白导致编辑失败以及扩展 RNA 碱基编辑的类型, 这些都是 RNA 编辑领域重要的研究方向。

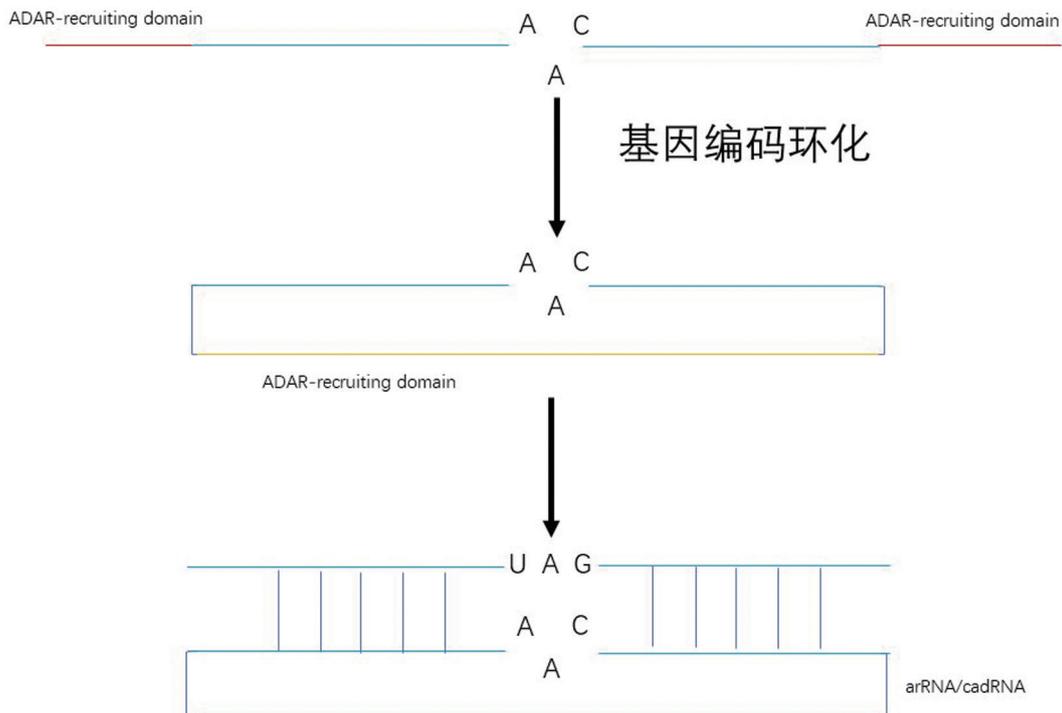


图2 arRNAs (cadRNA)编辑示意图

表3 新型RNA编辑系统的比较

	RESCUE	CIRTS	RESTORE	LEAPER	LEAPER2.0	cadRNA
GuideRNA	30 nt	20-40 nt	单链序列(63-95 nt)	111-151 nt	cir-RNA151 nt	cadRNA 200 nt/100 nt
脱氨酶	ADAR2	ADAR2	内源性ADARs	内源性ADARs	内源性ADARs	内源性ADARs
RN编辑机制	dRanCas13b-ADAR2	工程性发夹的gRNA与发夹RNA结合域相互作用, 以驱动核糖核蛋白复合物的形成	2'-O-甲基磷酸修饰合成ASO招募内源性ADARs	短的工程性招募RNA (arRNAs)招募内源性ADARs	闭环环状招募RNA (cir-arRNAs)招募内源性ADARs	闭环环状招募RNA (cadRNAs)招募内源性ADARs
效率	RNA编辑率高达42%	gRNA依赖性更高的编辑效率	编辑效率75%-85%	编辑效率最高可达80%	LEAPER的三倍	小鼠肝脏中mPCSK9转录本编辑效率53%
编辑系统载体	转染质粒	病毒递送(AAV)	(ADAR1p150) 转染ASOs	质粒或慢病毒载体, 或作为一个合成的寡核苷酸	质粒或慢病毒载体, 或作为一个合成的寡核苷酸	质粒或慢病毒载体, 或作为一个合成的寡核苷酸
细胞模型	HEK293FT和人脐静脉内皮细胞	HEK293T细胞	人类细胞系和不同的人类原代细胞	不同的人类和小鼠细胞类型, 包括各种原代细胞类型和Hurler患者的原代成纤维细胞	不同的人类和小鼠细胞类型	不同的人类和小鼠细胞类型
临床上相关突变	$\beta$ -连环蛋白转录本(CTNNB1)	KRAS4b转录本被融合荧光素酶报告基因	STAT1中的磷酸化酪氨酸701; PiZZ突变导致1-抗胰蛋白酶缺陷(SERPINA1)中的E342K	a-L-类冬核酸酶催化活性(Hurler综合征);	恢复 $\alpha$ -1-腺苷酸酶的催化活性	IDUA-W392XI型I-Hurler综合征黏多糖病

