การแก้ไขความผิดปกติของการกลายพันธุ์ใน Beta-thalassemia (41/42 del) iPSCs โดยใช้ CRISPR/Cas9dn

CRISPR/Cas9dn Mediated Gene Editing in Beta-Thalassemia (41/42 del) iPSCs

ภัทรวรรณ มีฮาตร์ (Phattarawan Meehart)* ดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ (Dr.Praewphan Ingrungrueangloet)**
ดร.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา (Dr.Nipan Israsena)***

บทคัดย่อ

บีตาธาลัสซีเมีย (Beta thalassemia) เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขสำคัญของประเทศไทย สาเหตุบีตาธาลัสซีเมียเกิดจากการกลายพันธุ์ของ beta-globin gene ทำให้ผู้ป่วยมีเลือดจาง ซึ่งการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ deletion ของ TCTT ที่ exon2 codon 41/42 ของ beta-globin gene (beta-thal 41/42 del) ทำให้เกิด frameshift ใน coding DNA sequence โดยพบร้อยละ 38 ของผู้ป่วยที่เป็นบีตาธาลัสซีเมีย ความก้าวหน้าของเทคโนโลยี iPSCs และ gene targeting เป็นความหวังในการรักษาโรคทางพันธุกรรมรวมทั้งบีตาธาลัสซีเมีย ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง Beta-thalassemia (41/42 del) iPSCs (beta-thal 41/42 del iPSCs) จากผู้ป่วยที่มีความผิดปกติแบบ heterozygous แล้วแก้ไขการกลายพันธุ์ให้ถูกต้องด้วย CRISPR/Cas9dn พบว่า CRISPR/Cas9dn ช่วยแก้ไข allele ที่เกิดการกลายพันธุ์ใน beta-thal 41/42 del iPSCs ให้ถูกต้องได้ งานวิจัยนี้เป็นพื้นฐานในการนำเทคโนโลยี iPSCs และ gene targeting ไปใช้พัฒนาการรักษาผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

Beta-thalassemia, the most common autosomal recessive blood disorders. It is caused by mutations in the beta - globin gene which lead to ineffective beta globin chain synthesis. TCTT deletion at codon 41/42 in exon2 of beta-globin gene, which causes frameshift mutation, is the most common mutation of beta-thalassemia found in Thailand (38%). Induced pluripotent stem cells (iPSCs) generation from somatic cells of patient and gene targeting technology provides new approaches to cure beta-thalassemia. In this research, we can generate iPSCs from patient with heterozygous frameshift 41/42 mutation (beta-thal 41/42 del iPSCs) and correct the mutation with CRISPR/Cas9dn. This research provides opportunity for the further treatment of patient with beta-thalassemia using patient specific iPSCs engineering.

