

廖媛,陈方兵. 线粒体 DNA 编辑技术及其在生物医学中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 668-675.

Liao Y, Chen FB. Mitochondrial DNA editing technologies and their applications in biomedicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 668-675.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.014

线粒体 DNA 编辑技术及其在生物医学中的应用

廖媛¹, 陈方兵^{2*}

(1. 西南大学资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715;

2. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

【摘要】 线粒体拥有一套独立的基因组,参与维持线粒体功能。对线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 进行编辑,可以为其基因功能、相关疾病机理和治疗研究提供重要线索。但由于 mtDNA 所处环境和损伤修复机制的特殊性,可用于 mtDNA 编辑的工具较为有限。近年来,随着核酸酶技术和碱基编辑技术的快速发展,可靶向线粒体的核酸酶工具和碱基编辑器相继问世,为 mtDNA 编辑提供了有力工具。本文总结了近年来针对动物 mtDNA 而开发的一系列靶向基因编辑工具的主要进展及其在生物医学领域的应用,重点围绕 mtDNA 碱基编辑器 DdCBE,并对 mtDNA 编辑目前存在的问题与应用前景做了初步展望,以期在线粒体基因编辑新工具的开发,及其在基础研究、疾病模拟和临床治疗等场景中更广泛的应用提供有益参考。

【关键词】 线粒体 DNA; mtDNA 编辑; 核酸酶技术; 碱基编辑器; MitoZFN; MitoTALEN; DdCBE

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0668-08

Mitochondrial DNA editing technologies and their applications in biomedicine

LIAO Yuan¹, CHEN Fangbing^{2*}

(1. State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University, Chongqing 400715, China.

2. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530)

Corresponding author: CHEN Fangbing. E-mail: chen_fangbing@gibh.ac.cn

【Abstract】 Mitochondria possess their own genome to maintain mitochondrial functions. Modification of mitochondrial DNA (mtDNA) provides important insights into gene functions, disease mechanisms, and therapeutics. However, the available tools for mtDNA editing are relatively limited because of the nature of the unique environment where mtDNA resides and the mechanism of DNA damage repair in mitochondria. With the rapid progress of nuclease and base-editing technologies in recent years, mitochondrially targeted nuclease tools and base editors have been developed, providing powerful tools for mtDNA editing. In this review, we summarize the recent progress of a series of tools developed for targeted editing of animal mtDNA and their applications in biomedicine, focusing on DdCBE (DddA-derived cytosine base editor), and provide a brief outlook on the existing problems and application prospects of mtDNA editing to provide a useful reference for the development of novel tools for mitochondrial genome editing and their wider applications in basic research, disease modeling, and clinical therapeutics.

【Keywords】 mitochondrial DNA (mtDNA); mtDNA editing; nuclease technology; base editor; MitoZFN; MitoTALEN; DdCBE

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 国家自然科学基金 (32100410), 广州市科技计划项目 (202201010409)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (32100410), Science and Technology Program of Guangzhou (202201010409).

【作者简介】 廖媛 (1994—), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 基因修饰动物培育研究。Email: liao_yuan@foxmail.com

【通信作者】 陈方兵, 男, 助理研究员, 博士后, 研究方向: 基因编辑技术开发与动物模型培育研究。Email: chen_fangbing@gibh.ac.cn

动物细胞拥有两套相对独立的基因组:细胞核基因组和线粒体基因组。这两套基因组在功能上密切联系,共同维持细胞正常生理功能,对其进行编辑,对于基因功能和疾病机制研究以及疾病治疗等均具有重要意义。近年来,基因编辑技术蓬勃发展,人工核酸酶及其衍生的碱基编辑器等新技术迅速迭代更新,应用场景不断拓展^[1]。但是,基因编辑技术目前主要聚焦于细胞核 DNA 的修饰,而线粒体由于结构特殊及 DNA 损伤修复机制和遗传方式等方面与细胞核基因组存在差异,当前所建立的大部分基因编辑工具通常难以直接用于线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的编辑,因而可用的 mtDNA 编辑工具较为有限,对于线粒体基因组功能的研究相对不足^[2]。虽然广泛使用的成簇的规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关 (CRISPR-associated, Cas) 系统目前在 mtDNA 编辑中的效果较差,但通过对其他基因编辑系统进行特定改造或优化,如锌指核酸酶 (zinc-finger nuclease, ZFN) 和转录激活因子样效应物核酸酶 (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) 等人工核酸酶,研究者也已经建立了靶向切割 mtDNA 技术以及衍生的 mtDNA 碱基编辑技术^[3],为更灵活操纵线粒体基因组提供了重要保障。

