

DISS. ETH NO. 29831

Rational Engineering and Directed Evolution of CRISPR-Cas9
Enzymes

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

LUKAS DIETER SCHMIDHEINI

Master of Science, ETH Zurich

born on *19.08.1992*

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. med. Markus Stoffel, examiner

Prof. Dr. Jörn Piel, co-examiner

Prof. Dr. Gerald Schwank, co-examiner

2023

SUMMARY

Harnessing the power of genetic manipulation holds transformative potential for medical science, offering hope to millions affected by genetic disorders worldwide. Precision genome editing of human DNA is at the forefront of this revolution, promising to redefine the treatment of heritable diseases, potentially providing a one-time, enduring remedy. Beyond addressing monogenetic disorders, this technology also presents an opportunity to mitigate the risk of prevalent diseases, such as coronary heart disease, even in individuals without identifiable pathogenic mutations. Following the discovery of CRISPR-Cas9, the idea of precise DNA editing has catalyzed extensive research, driving the development of sophisticated tools capable of efficiently installing all possible single nucleotide alterations, as well as short insertions and deletions. These advances were possible due to the discovery that DNA modifying enzymes can be fused to Cas systems, resulting in so called base and prime editing systems. These systems have been applied across various animal models, curing several genetic disorders, and have entered clinical trials with multiple strategies showing promising results. The work described herein consists of two manuscripts accepted at peer-reviewed journals, describing improvements in genome editing tools. A third manuscript, which is in the process of being submitted, describes a protein engineering method that was developed alongside the other two projects.

The first manuscript, 'Replacing the Cas9 HNH domain by deaminases generates base editors with an alternative targeting scope', was published in *Molecular Therapy – Nucleic Acids* in

2021 and describes a novel adenine base editor. In this study, I initially attempted to generate a smaller base editor by replacing the HNH nuclease domain of Cas9 from *Streptococcus pyogenes* with a short peptide linker. While this base editor was still functional, its activity was substantially lower than that of the classical base editor with the deaminase fused to the N-terminus of Cas9. However, repositioning the deaminase enzyme to the site of the excised HNH domain not only fully reinstated base editing activity but also altered single-stranded DNA accessibility. This led to a shift of the editing window to positions more proximal to the protospacer-adjacent motif (PAM).

The second manuscript, 'Continuous directed evolution of a compact *CjCas9* variant with broad PAM compatibility', was published in *Nature Chemical Biology* in 2023 and describes the development of a highly active and compact Cas9 orthologue. This study describes Cas9 from *Campylobacter jejuni* (*CjCas9*), which in its wild-type form induces only low levels of DNA cleavage and can only cleave approximately at every 50th nucleotide position within a genome. Developing a combination of directed evolution strategies allowed us to engineer a novel *CjCas9* variant. This protein, termed *evoCjCas9*, has a two times higher nuclease activity than wild-type *CjCas9*. Moreover, it has a substantially increased targeting range due to a more relaxed PAM requirement, recognizing approximately every fifth nucleotide within a genome. With *CjCas9* being the most compact Cas9 enzyme described to date, we could also generate *CjCas9* base editor constructs that could be expressed from single adeno-associated viruses, leading to highly efficient base editing *in vivo* in mice.

The third manuscript describes a hardware platform that facilitates the execution of the complex phage-assisted continuous directed evolution experiments described in the second manuscript. This platform has been developed and optimized over the last few years, and in this study, we describe how it can be harnessed for the evolution of proteins and enzymes.

Taken together, I utilized structure-based rational protein design and automated continuous directed protein evolution to develop novel genome editing tools with enhanced activity, broadened targeting scope, and reduced size.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Nutzung der Möglichkeiten der Genmanipulation birgt ein transformatives Potenzial für die medizinische Wissenschaft und bietet Millionen von Menschen, die weltweit von genetischen Störungen betroffen sind, Hoffnung. Die präzise Editierung der menschlichen DNA steht an der Spitze dieser Revolution und verspricht, die Behandlung von Erbkrankheiten neu zu definieren und möglicherweise eine einmalige, dauerhafte Lösung zu bieten. Neben der Behandlung monogenetischer Erkrankungen bietet diese Technologie auch die Möglichkeit, das Risiko weit verbreiteter Krankheiten, wie z. B. koronarer Herzkrankheiten, selbst bei Personen ohne erkennbaren pathogenen Mutationen zu mindern. Nach der Entdeckung von CRISPR-Cas9 hat die Idee des präzisen DNA-Editierens umfangreiche Forschungsarbeiten ausgelöst und die Entwicklung hochentwickelter Werkzeuge vorangetrieben, die in der Lage sind, alle möglichen einzelnen Nukleotidveränderungen, sowie kurze Insertionen und Deletionen, effizient zu installieren. Möglich wurden diese Fortschritte durch die Entdeckung, dass DNA-verändernde Enzyme mit Cas-Systemen fusioniert werden können, was zu sogenannten «Base» und «Prime Editing» Systemen führte. Diese Systeme wurden in verschiedenen Tiermodellen angewandt, um zahlreiche genetische Störungen zu heilen, und sind in klinischer Erprobung, wobei mehrere Strategien vielversprechende Ergebnisse zeigen. Die hier beschriebene Arbeit besteht aus zwei Manuskripten, die in von Fachleuten begutachteten Fachzeitschriften angenommen wurden und Verbesserungen dieser Genbearbeitungswerkzeuge beschreiben. Ein drittes Manuskript, das derzeit eingereicht wird, beschreibt eine Protein-Veränderungs-Methode, die parallel zu den beiden anderen Projekten entwickelt wurde.