คำสำคัญ: บีตาธาลัสซีเมียม การแก้ไขลำดับพันธุกรรม

Keywords: Beta-thalassemia, Gene editing

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

*** นักวิจัยหลังปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

บทนำ

บีตาธาลัสซีเมีย (Beta thalassemia) เป็นหนึ่งในโรคทางพันธุกรรมที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โดยสาเหตุของ บีตาธาลัสซีเมียเกิดจากการกลายพันธุ์ ที่ beta-globin gene และการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นพบได้หลายแบบทั้งแบบ point mutation หรือ deletion ของ nucleotide บางส่วน การเกิดการกลายพันธุ์ที่ beta-globin gene ทำให้ไม่สามารถสร้างโปรตีน beta-globin หรือสร้างได้น้อยลง ส่งผลให้ผู้ป่วยมีเลือดจาง (anemia) และการกลายพันธุ์ที่พบมากสุดในประเทศไทยคือ การเกิด deletion ของ TCTT ที่ตำแหน่ง codon 41/42 ของ beta-globin gene ทำให้เกิด frameshift ใน coding DNA sequence (beta-thal 41/42 del) โดยพบร้อยละ 38 ของผู้ป่วยที่เป็นบีตาธาลัสซีเมีย (กิตติ, 2556) ในการรักษาผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย ผู้ป่วยจะต้องได้รับการให้เลือด (blood transfusion) เป็นประจำ และตลอดชีวิต ซึ่งการรับเลือดเป็นประจำส่งผลให้มีภาวะเหล็กเกินในร่างกาย (iron overload) ป่วยจึงต้องทำการขับเหล็กออกด้วย (iron chelation) ในการที่จะรักษาผู้ป่วยให้หายขาดผู้ป่วยจะต้องได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก (bone marrow transplantation) แต่ยังมีปัญหาเรื่องการเข้ากันได้ของผู้รับและผู้ให้ที่มีอยู่เพียงเล็กน้อย ทำให้ความสำเร็จในการปลูกถ่ายไขกระดูกเกิดขึ้นได้น้อยมาก (Antonio, Renzo, 2010; Galanello, Origa, 2010; Higgs, Engel, 2012; Old, 2003) human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) และเทคโนโลยี gene targeting เป็นความหวังใหม่ที่จะนำมาใช้รักษาผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียโดย iPSCs สร้างจาก somatic cells ซึ่งจะถูก reprogram ด้วย pluripotent transcription factors ได้แก่ Oct3/4, Sox2, c-Myc และ Klf4 จนกลายเป็นเซลล์ในระยะ pluripotent ที่มีคุณสมบัติแบ่งตัวอย่างไม่จำกัดโดยคงความเป็นตัวเองอยู่ (self-renewal) และสามารถเปลี่ยนแปลง (differentiation) ไปเป็นเซลล์ต่างๆ ในร่างกายได้ ทำให้การสร้าง iPSCs เป็นความหวังในการสร้างเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใหม่มาทดแทนที่เสียไป (cell replacement therapy) (Okita et al., 2007; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Takahashi, Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007; Yu et al., 2007)

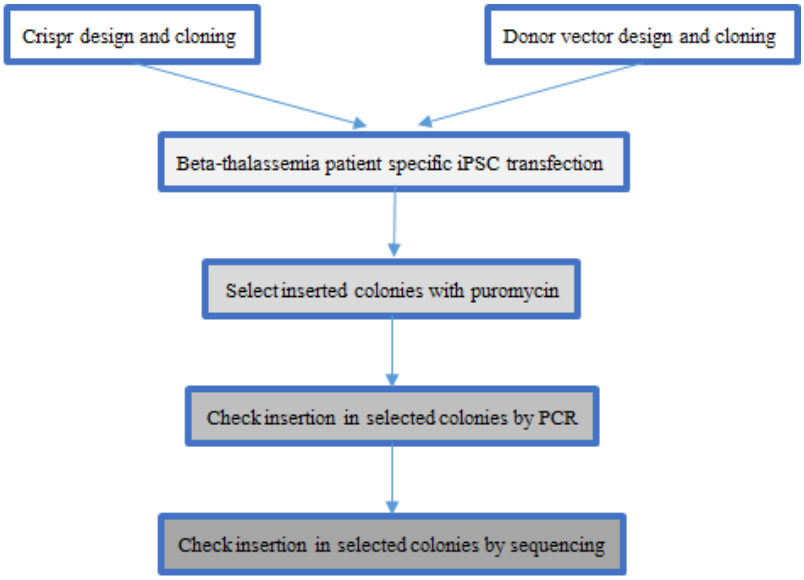
ในขณะที่เทคโนโลยี gene targeting คือ การแก้ไขลำดับพันธุกรรม ด้วย homologous recombination (HR) ซึ่ง CRISPR-Cas9 system เป็นเครื่องมือหนึ่งในเทคโนโลยี gene targeting โดย CRISPR-gRNA ไปจับกับ DNA เป้าหมาย แล้วชักนำให้ Cas9 มาตัดแบบ DSB ซึ่งเซลล์จะพยายามซ่อมแซม DSB ด้วย non homologous end joining (NHEJ) หรือ HR (Qurrat et al., 2015; Mali, Esvelt, Church, 2013; Shrivastav, De Haro, Nickoloff, 2008) แต่เนื่องจาก Cas9 ทำให้เกิด off-target indel ได้สูงจึงได้มีการดัดแปลง Cas9 จากที่สามารถตัดแบบ double strand ให้ตัดแบบ single strand หรือที่เรียกว่า nick โดย Cas9 ดังกล่าวเรียกว่า Cas9 nickase (Cas9n) ซึ่งการทำให้เกิด nick ที่ทั้งสองสายของ DNA (dual Cas9 nickases หรือ Cas9dn) ในบริเวณที่ใกล้กัน โดยใช้ gRNA คนละอัน จะทำให้เซลล์พยายามซ่อมด้วย NHEJ หรือ HR แต่การทำให้เกิด nick ที่สาย DNA เพียงเส้นเดียว จากการที่ gRNA ไปจับที่ off-target จะเกิดการซ่อมแซมแบบ base excision repair ดังนั้น Cas9n จึงทำให้เกิด off-target indel ได้น้อยกว่า wild type Cas9 (Ran et al., 2013; Frock et al., 2015; Kim et al., 2015; Tsai et al., 2015; Wang et al., 2015; Merkle et al., 2015)

ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการพัฒนาวิธีการแก้ไขการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 41/42 ของ beta globin gene ด้วย CRISPR/Cas9dn ให้มีประสิทธิภาพ โดยใช้ beta-thal 41/42 del iPSCs เป็น model เพื่อนำไปสู่การแก้ไขการกลายพันธุ์ใน adult hematopoietic stem cell สำหรับปลูกถ่ายรักษาในอนาคต

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อแก้ไขการกลายพันธุ์ที่ beta-globin gene ตำแหน่ง codon 41/42 (TCTT deletion) ของ exon 2 ใน iPSCs ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย (41/42 del) ด้วย CRISPR และ donor vector

วิธีการวิจัย



1. การสร้าง iPSCs (induced pluripotent stem cells) จากผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย (41/42 del)

1.1 เก็บเลือดจากผู้ป่วย จำนวน 10 ml แล้วปั่นแยก peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) หรือเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear โดยใช้ Ficoll plaque plus

1.2 นำ PBMCs ที่แยกได้มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในอาหารจำเพาะเป็นเวลา 6 วัน

1.3 Episomal vector ที่มีการแสดงออกของ Transcription factor คือ OCT4, SOX2, KLF4 และ c-MYC จะถูก transfect เข้าสู่ PBMC ด้วยเทคนิค nucleofection แล้วเพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) ในอาหารจำเพาะสำหรับ iPSCs

1.4 ทำการคัดแยก iPSCs colonies หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน เพื่อเพิ่มจำนวนและทดสอบคุณสมบัติความเป็น Pluripotent และนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. ออกแบบและโคลน CRISPR เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย (41/42 del)

2.1 ออกแบบ gRNA (guide RNA) ซึ่งจะทำหน้าที่ไปจับกับตำแหน่ง DNA เป้าหมายหรือตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยในการออกแบบจะทำการออกแบบที่ http://crispr.mit.edu/

2.2 สังเคราะห์ single strand oligo nucleotide ของ gRNA ตามที่ออกแบบไว้ในขั้นตอนที่ 1 เพื่อโคลนเข้า pX335 vector plasmid (Addgene)

2.3 โคลน oligo nucleotide เข้า pX335 backbone โดยลำดับขั้นตอนในการโคลนได้ทำตามกลุ่มของ Zhang

2.4 ตรวจสอบความถูกต้องของ CRISPR subcloning ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม

3. ออกแบบและโคลน donor vector เพื่อใช้เป็นแม่แบบในการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย (41/42 del)

3.1 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ beta-globin gene ที่จะทำหน้าที่เป็น homology arm แล้วโคลนเข้า Topo GW vector (pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit, Thermofisher)

3.2 เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ selection cassette คือ loxp-PGK-puro-loxp ซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยเลือกโคโลนีที่เกิด homologous recombination โดยมี OCT4-eGFP-PGK-Puro vector (Addgene) เป็นแม่แบบ

3.3 โคลน loxp-PGK-puro-loxp (ข้อ 3.2) ให้เข้าแทรกตำแหน่ง homology arm บน Topo GW vector (ข้อ 3.1) ที่ตำแหน่ง intron โดยใช้ Infusion HD cloning kit (clontech)

3.4 ตรวจความถูกต้องของ donor vector sub-cloning ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม

4. ทดสอบความสามารถของ CRISPR/Cas9n ในการกระตุ้น DSB ในตำแหน่งที่ออกแบบไว้ด้วย T7 endonuclease1 (T7E1)