1 线粒体 DNA 编辑的特殊性

线粒体作为细胞内重要的细胞器,拥有一套独立于细胞核的基因组。人类线粒体基因组长约 16.6 kb,其所包含的 37 个基因中,13 个蛋白编码基因能够编码呼吸链复合物的 13 个多肽亚基,剩余 22 个转运 RNA (transfer ribonucleic acid) 和 2 个核糖体 RNA (ribosomal RNA) 负责线粒体内蛋白的翻译,这些基因对于线粒体的氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 等功能至关重要^[4]。

一直以来,操纵动物的 mtDNA 都具有较大挑战,主要原因包括:(1)线粒体内膜由于质子泵作用形成的强跨膜电位,阻碍外源核酸进入线粒体基质,加上当前对核酸分子进入线粒体的转运机制尚不清楚,使外源核酸难以被有效递送到线粒体内,这导致需要向导 RNA (guide RNA, gRNA) 的 CRISPR/Cas 系统无法实现对 mtDNA 的有效编辑^[5-6];(2)线粒体的 DNA 损伤修复机制与细胞核内存在较大差异,其以碱基切除修复通路为主,而

DNA 双链断裂 (double-strand break, DSB) 修复较为低效,导致核酸酶介导 mtDNA 发生 DSB 后,线性化的 mtDNA 分子倾向于被快速降解而非触发 DSB 修复通路,造成核酸酶对 mtDNA 的编辑结果与在细胞核内并不相同^[7-9];(3)细胞内包含大量线粒体,而线粒体内 DNA 呈多拷贝形式存在,这对编辑效率影响较大,使编辑难度增加;(4)线粒体主要以母系遗传方式传递到子代且存在遗传瓶颈效应^[10],一方面导致通过体细胞基因编辑和克隆获得基因修饰动物的常规路径难以用于 mtDNA 突变动物的培育,另一方面导致获得足够数量的种群耗时更长,且突变 mtDNA 载荷在传代过程中也存在较大变异性。

线粒体 DNA 的这些独特性质,导致目前广泛应用于细胞核 DNA 编辑的工具或策略,难以直接用于 mtDNA 的编辑。开发可用于线粒体的基因编辑工具,需要建立线粒体特异的靶向系统进行高效递送,并充分利用线粒体的损伤修复机制,以实现有效编辑。

2 线粒体 DNA 靶向编辑技术

2.1 人工核酸酶介导的线粒体 DNA 编辑

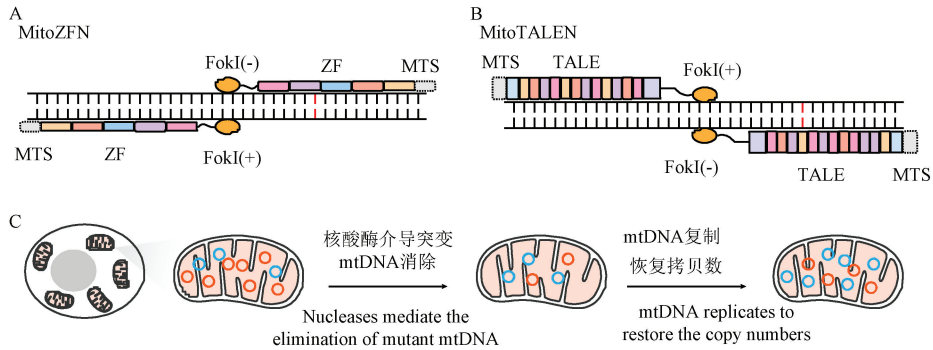
线粒体 DNA 的多拷贝特征造成突变 mtDNA 和野生型 mtDNA 共存的异质性现象,而且线粒体内总的 mtDNA 拷贝数受到精细调控^[9]。因此,当核酸酶靶向切割突变或者野生型 mtDNA 导致其被特异性降解,残余 mtDNA 随即通过复制进行数量补充,从而改变野生型和突变型 mtDNA 比例,被称为“异质性转换 (heteroplasmy shifting)”。通过这种方式,可以利用核酸酶实现 mtDNA 的靶向编辑。并且,当核酸酶蛋白附加一段线粒体靶向信号肽 (mitochondrial targeting signal, MTS) 序列,可以使其被有效转运到线粒体内发挥功能,能够解决递送的问题。

早期,限制性核酸内切酶 (restriction endonuclease, RE) 或归巢核酸酶 (homing endonuclease/meganuclease) 被改造用于 mtDNA 靶向切割 (如 MitoRE 和 mitoARCUS),虽然其特异性较高、载体尺寸小,但是可编程性差,应用非常受限^[11]。人工核酸酶问世后,由于其可编程特性强,不但被用于核 DNA 的编辑,也被开发用于 mtDNA 的编辑。例如,ZFN 和 TALEN 等纯蛋白系统通过添加 MTS 序列,可以靶向线粒体切割 mtDNA,分别被命名为 MitoZFN^[12] 和 MitoTALEN^[13],在细胞水平可以实现点突变和大片段删除等不同类型变异

mtDNA 的特异性消除(图 1)。后续利用这些工具,进一步在小鼠成体水平成功实现了突变 mtDNA 的靶向降解^[14-15],显示出其未来在基因治疗应用中的巨大潜能。相比之下,CRISPR/Cas 系统由于存在 gRNA 难以递送到线粒体的局限性,虽然也有相关报道,但目前尚无法实现对 mtDNA 的有效