Das erste Manuskript mit dem Titel "Replacing the Cas9 HNH domain by deaminases generates base editors with an alternative targeting scope" (Ersetzen der Cas9 HNH-Domäne durch Deaminasen erzeugt Basen-Editoren mit einem alternativen Zielbereich) wurde 2021 in

Molecular Therapy - Nucleic Acids veröffentlicht und beschreibt einen neuartigen Adenin-Basen-Editor. In dieser Studie habe ich zunächst versucht, einen kleineren Baseneditor zu erzeugen, indem ich die HNH-Nuklease-Domäne von Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* durch einen kurzen Peptidlinker ersetzt habe. Dieser Basen-Editor war zwar noch funktionsfähig, aber seine Aktivität war wesentlich geringer als die des klassischen Basen-Editors mit der an den N-Terminus von Cas9 fusionierten Deaminase. Durch die Neupositionierung des Deaminase-Enzyms an der Stelle der ausgeschnittenen HNH-Domäne wurde jedoch nicht nur die Basen-Editieraktivität wiederhergestellt, sondern auch die Zugänglichkeit der einzelsträngigen DNA verändert. Dies führte zu einer Verschiebung des Editierfensters zu Positionen, die näher am Protospacer Adjacent Motiv (PAM) liegen.

Das zweite Manuskript mit dem Titel "Continuous directed evolution of a compact *CjCas9* variant with broad PAM compatibility" (Kontinuierliche, gelenkte Evolution einer kompakten *CjCas9*-Variante mit breiter PAM-Kompatibilität) wurde 2023 in *Nature Chemical Biology* veröffentlicht und beschreibt die Entwicklung eines hochaktiven und kompakten Cas9-Orthologs. In dieser Studie wird Cas9 aus *Campylobacter jejuni* (*CjCas9*) beschrieben, das in seiner Wildtyp-Form nur geringe Mengen an DNA-Spaltung induziert und nur etwa an jeder 50-sten Nukleotidposition in einem Genom. Durch die Entwicklung einer Kombination von gerichteten Evolutionsstrategien konnten wir eine neue *CjCas9*-Variante entwickeln. Dieses Protein, *evoCjCas9* genannt, hat eine doppelt so hohe Nukleaseaktivität wie das Wildtyp-*CjCas9*. Darüber hinaus verfügt es über einen wesentlich größeren Zielbereich, da die PAM-Anforderungen lockerer sind und es etwa jedes fünfte Nukleotid in einem Genom erkennt. Da *CjCas9* das kompakteste bisher beschriebene Cas9-Enzym ist, konnten wir auch *CjCas9*-Base-Editor-Konstrukte erzeugen, die von einzelnen Adeno-assoziierten Viren exprimiert werden können, was zu hocheffizientem Base-Editing *in vivo* in Mäusen führt.

Das dritte Manuskript beschreibt eine Hardware-Plattform, die die Durchführung der im zweiten Manuskript beschriebenen komplexen, Phagen-unterstützten Experimente zur kontinuierlichen, gerichteten Evolution erleichtert. Diese Plattform wurde während den letzten Jahren entwickelt und optimiert, und in dieser Studie beschreiben wir, wie sie für die Evolution von Proteinen und Enzymen genutzt werden kann.

Zusammengefasst habe ich strukturbasiertes, rationales Proteindesign und automatisierte kontinuierliche gerichtete Proteinevolution eingesetzt, um neuartige Genom-Editing-Tools mit verbesserter Aktivität, erweitertem Zielbereich und geringerer Größe zu entwickeln.