4.1 fibroblast ที่ได้จาก beta-thal 41/42 del iPSCs (beta-thal 41/42 del iPSCs derived fibroblast) ถูก Transfect ด้วย CRISPR/Cas9n plasmid ด้วยวิธี Nucleofection โดยใช้ชุด kit Amaxa® Cell Line Nucleofector® NHDF

4.2 48-72 ชั่วโมง หลัง transfection ทำการสกัด genomic DNA จาก fibroblast ที่ถูก transfected

4.3 ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ beta-globin gene ในบริเวณที่กระตุ้นให้เกิด DSB ตามที่ออกแบบไว้

4.4 ทำ Heteroduplex formation หรือการทำให้สายลำดับพันธุกรรมที่กระตุ้นให้เกิด DSB จับคู่กันใหม่กับลำดับพันธุกรรมที่ไม่ถูกกระตุ้นให้เกิด DSB โดยใช้ Thermocycler ทำให้สารพันธุกรรมแยกสาย (denature) ด้วยอุณหภูมิที่สูงแล้วลดอุณหภูมิลงเพื่อให้สสารพันธุกรรมจับกันใหม่ ซึ่งถ้าสายที่ถูกกระตุ้นให้เกิด DSB จับกับสายที่ไม่ถูกกระตุ้นจะทำให้สายสารพันธุกรรมจับกันไม่สนิท (mismatched base pairs) ลักษณะดังกล่าวสามารถถูกตัดได้ด้วย T7 endonuclease 1

	Control (uL)	Test (uL)
4142 fibroblast	20	10
4142 fibroblast+CRISPR/Cas9n	-	10
Buffer2 (NEB)	2.5	2.5
ddH_2O to	24	24

4.5 ตัดตำแหน่งสารพันธุกรรมที่จับกันไม่สนิท ด้วย T7 endonuclease 1 (T7E1)

5. แก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ใน iPSCs ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมีย (41/42 del) หรือ beta-thal 41/42 del iPSCs ด้วย CRISPR/Cas9n และ donor vector

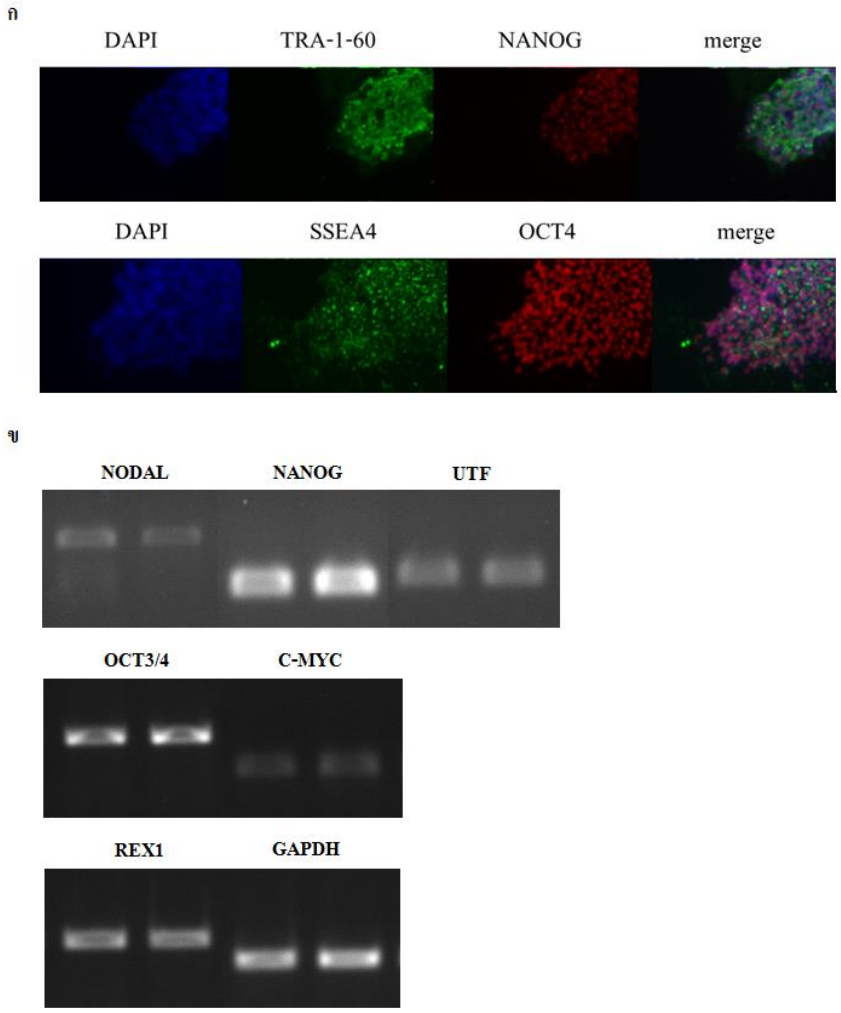
5.1 ทำการ transfect CRISPR/Cas9n plasmid และ donor vector เข้า beta-thal 41/42 del iPSCs ด้วยวิธี Nucleofection โดยใช้ชุด P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X kit