编辑^[5,16]。

核酸酶介导的 mtDNA 特异性消除,首次实现了对 mtDNA 的直接靶向编辑。而人工核酸酶可以针对不同的 mtDNA 靶位点,进行特异的靶向切割,其设计和应用更为灵活。表 1 总结了当前主要的线粒体 DNA 编辑工具的特征。



注: A: MitoZFN 示意图; B: MitoTALEN 示意图; C: 靶向线粒体的人工核酸酶介导突变 mtDNA 消除, 实现异质性转换, 蓝色圆环表示野生型 mtDNA, 红色圆环表示突变 mtDNA; MTS: 线粒体靶向信号肽; ZF: 锌指蛋白; TALE: 转录激活因子样效应物; mtDNA: 线粒体 DNA。

图 1 靶向线粒体的人工核酸酶介导线粒体内突变 mtDNA 消除

Note. A. Schematic diagram of MitoZFN. B. Schematic diagram of MitoTALEN. C. Mitochondrially targeted artificial nucleases mediate the elimination of mutant mtDNA, resulting in heteroplasmy shifting. Blue circles indicate wild-type mtDNA and red circles indicate mutant mtDNA, respectively. MTS. Mitochondrial targeting signal. ZF. Zinc finger protein. TALE. Transcription activator-like effector. mtDNA. Mitochondrial DNA.

Figure 1 Mitochondrially targeted artificial nucleases mediate the elimination of mutant mtDNA

2.2 线粒体 DNA 碱基编辑系统

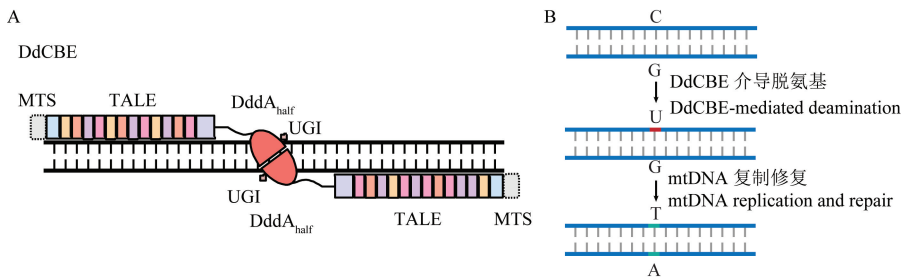
核酸酶介导的 mtDNA 编辑,主要是特异性消除某种突变 mtDNA,但无法在 mtDNA 中引入新的特定突变,而碱基编辑器为此提供了一个有力的工具。David R. Liu 团队在 CRISPR/Cas 系统基础上开发的胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor)和腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor),是借助 CRISPR/Cas 系统的靶向功能,引导胞嘧啶脱氨酶或腺嘌呤脱氨酶对靶位点的目标碱基进行脱氨,实现碱基类型变换^[17-18]。但是,如上所述,CRISPR/Cas 系统当前并不适用于靶向线粒体基因组。虽然之前 Yang 等^[19]尝试利用 ZF 或 TALE 的 DNA 结合域与胞嘧啶脱氨酶(AID 等)融合,用于人类细胞的碱基编辑,但编辑效率仅有 2.5%。这很可能是因为这些脱氨酶仅能作用于单链 DNA,而 ZF 和 TALE 仅有结合 DNA 能力,靶位点难以形成可供脱氨酶作用的单链 DNA 环境。因此,虽然碱基编辑技术在核 DNA 编辑中的应用已经非常广泛,但很长一段时间都缺乏高效的 mtDNA 碱基编辑器。

直到 2020 年,David R. Liu 团队和合作者利用一个细菌(*Burkholderia cenocepacia*)来源的胞嘧啶脱

氨酶 DddA_{tox} 与 TALE 联合,构建了新型碱基编辑器 DdCBE(DddA-derived cytosine base editor),可以实现对 mtDNA 的高效编辑^[20],这是 mtDNA 编辑领域的一个里程碑式进展。DddA_{tox} 具有双链 DNA 脱氨活性,但全长序列具有较强的细胞毒性,因此其被分裂为无活性的两半(DddA_{half-N} 和 DddA_{half-C}),分别与一条 TALE 融合,当一对 TALE 同时靶向基因组的邻近位置,分裂的 DddA_{half-N/C} 可以重新组装形成具有脱氨酶活性的完整蛋白,实现对靶位点的 C 到 T 碱基编辑(图 2)。DdCBE 在细胞水平表现出非常高的碱基编辑效率,当借助添加的 MTS 序列靶向线粒体,可有效实现对 mtDNA 的碱基编辑。DdCBE 的成功开发,首次为 mtDNA 碱基编辑提供了有力工具,使得高效定点突变 mtDNA 成为现实(表 1)。