表3 续表

RESUCE	CIRTS	RESTORE	LEAPER	LEAPER2.0	cadRNA
<p>优点</p> <p>利用新的碱基编辑功能扩展了RNA靶向武器库, 实现A&gt;I和C&gt;U; 可以编辑dsRNA; 扩大靶向氨基酸密码子范围; 扩大常见催化残基、疾病突变和保护等位基因的可靶向性; 调节更多的翻译后修饰如磷酸化、糖基化和甲基化</p>	<p>腺相关病毒包装到体内; 表观转录组提供了一个易于编程的新平台, 代表了一个可以结合多个蛋白质结构域的多功能系统; 相对分子质量小; 人源性解决免疫原性问题; 发挥“writer、reader、eraser”功能; 氨基酸序列小(432 aa)</p>	<p>只能通过ASOs招募的ADAR而不需要异位表达ADARs来实现, 减少过表达这些RNA编辑酶引起的脱靶编辑效应</p>	<p>腺相关病毒包装到体内; 编辑效率高; 全局脱靶效率低; arRNAs可以通过多种方式产生, 包括从病毒或非病毒载体中进行化学合成和在体内的表达</p>	<p>腺相关病毒包装到体内; 编辑效率更高; 时间更长更稳定; 脱靶编辑大大降低; 提高TP53W53X转录本编辑</p>	<p>腺相关病毒包装到体内; 可靶向mRNA的非翻译区和编码区以及跨多个RNA靶点和细胞系; 编辑效率更高时间更长更稳定; 不需要共同交付的任何效应蛋白, 增强细胞持久性</p>
<p>缺点</p> <p>Cas蛋白相对分子质量大, 病毒包装蛋白转运困难; 临床应用产生免疫原性; 外源蛋白表达引起的机体免疫反应及损伤、机体内抗体中和和外源编辑酶或效应蛋白导致编辑失败; 编辑效率较低, 脱靶率高</p>	<p>敲除RNA效率低于RESCUE; 发夹结合蛋白SLBP具有内源性RNA发夹结合配对, 影响茎环RNA的运输; 机体内抗体中和和外源编辑酶或效应蛋白导致编辑失败</p>	<p>仅限于化学合成的反义寡核苷酸, 依赖于复杂的化学修饰招募ADAR, 不利于应用于体内实验; 免疫原性问题限制需要过表达ADAR蛋白或核酸序列来招募更多编辑蛋白; 仅限A&gt;I</p>	<p>arRNAs过长, arRNAs与结合蛋白结合稳定性差; 免疫原性问题限制需要过表达ADAR蛋白或核酸序列来招募更多编辑蛋白; 仅限A&gt;I</p>	<p>arRNAs过长 免疫原性问题限制需要过表达ADAR蛋白或核酸序列来招募更多编辑蛋白</p>	<p>靶向编辑效率存在位点差异性; cadRNA的双联结构导致无法结合目标RNA</p>

表4 DNA编辑系统和RNA编辑系统比较

	靶向目标	脱靶类型	特性
靶向DNA编辑系统(ABE、CBE、PE等)	DNA	DNA、RNA	不可逆, 遗传性
基于CRISPR-Cas13靶向RNA编辑系统(REPAIR、REPAIREx、RESCUE、CURE等)	RNA	RNA	可逆, 非遗传性
非基于CRISPR-Cas13靶向RNA编辑系统(RESTORE、CIRTS、RESCUE、CURE等)	RNA	RNA	可逆, 非遗传性