5.2 หลังจาก transfect แล้ว 3 วัน ทำการเลือก colonies ด้วย Puromycin

5.3 ตรวจสอบการแก้ไขลำดับพันธุกรรมใน Puromycin resistant colonies ด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบส

ผลการวิจัย

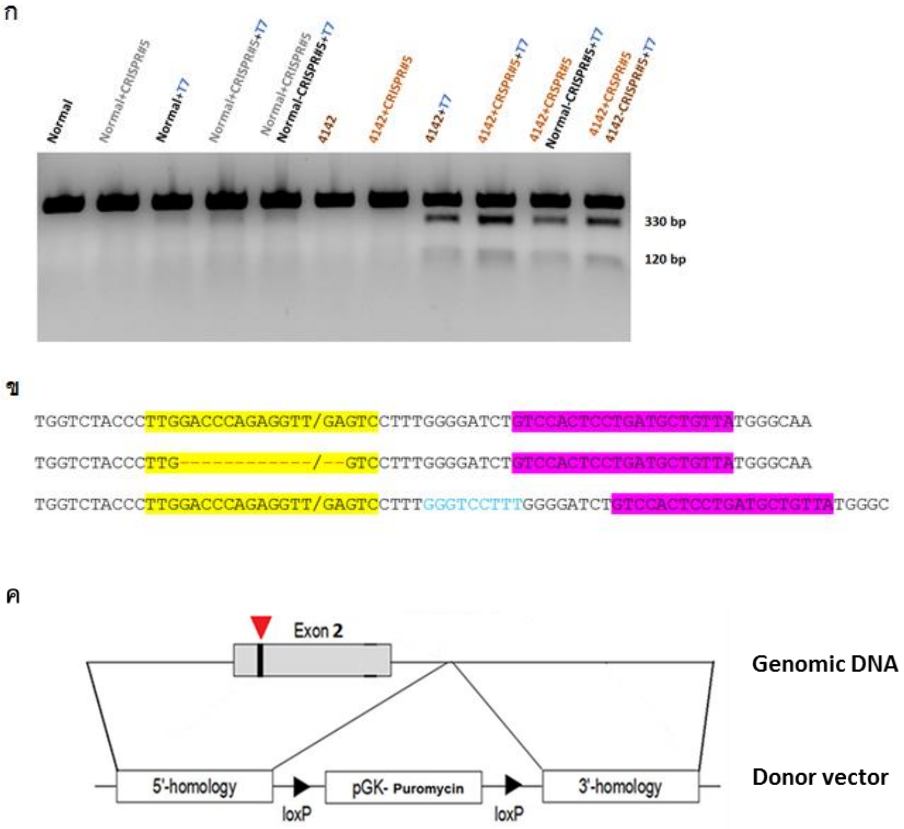
เพื่อสร้าง beta-thal 41/42 del iPSCs คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บและแยก PBMC ของผู้ป่วยบีตาธาลัสซีเมียที่มีการกลายพันธุ์ที่ codon 41/42 ของ beta-globin gene แล้วเหนี่ยวนำให้เป็น pluripotent cell ด้วยการ transfect Episomal vector (Oct4, SOX2, Klf4 และ C-Myc) แล้วทำการคัดเลือก iPSCs Colonies เพื่อมาทดสอบคุณสมบัติ pluripotent markers ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining และ RT-PCR จากผลการทดสอบพบว่า beta-thal 41/42 del iPSCs ที่คัดเลือกได้มีการแสดงออกของ NODAL, NANOG, UTF, OCT3/4, C-MYC, TRA-1 60, SSEA4 และ REX1 ดังรูปที่1 ก และ ข แสดงให้เห็นว่า patient specific iPSCs ที่สร้างขึ้นมีคุณสมบัติ pluripotency