凭借 DdCBE 在高效诱导 mtDNA 碱基替换上的强大功能,自问世以来,研究者围绕其优化与升级开展了一系列工作,在编辑效率、可编辑范围、载体尺寸、碱基变换类型和特异性等方面均取得了重要进展。

通过蛋白进化方法,成功获得的 DddA 变体不仅在编辑效率上有所提高,而且减小了原始 DddA



注:A:DdCBE 示意图;B:DdCBE 介导靶位点碱基 C 到 T 编辑示意图;MTS:线粒体靶向信号肽;TALE:转录激活因子样效应物;mtDNA:线粒体 DNA;UGI:尿嘧啶糖苷酶抑制蛋白;DddA_{half}:DddA 脱氨酶半体

图 2 线粒体碱基编辑器 DdCBE

Note. A. Schematic diagram of DdCBE. B. Schematic diagram illustrating C-to-T base editing mediated by DdCBE at the target. MTS. Mitochondrial targeting signal. TALE. Transcription activator-like effector. mtDNA. Mitochondrial DNA. UGI. Uracil glycosidase inhibitor. DddA_{half}. Splitted DddA deaminase half.

Figure 2 Mitochondrial base editor DdCBE

对 TC 序列的偏好性,扩展了 DdCBE 的靶向范围^[21]。Lee 等^[22]通过添加核输出信号和联合 MitoTALEN,也提高了 DdCBE 的碱基编辑效率。而 Wei 等^[23]发现在胚胎水平的 mtDNA 编辑中,人类 8 细胞期卵裂胚胎注射 mRNA 的编辑效率显著高于常规的合子期注射。另外,Lim 等^[24]和 Willis 等^[25]将 DdCBE 中的 TALE 替换为 ZF 而构建的碱基编辑器 ZFD (zinc finger deaminase) 和 ZF-DdCBE,同样可以实现高效的碱基编辑,其载体尺寸更小,更利于病毒包装与递送;而且 ZF 与 TALE 相比,在 N 端和 C 端均没有大块的结构域,DddA 可以融合到 ZF 的任何一端,增加了载体构建灵活性;ZF 作为人类细胞中广泛存在的蛋白类型,被认为具有更低免疫原性,在治疗性应用中更安全。为了更有效减小 DdCBE 尺寸,Mok 等^[26]对 DddA 进行氨基酸突变,获得了无细胞毒性的全长 DddA 变体,仅需要将其与单个 TALE 融合即可发挥功能,从而成功构建了单体 DdCBE 版本(mDdCBE)。但单体 DdCBE 的编辑效率有一定程度降低,特异性是否降低也有待进一步分析。

DdCBE 仅能实现 C 到 T (或 G 到 A) 的碱基编辑,类型较为单一。Cho 等^[27]在 DdCBE 系统的基础上,通过失活 DddA 并巧妙引入腺嘌呤脱氨酶 TadA-8e,成功构建了一系列新的 mtDNA 碱基编辑器 TALED (TALE-linked deaminase)。TALED 借助失活的 DddA 打开 DNA 双链,使得 TadA-8e 可以对单链 DNA 的腺嘌呤进行脱氨,从而有效实现了 A 到 G (或 T 到 C) 的碱基编辑,为 mtDNA 碱基编辑提供了新的有力工具,是相关领域的又一次重要突破。

特异性是基因编辑工具很重要的性质,对 DdCBE 等碱基编辑器的特异性进行系统分析与改善,对于其后续在临床中的应用至关重要。虽然 DdCBE 总体的脱靶编辑活性较低,但应用更灵敏的检测方法也发现,DdCBE 不但可造成线粒体基因组脱靶编辑,也可能产生核基因组的脱靶编辑,因此不同的策略也已被用于提高 DdCBE 的特异性^[22,28-30]。而对于 DdCBE 衍生的编辑器(如 ZFD、mDdCBE 和 TALED),其特异性也还需要进行更系统的评估^[24,26-27]。此外,目前的 mtDNA 碱基编辑器存在目标碱基附近的碱基也被额外编辑的旁观者效应,并且靶位点正、反两条链均能被编辑,这严重影响了其特异性,有待后续改进。