RNA 编辑已经在基础研究、RNA 病毒诊断治疗、药物及疫苗的研发、癌症及神经性疾病临床治疗等领域开展相关研究。例如：基于 CRISPR-Cas13 系统的 RNA 敲除系统，敲除哺乳动物细胞中的淋巴细胞性脑膜炎病毒 (LCMV)、水泡性口炎病毒 (VSV)<sup>[49]</sup>；CRISPR-Cas13a 和 crRNA 复合物与目标 RNA 结合时具有非特异性 RNA 酶切活性，此特性可以用于 DNA 和 RNA 病毒检测，此系统被称为“SHERLOCK”<sup>[50]</sup>；利用 RNA 编辑技术可找到化疗耐药的癌细胞、休眠的癌症干细胞和其他恶性肿瘤。RNA 编辑位点可以作为一种早期检测癌症的新工具<sup>[51]</sup>。RNA 编辑在维持抗体的多样性、调节病毒感染和调控 mRNA 剪接及微小 RNA (microRNA, miRNA) 等方面发挥着重要作用。Koneremann 等<sup>[24]</sup>利用 REPAIRx 系统靶向额颞叶痴呆 (frontotemporal dementia, FTD) 患者的 tau 蛋白的 RNA，使得由于神经元中 2 种不同的 tau 蛋白比例失衡导致的神经变性疾病 FTD 的患者 tau 蛋白表达水平正常，治愈成功率为 80%。

对于新型的非基于 CRISPR-Cas13 的 RNA 编辑系统来说，RESTORE、LEAPER、环状 RNA 介导的都不需要一些外源的效应蛋白的共同作用，增强了在细胞中的持久性，它们在可编程 RNA 编辑介导的瞬时蛋白调节以及纠正 G>A 点突变和过早终止密码子方面具有广泛的应用潜力。除此之外，gRNA 的环化也可能在其他转录组和基因组工程模式中有用，如 RNAi、ASOs 和 CRISPR-CAs 中的引导 RNA；CIRTS 可以作为研究和开发 RNA 调控的另一种方法，为未来干预细胞调控进行疾病治疗提供机会。

各种 RNA 编辑系统机制还需进一步研究及优化，如降低效应蛋白及其所有成分的免疫原性，提高编辑效率和准确性，降低脱靶效应等。唯有如此才能使 RNA 编辑成为基因工程研究以及基因治疗应用中的强有力的新型工具。

#### 参 考 文 献

[1] Robic L, Gott J. Accurate and efficient insertional RNA

- editing in isolated *Physarum mitochondria*. RNA (New York), 1995, 1: 681-91
- [2] Gott JM, Emeson RB. Functions and mechanisms of RNA editing. Annual Rev Genet, 2000, 34: 499-531
- [3] Li G, Wang Y, Li X, et al. Developing PspCas13b-based enhanced RESCUE system, eRESCUE, with efficient RNA base editing. Cell Commun Signal, 2021, 19: 84
- [4] Simpson L, Emeson RB. RNA editing. Annual Rev Neurosci, 1996, 19: 27-52
- [5] Maslov DA, Avila HA, Lake JA, et al. Evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. Nature, 1994, 368: 345-8
- [6] Mahendran R, Spottswood MR, Miller DL. RNA editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum*. Nature, 1991, 349: 434-8
- [7] Lonergan KM, Gray MW. Editing of transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. Science, 1993, 259: 812-6
- [8] Covello PS, Gray MW. RNA editing in plant mitochondria. Nature, 1989, 341: 662-6
- [9] Chester A, Scott J, Anant S, et al. RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. Biochim Biophys Acta (BBA) - Gene Struct Express, 2000, 1494: 1-13
- [10] Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, et al. Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. Science, 1994, 266: 1709-13
- [11] Sommer B, Köhler M, Sprengel R, et al. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. Cell, 1991, 67: 11-9
- [12] Köhler M, Burnashev N, Sakmann B, et al. Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. Neuron, 1993, 10: 491-500
- [13] Nishikura K. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17: 83-96
- [14] Ota H, Sakurai M, Gupta R, et al. ADAR1 forms a complex with Dicer to promote microRNA processing and RNA-induced gene silencing. Cell, 2013, 153: 575-89
- [15] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature, 2017, 550: 280-4
- [16] Cox DBT, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. Science, 2017, 358: 1019-27
- [17] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. Science, 2019, 365: 382-6
- [18] Aquino-Jarquín G. Novel engineered programmable systems for ADAR-mediated RNA editing. Mol Ther