3 线粒体 DNA 编辑工具在生物医学中的应用

当细胞内突变 mtDNA 超过一定比例(阈值),可影响线粒体功能,导致多种线粒体相关疾病。因此,对 mtDNA 进行编辑,不但可以模拟相应的致病突变,用以构建合适的动物模型研究疾病机理(见表 2);也能直接用于消除或纠正突变 mtDNA,实现基因治疗的目标。mtDNA 编辑工具在生物医药领域中的应用前景广阔。靶向线粒体的人工核酸酶工具(如 MitoZFN 和 MitoTALEN)以及碱基编辑工具(如 DdCBE)相继开发后,已被用于不同动物以及人类的 mtDNA 编辑。特别是 mtDNA 碱基编辑器,能够有效产生新突变,通过多种策略进行优化与改造,显著推动了其广泛应用。

表 1 主要的线粒体 DNA 编辑工具特征总结

Table 1 Summary of mtDNA editing technologies

编辑工具 Editing tools	主要组分 Major components	尺寸 Size	可编程性 Programmability	编辑结果 Editing effect
MitoRE ^[11] 或 MitoARCUS ^[31] MitoRE or MitoARCUS	MTS + RE 或 MTS + 归巢核酸酶 MTS + RE or MTS + meganuclease	小(同型二聚体或单体) Small (Homodimer or monomer)	低(改造难度大,靶向范围受限) Difficult (Engineering is challenging, limited targeting scope)	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
MitoZFN ^[12]	MTS + ZF + FokI	相对大(异型二聚体) Relatively large (Heterodimer)	相对高 Relatively easy	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
MitoTALEN ^[13]	MTS + TALE + FokI	大(异型二聚体) Large (Heterodimer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 特异性消除 Elimination of specific mtDNA
DdCBE ^[20]	MTS + TALE + DddA + UGI	大(异型二聚体) Large (Heterodimer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 点突变(C-to-T) mtDNA point mutation (C-to-T)
ZFD ^[24] 或 ZF-DdCBE ^[25] ZFD or ZF-DdCBE	MTS + ZF + DddA + UGI	相对大(异型二聚体) Relatively large (Heterodimer)	相对高 Relatively easy	mtDNA 点突变(C-to-T) mtDNA point mutation (C-to-T)
TALED ^[27]	MTS + TALE + DddA + TadA8e	大(异型二聚体或单体) Large (Heterodimer or monomer)	高(灵活性好) Easy (High flexibility)	mtDNA 点突变(A-to-G) mtDNA point mutation (A-to-G)

表 2 利用线粒体 DNA 编辑工具建立的动物模型

Table 2 Animal models generated by mtDNA editing tools

动物 Animals	靶位点 Target sites	编辑工具 Editing tools	构建策略 Strategies	人类相关疾病 Human diseases	参考文献 References
果蝇 Fruit fly	<i>mt:CoI</i> ^{R301S}	MitoRE	生殖系表达 <i>mitoXhoI</i> Expression of <i>mitoXhoI</i> in germline	Leigh 综合征、MELAS Leigh syndrome and MELAS	[32]
	大片段删除 Large mtDNA deletions	MitoRE	骨骼肌表达 <i>MitoPstI</i> Expression of <i>MitoPstI</i> in muscle	线粒体肌病 Mitochondrial myopathy	[33]
	<i>MT-Nd5</i> ^{G12918A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、MELAS、LHON Leigh syndrome, MELAS, LHON	[22,34]
	<i>MT-Nd1</i> ^{G2820A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、LHON、肌病 Leigh syndrome, LHON, myopathy	[35]
小鼠 Mouse	<i>MT-Trnk</i> ^{G7763A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、LHON、肌病 Leigh syndrome, LHON, myopathy	[35]
	<i>MT-Nd3</i> ^{G9576A/G9577A}	DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	未知 Unknown	[36]
	<i>MT-Trnk</i> ^{G7743A}	ZF-DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	线粒体肌病、视网膜病变 Mitochondrial myopathy and retinopathy	[25]
	<i>MT-Nd1</i> ^{G3177A}	ZF-DdCBE	AAV 递送 AAV delivery	LHON	[25]
大鼠 Rat	<i>MT-Trne</i> ^{G14098A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	线粒体肌病 Mitochondrial myopathy	[37]
	<i>MT-Trnk</i> ^{G7755A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	MERRF、心脏病、Leigh 综合征 MERRF, cardiomyopathy, Leigh syndrome	[37]
斑马鱼 Zebrafish	<i>mt-nd1</i> ^{G4247A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	LHON	[38]
	<i>mt-nd5</i> ^{G14076A}	DdCBE	胚胎显微注射 Microinjection of embryos	Leigh 综合征、MELAS Leigh syndrome, MELAS	[38]

注: MELAS: 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作; LHON: Leber 遗传性视神经病变; MERRF: 肌阵挛癫痫伴破碎红纤维病。

Note. MELAS. Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes. LHON. Leber Hereditary Optic Neuropathy. MERRF. Myoclonic epilepsy and ragged red fibers.

3.1 靶向线粒体的核酸酶技术的应用

核酸酶通过靶向降解变异 mtDNA 实现异质性转换,为 mtDNA 变异的基因治疗提供了一种独特策略^[39]。线粒体 m.8993T>G 突变与多种线粒体疾病

相关(如 NARP 和 MILS 综合征),早期尝试利用限制性内切酶 MitoRE-SmaI 或 MitoRE-XmaI 在含有该致病突变的杂交细胞中特异性消除突变 mtDNA,挽救了部分表型^[40-41]。Bayona-Bafaluy 等^[42]也尝试

将 MitoRE 用于小鼠成体水平的 mtDNA 异质性转换,但由于其靶位点十分有限,在基因治疗中的应用非常局限。基于归巢核酸酶的 MitoARCUS 平台,能够进行一定的定制化改造,也已经被用于小鼠成体水平的线粒体 tRNA 突变(m.5024C>T)的靶向消除^[31]。MitoARCUS 的小尺寸、单体形式和高特异性在基因治疗等应用中具有优势;而人工核酸酶在靶向设计上更简单、灵活,应用范围更广。利用靶向线粒体的人工核酸酶(如 MitoZFN 和 MitoTALEN),研究者在体外培养的人类细胞中成功实现了靶向消除多种常见的致病突变 mtDNA,包括 mtDNA 大片段删除和点突变^[12-13]。随后,在一个携带 mtDNA 致病突变(m.5024C>T)的小鼠模型上,利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)递送 MitoZFN 或 MitoTALEN,均在成体的心脏和骨骼肌等多种组织中有效降低了突变 mtDNA 水平而提高了野生型 mtDNA 比例,从而一定程度恢复了线粒体功能^[14-15]。

这些在体外培养的人类杂交细胞或小鼠成体水平的研究,初步证实了靶向线粒体的核酸酶工具在基因治疗应用中的有效性。但是由于核酸酶介导的 mtDNA 编辑依赖于 mtDNA 的异质性状态,而可用的细胞或动物模型较为缺乏,相关研究也仅针对少数几种致病性突变进行了初步验证,未来还有待更多的评估。

3.2 mtDNA 碱基编辑技术的应用

mtDNA 碱基编辑技术能够诱导特异位点产生新 mtDNA 突变,为构建 mtDNA 突变模型提供了有力工具,可以弥补当前相关模型缺乏的现状(表 2)。Lee 等^[34]最早利用靶向线粒体的 DdCBE 碱基编辑器,构建 m.12918G>A 突变小鼠模型,模拟人类 *MT-ND5* 基因的一个致病突变(m.13513G>A),该突变与 Leigh 综合征、MELAS 和 LHON 综合征等多种疾病相关。虽然所获得的 F0 代小鼠模型刚出生时没有明显表型^[34],推测可能是因为尚未到发病时间或者是 mtDNA 突变比例偏低,有待后续研究,但该研究首次证明了利用 DdCBE 能够快速获得 mtDNA 突变动物模型。随后,DdCBE 被用于斑马鱼和大鼠等其他不同动物的 mtDNA 编辑,成功模拟了相关 mtDNA 突变病人的一些特征性临床表型^[37-38]。这些结果证实了 mtDNA 碱基编辑工具能够快速、高效构建 mtDNA 突变线粒体疾病动物模型,这在过去是难以实现的。最近,Silva-Pinheiro 等^[43]基于 DdCBE

系统构建了一个碱基编辑器文库(MitoKO),其可以靶向敲除小鼠线粒体基因组的全部蛋白编码基因,将为后续研究线粒体功能和构建 mtDNA 基因失活模型奠定基础。而另一项在大鼠的研究中,将 DdCBE 与 Cre/loxP 系统相结合,能够实现大鼠 mtDNA 编码蛋白的条件性敲除^[44]。

同时,mtDNA 碱基编辑工具在 mtDNA 突变疾病的基因治疗中也具有广阔应用前景。虽然由于可用模型的缺乏,目前的报道主要是利用 DdCBE 诱导野生型 mtDNA 产生突变,而非纠正致病性 mtDNA 突变,但已有的研究结果在编辑效率、特异性、递送策略等方面均能为将来的基因治疗应用提供重要线索。比如,Silva-Pinheiro 等^[36]尝试利用 AAV 递送 DdCBE,在成年和新生小鼠中均实现了心脏的在体 mtDNA 编辑,目标碱基的编辑效率分别高达 20%和 30%,而且延长 DdCBE 的作用时间能够提高靶向编辑效率。DdCBE 也已被用于人类非整倍体胚胎或正常二倍体胚胎 mtDNA 的编辑,但不同胚胎间编辑效率差异较大(如 m.3733G 位点在 2.77% ~ 58.97%之间),而卵裂期注射 mRNA(特别是 8 细胞期)的编辑效率显著高于合子期注射^[23,45]。这些探索性研究,可以为未来基因治疗中的编辑时期选择、载体递送策略、胚胎或在体编辑效率评估以及进一步优化提供有效参考。此外,在细胞和胚胎水平的研究结果显示,这些 mtDNA 碱基编辑工具存在线粒体基因组和核基因组水平的脱靶风险^[28-29,45],提示其临床应用中的潜在风险,未来需要更系统的评估。而通过一些优化策略,例如改造脱氨酶 DddA_{lox} 提高其保真性、共表达 DddA 的抑制蛋白或调控 DdCBE 的亚细胞定位等^[29-30],可以有效降低 DdCBE 的脱靶活性,为这些工具在基因治疗中的应用奠定了基础。