- Nucleic Acids, 2020, 19: 1065-72
- [19] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315: 1709-12
- [20] Nidhi S, Anand U, Oleksak P, et al. Novel CRISPR-Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3327
- [21] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 67-78
- [22] Hochstrasser ML, Doudna JA. Cutting it close: CRISPR-associated endoribonuclease structure and function. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40: 58-66
- [23] Liu Y, Mao S, Huang S, et al. REPAIRx, a specific yet highly efficient programmable A > I RNA base editor. *Embo J*, 2020, 39: e104748
- [24] Konermann S, Lotfy P, Brideau NJ, et al. Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, 2018, 173: 665-76.e14
- [25] Vogel P, Moschref M, Li Q, et al. Efficient and precise editing of endogenous transcripts with SNAP-tagged ADARs. *Nat Methods*, 2018, 15: 535-8
- [26] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 722-36
- [27] Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, et al. CRISPR-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*, 2020, 369: 333-7
- [28] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353: aaf5573-aaf5573
- [29] Wang D, Zhang F, Gao G. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors. *Cell*, 2020, 181: 136-50
- [30] Montiel-González MF, Vallecillo-Viejo IC, Rosenthal J. An efficient system for selectively altering genetic information within mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: e157-e157
- [31] Azad MTA, Bhakta S, Tsukahara T. Site-directed RNA editing by adenosine deaminase acting on RNA for correction of the genetic code in gene therapy. *Gene Ther*, 2017, 24: 779-86
- [32] Katrekar D, Chen G, Meluzzi D, et al. *In vivo* RNA editing of point mutations via RNA-guided adenosine deaminases. *Nat Methods*, 2019, 16: 239-42
- [33] Nishida K, Arazoe T, Yachie N, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 2016, 353: aaf8729
- [34] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420-4
- [35] Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC protein family: united by structure, divergent in function. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41: 578-94
- [36] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 2009, 17: 9-26
- [37] Grünewald J, Zhou R, Garcia SP, et al. Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. *Nature*, 2019, 569: 433-7
- [38] Huang X, Lv J, Li Y, et al. Programmable C-to-U RNA editing using the human APOBEC3A deaminase. *EMBO J*, 2020, 39: e104741
- [39] Xu C, Zhou Y, Xiao Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes. *Nat Methods*, 2021, 18: 499-506
- [40] Rauch S, He E, Srienic M, et al. Programmable RNA-guided RNA effector proteins built from human parts. *Cell*, 2019, 178: 122-34.e12
- [41] Esteller M, Pandolfi PP. The epitranscriptome of noncoding RNAs in cancer. *Cancer Discov*, 2017, 7: 359-68
- [42] Harrington Lucas B, Burstein D, Chen Janice S, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362: 839-42
- [43] Rauch S, He E, Srienic M, et al. Programmable RNA-guided RNA effector proteins built from human parts. *Cell*, 2019, 178: 122-34.e12
- [44] Merkle T, Merz S, Reautschnig P, et al. Precise RNA editing by recruiting endogenous ADARs with antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 133-8
- [45] Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 167-79
- [46] Qu L, Yi Z, Zhu S, et al. Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1059-69
- [47] Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur J Cancer*, 2017, 83: 258-65
- [48] Yi Z, Qu L, Tang H, et al. Engineered circular ADAR-recruiting RNAs increase the efficiency and fidelity of RNA editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 946-55
- [49] Katrekar D, Yen J, Xiang Y, et al. Efficient *in vitro* and *in vivo* RNA editing via recruitment of endogenous ADARs using circular guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 938-45
- [50] Freije CA, Myhrvold C, Boehm CK, et al. Programmable inhibition and detection of RNA viruses using Cas13. *Mol Cell*, 2019, 76: 826-37.e11
- [51] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356: 438-42