4 展望

长期以来,对线粒体基因组的编辑较为困难,缺乏有效策略。随着近年来基因编辑技术的飞速发展,多种 mtDNA 编辑工具被相继开发,但总体来说,可用的工具以及可实现的基因编辑类型还是很有限。核酸酶介导的 mtDNA 靶向消除和碱基编辑器介导的 mtDNA 碱基突变作为两类代表性技术,为 mtDNA 的靶向编辑提供了有效策略。值得注意的是,CRISPR/Cas 系统以其简单、灵活和高效等优势,在细胞核基因编辑中应用最为广泛,但目前难

以用于 mtDNA 编辑。解决 gRNA 难以递送到线粒体内的瓶颈问题,使 CRISPR/Cas 系统能有效用于 mtDNA 编辑,对该领域会有显著推动作用,值得更多的探索与突破。

过去由于技术限制,可用的 mtDNA 突变动物模型相当缺乏^[46],严重阻碍了相关疾病机制研究和治疗方法的开发。以 DdCBE 为代表的碱基编辑器,可以诱导产生 mtDNA 突变,能够有效用于模拟人类致病性 mtDNA 突变,从而构建相关疾病模型。但是,目前已构建的 mtDNA 突变动物模型仅有少数几种(表 2),未来还有很大的空白有待填补。此外,由于线粒体的遗传瓶颈效应,获得的动物模型在传代过程中突变 mtDNA 的比例可能产生很大变异,导致后代模型间难以达到一致,影响其应用^[10]。

mtDNA 突变相关线粒体疾病目前尚无有效治疗手段,mtDNA 编辑工具有望成为未来基因治疗的利器。但由于编辑效率、编辑类型、潜在的脱靶和旁观者效应等方面尚存在很多不足,还有待进一步改善。同时,由于 mtDNA 的多拷贝特征,很难实现 100% 的突变 mtDNA 消除或纠正,残留的突变 mtDNA 可能成为隐患。如果将 mtDNA 编辑联合线粒体替代技术^[47],可能在临床应用中更有利于降低残留突变 mtDNA 传递到后代的危险。

参 考 文 献(References)

- [1] Anzalone AV, Koblan LW, Liu DR. Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(7): 824-844.
- [2] Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(4): 199-214.
- [3] Tan J, Forner J, Karcher D, et al. DNA base editing in nuclear and organellar genomes [J]. *Trends Genet*, 2022, 38(11): 1147-1169.
- [4] Rackham O, Filipovska A. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(10): 606-623.
- [5] Yin T, Luo J, Huang D, et al. Current progress of mitochondrial genome editing by CRISPR [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 883459.
- [6] Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(2): 101-110.
- [7] Peeva V, Blei D, Trombly G, et al. Linear mitochondrial DNA is rapidly degraded by components of the replication machinery [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1727.
- [8] Nissanka N, Bacman SR, Plastini MJ, et al. The mitochondrial DNA polymerase gamma degrades linear DNA fragments precluding the formation of deletions [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2491.
- [9] Fu Y, Tigano M, Sfeir A. Safeguarding mitochondrial genomes in higher eukaryotes [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(8): 687-695.
- [10] Stewart JB, Freyer C, Elson JL, et al. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease [J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(9): 657-662.
- [11] Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease [J]. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(26): 3093-3099.
- [12] Gammage PA, Rorbach J, Vincent AI, et al. Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(4): 458-466.
- [13] Bacman SR, Williams SL, Pinto M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs [J]. *Nat Med*, 2013, 19(9): 1111-1113.
- [14] Gammage PA, Viscomi C, Simard ML, et al. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1691-1695.
- [15] Bacman SR, Kauppila JHK, Pereira CV, et al. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNA^{Ala} levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation [J]. *Nat Med*, 2018, 24(11): 1696-1700.
- [16] Bi R, Li Y, Xu M, et al. Direct evidence of CRISPR-Cas9-mediated mitochondrial genome editing [J]. *Innovation*, 2022, 3(6): 100329.
- [17] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [18] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551(7681): 464-471.
- [19] Yang L, Briggs AW, Chew WL, et al. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13330.
- [20] Mok BY, de Moraes MH, Zeng J, et al. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing [J]. *Nature*, 2020, 583(7817): 631-637.
- [21] Mok BY, Kotrys AV, Raguram A, et al. CRISPR-free base editors with enhanced activity and expanded targeting scope in mitochondrial and nuclear DNA [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40(9): 1378-1387.
- [22] Lee S, Lee H, Baek G, et al. Enhanced mitochondrial DNA editing in mice using nuclear-exported TALE-linked deaminases and nucleases [J]. *Genome Biol*, 2022, 23(1): 211.
- [23] Wei Y, Xu C, Feng H, et al. Human cleaving embryos enable efficient mitochondrial base-editing with DdCBE [J]. *Cell Discov*, 2022, 8(1): 7.

- [24] Lim K, Cho SI, Kim JS. Nuclear and mitochondrial DNA editing in human cells with zinc finger deaminases [J]. Nat Commun, 2022, 13: 366.
- [25] Willis JCW, Silva-Pinheiro P, Widdup L, et al. Compact zinc finger base editors that edit mitochondrial or nuclear DNA *in vitro* and *in vivo* [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 7204.
- [26] Mok YG, Lee JM, Chung E, et al. Base editing in human cells with monomeric DddA-TALE fusion deaminases [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 4038.
- [27] Cho SI, Lee S, Mok YG, et al. Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases [J]. Cell, 2022, 185(10): 1764–1776.e12.
- [28] Wei Y, Li Z, Xu K, et al. Mitochondrial base editor DdCBE causes substantial DNA off-target editing in nuclear genome of embryos [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 27.
- [29] Lei Z, Meng H, Liu L, et al. Mitochondrial base editor induces substantial nuclear off-target mutations [J]. Nature, 2022, 606(7915): 804–811.
- [30] Lee S, Lee H, Baek G, et al. Precision mitochondrial DNA editing with high-fidelity DddA-derived base editors [J]. Nat Biotechnol, 2023, 41(3): 378–386.
- [31] Zekonyte U, Bacman SR, Smith J, et al. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA *in vivo* [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3210.
- [32] Xu H, Deluca SZ, O'farrell PH. Manipulating the metazoan mitochondrial genome with targeted restriction enzymes [J]. Science, 2008, 321(5888): 575–577.
- [33] Srivastava S, Moraes CT. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans [J]. Hum Mol Genet, 2005, 14(7): 893–902.
- [34] Lee H, Lee S, Baek G, et al. Mitochondrial DNA editing in mice with DddA-TALE fusion deaminases [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1190.
- [35] Guo J, Zhang X, Chen X, et al. Precision modeling of mitochondrial diseases in zebrafish via DdCBE-mediated mtDNA base editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 78.
- [36] Silva-Pinheiro P, Nash PA, van Haute L, et al. *In vivo* mitochondrial base editing via adeno-associated viral delivery to mouse post-mitotic tissue [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 750.
- [37] Qi X, Chen X, Guo J, et al. Precision modeling of mitochondrial disease in rats via DdCBE-mediated mtDNA editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 95.
- [38] Guo J, Zhang X, Chen X, et al. Precision modeling of mitochondrial diseases in zebrafish via DdCBE-mediated mtDNA base editing [J]. Cell Discov, 2021, 7(1): 78.
- [39] Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches [J]. EMBO Rep, 2020, 21(3): e49612.
- [40] Tanaka M, Borgeldt HJ, Zhang J, et al. Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria [J]. J Biomed Sci, 2002, 9(6): 534–541.
- [41] Alexeyev MF, Venediktova N, Pastukh V, et al. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes [J]. Gene Ther, 2008, 15(7): 516–523.
- [42] Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, et al. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(40): 14392–14397.
- [43] Silva-Pinheiro P, Mutti CD, Van Haute L, et al. A library of base editors for the precise ablation of all protein-coding genes in the mouse mitochondrial genome [J]. Nat Biomed Eng, 2023, 7(5): 692–703.
- [44] Tan L, Qi X, Kong W, et al. A conditional knockout rat resource of mitochondrial protein-coding genes via a DdCBE-induced premature stop codon [J]. Sci Adv, 2023, 9(15): eadf2695.
- [45] Chen X, Liang D, Guo J, et al. DdCBE-mediated mitochondrial base editing in human 3PN embryos [J]. Cell Discov, 2022, 8(1): 8.
- [46] Stewart JB. Current progress with mammalian models of mitochondrial DNA disease [J]. J Inherit Metab Dis, 2021, 44(2): 325–342.
- [47] Chinnery PF. Mitochondrial replacement in the clinic [J]. N Engl J Med, 2020, 382(19): 1855–1857.

[收稿日期] 2022-11-28