รูปที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์การแสดงออกของ Pluripotent maker ด้วยเทคนิค ก. Immune-fluorescence (IF), ข. RT-PCR (ซ้าย ESCs และ ขวา beta-thal 41/42 del iPSCs)

เพื่อที่จะพัฒนาวิธีการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่ตำแหน่ง codon 41/42 ของ beta-globin gene ด้วยเทคนิค gene targeting คณะผู้วิจัยได้เลือก CRISPR/Cas9dn เป็นเครื่องมือในการกระตุ้นให้เกิด DSB จึงได้ทำการออกแบบ gRNA ให้ไปจับในตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์เป็นจำนวน 5 คู่ จากนั้นทดสอบการเกิด DSB ด้วย T7E1 โดย DNA ที่เกิด DSB break ในตำแหน่งที่ต้องการและมีการซ่อมด้วยกระบวนการ NHEJ จะสามารถถูกตัดได้ด้วย T7E1 ทำให้เกิด band

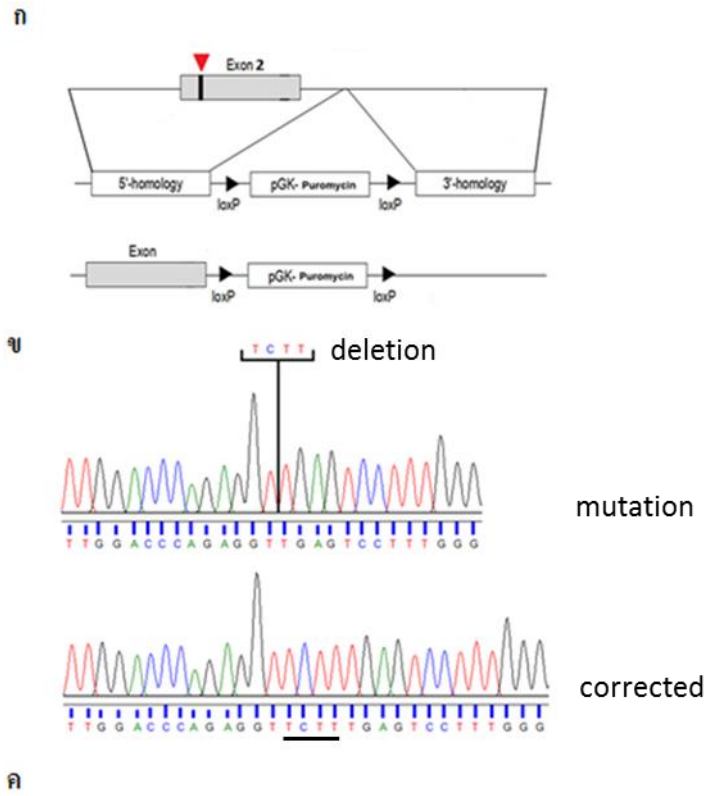
ขนาด 330 bp และ 120 bp เนื่องจากคนไข้มีลำดับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง codon 41/42 ของ beta-globin gene แบบ heterozygous ดังนั้นการตัดด้วย T7E1 ในเซลล์ที่ไม่มีการใส่ CRISPR/Cas9dn จะพบว่ามี band เกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ดีเมื่อทำการ transfect CRISPR คู่ที่ 5 เข้าไปในเซลล์ จะพบว่า band ขนาด 330 bp จะหนากว่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูก transfect แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่า CRISPR คู่ที่ 5 น่าจะสามารถกระตุ้นให้เกิด DSB ได้ และเมื่อทำการยืนยันผลการเกิด DNA DSB ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing analysis) พบว่า CRISPR คู่ที่ 5 ทำให้เกิด DSB ใน allele ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ร้อยละ 20 ในขณะที่ allele ที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์จะไม่ถูกกระตุ้นให้เกิด DSB ดังรูปที่ 2 ก และ ข จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CRISPR คู่ 5 สามารถกระตุ้นให้เกิด DSB ที่ beta-globin gene ตำแหน่ง codon 41/42 ได้อย่างจำเพาะ และเพื่อที่จะทำการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธี homologous recombination คณะผู้วิจัยได้ออกแบบ donor vector เพื่อเป็นแม่แบบในการแก้ไขลำดับพันธุกรรม ดังรูปที่ 2 ค



รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบการเกิด DSB ของ CRISPR คู่ที่ 5 ก. แสดงผลจากการตัดด้วย T7E1, ข. แสดงผล sequencing analysis, ค donor vector

เพื่อแก้ไขลำดับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ใน beta-thal 41/42 del iPSCs ผู้วิจัยได้ทำการ transfect CRISPR คู่ 5 และ donor vector เข้าใน beta-thal 41/42 del iPSCs แล้วทำการเลือก clone ที่เกิด homologous recombination ในเบื้องต้นด้วย Puromycin พบว่ามี Puromycin resistance iPSCs เป็นจำนวนมาก ทางคณะผู้วิจัยได้เลือก 12 clones เพื่อตรวจสอบการเกิด homologous recombination ที่ตำแหน่งของ beta-globin gene โดยใช้เทคนิค PCR และพบว่ามีการแทรกตัวของ selection cassette ที่ตำแหน่งดังกล่าวจำนวน 10 clones และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสและพบว่ามีการ

แก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ให้ถูกต้อง จำนวน 8 clones ดังรูปที่ 3 ข และ ค ดังนั้น CRISPR คู่ 5 และ donor vector สามารถแก้ไขลำดับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ใน beta-thal 41/42 del iPSCs ได้



วิธีการตรวจสอบ	จำนวนที่ได้
PCR	10/12
Sequencing	8/10

รูปที่ 3 การแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ beta-globin gene ตำแหน่ง codon 4142

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ปัจจุบันมีความพยายามในการนำเทคโนโลยี iPSCs และเทคโนโลยี gene targeting มาใช้ในการแก้ไขลำดับพันธุกรรมกันอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง CRISPR/Cas9 ไม่ว่าจะเพื่อสร้าง reporter genes ใน iPSCs เพื่อติดตามการแสดงออกของ gene ที่สนใจ (He X et al., 2016) หรือการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่ผิดให้เป็นถูก เช่น การแก้ไขการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิด โรคกล้ามเนื้อเจริญผิดเพี้ยนดีเอ็มดี (Duchenne Muscular Dystrophy) (Li et al., 2015), ฮีโมฟีเลียเอ (Hemophilia A) (Park et al., 2015), โรคซีสติกไฟโบรซีส (Cystic fibrosis) (Firth et al., 2015) รวมทั้งการกลายพันธุ์ใน B-globin gene ที่ทำให้เกิดบีตาธาลัสซีเมีย (Cradick et al., 2013; Song et al., 2014; Sun et al., 2014; Voit et al., 2013; Wang et al., 2012; Zou et al., 2011) ในกลุ่มของ frameshift 41/42 mutation ก็ได้มีความพยายามในการใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 เข้ามาช่วยแก้ไขลำดับเบสที่เกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวใน beta-thal 41/42 del iPSCs (Ou et al., 2016; Yang et al., 2016; Xie et al., 2014) แต่อย่างไรก็ดีงานวิจัยข้างต้นนั้น CRISPR gRNA ที่ออกแบบขึ้นไม่จำเพาะกับ

ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ทำให้ Cas9 มีโอกาสตัด allele ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่เป็น heterozygous mutation และเกิดการแก้ไขในตำแหน่งที่ไม่ต้องการ ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับการนำ CRISPR/cas9 ไปใช้ในการแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ที่ไม่สามารถทำการคัดเลือก และเพิ่มจำนวนได้เช่น adult HSC และการใช้ wild type Cas9 ซึ่งจะทำให้เกิด nick ที่สาย DNA ทั้งสองสายในบริเวณที่ใกล้กันทำให้เซลล์สามารถซ่อมแบบ NHEJ หรือ HR ได้ เพิ่มโอกาสการเกิด off-target indel ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในการรักษาต่อไป

ในงานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการสร้าง CRISPR gRNA ที่มีความจำเพาะต่อ frameshift 41/42 mutation ร่วมกับการใช้ Cas9dn (dual Cas9 nickases) ซึ่งทำให้เกิดการตัดที่สาย DNA เพียงเส้นเดียวของ double strand DNA และเหนี่ยวนำให้เกิดการซ่อมแซมแบบ base excision repair เท่านั้น จึงลดโอกาสการเกิด off-target indel ได้ดีกว่าการใช้ wild type Cas9 (Ran et al., 2013; Merkle et al., 2015) ซึ่ง CRISPR/Cas9dn ดังกล่าวสามารถแก้ไข flameshift 41/42 mutation ใน beta-thal 41/42 del iPSCs ได้ และน่าจะทำให้เกิดการสร้าง HBB ที่ปกติได้ ซึ่งจะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Niu และคณะที่เพิ่งตีพิมพ์ในเร็วๆนี้ (Niu etal. 2016) อย่างไรก็ดี gene corrected iPSCs derived $CD34^+$ cells ที่สร้างในหลอดทดลองด้วย protocol ที่มีในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในการนำไปใช้เพราะยังมีประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายไม่เทียบเท่ากับ adult HSCs การแก้ไขลำดับพันธุกรรมที่เกิดการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค gene editing ใน adult HSCs จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่ง designed CRISPR gRNA ที่สร้างได้มีประสิทธิภาพสูงพอที่จะพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ใน adult HSCs ต่อไป ซึ่ง beta-thal 41/42 del iPSCs ที่สร้างในการงานวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นในการสร้าง $CD34^+$ cells สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของ designed CRISPR ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนและเอื้อเฟื้อเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

กิตติ ต่อจรัส. Molecular Basis of Thalassemia and Hemoglobin Disorder. เวชสารแพทย์ทหารบก 2556; 66(1): 35-40.

Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, Bao G. CRISPR/Cas9 systems targeting beta-globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. Nucleic acids research 2013; 41 (20): 9584-9592.

Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E, Dargitz CT, Wright R, Khanna A, Gage FH, Verma IM. Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. Cell reports 2015; 12(9): 1385-1390.

Frock RL, Hu J, Meyers RM, Ho YJ, Kii E, Alt FW. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nature biotechnology 2015; 33(2): 179-186.

Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010; 5(11): 1750-1172.

He X, Tan C, Wang F, Wang Y, Zhou R, Cui D, You W, Zhao H, Ren J, Feng B. Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. Nucleic acids research 2016; 44 (9):1-14.

Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. Lancet 2012; 379: 373-383.

Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim JI, Kim JS. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. Nature methods 2015; 12(3): 237-243.

Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. Stem cell reports 2015; 4(1): 143-154.

Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nature methods 2013; 10(10): 957-963.

Merkle FT, Neuhausser WM, Santos D, Valen E, Gagnon JA, Maas K, Sandoe J, Schier AF, Eggan K. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. Cell reports 2015; 11(6): 875-883.

Niu X, He W, Song B, Ou Z, Fan D, Chen Y, Fan Y, Sun X. Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. Journal of Biological Chemistry 2016; 291: 16576-16585.

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germlinecompetent induced pluripotent stem cells. Nature 2007; 448: 313-317.

Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. Blood Rev 2003; 17: 43-53.

Ou Z, Niu X, He W, Chen Y, Song B, Xian Y, Fan D, Tang D, Sun X. The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human β-thalassemia in Mice. Scientific Reports 2016; 6: 1-13.

Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, Kim JH, Kim DW, Kim JS. Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. Cell Stem Cell 2015 Aug 6; 17(2): 213-220.

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 2008; 451(7175): 141-146.

Qurrat Ul Ain, Jee Young Chung, Yong-Hee Kim. Current and future delivery systems for engineered nucleases: ZFN, TALEN and RGEN. Journal of Controlled Release 2015; 205: 120-127.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell 2013; 154(6): 1380-1389.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell research 2008; 18(1): 134-147.

Song B, Fan Y, He W, Zhu D, Niu X, Wang D, Ou Z, Luo M, Sun X. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. Stem cells and development 2014; 24(9): 1053-1065.

Sun N, Zhao H. Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. Biotechnology and bioengineering 2014; 111(5): 1048-53.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. cell 2007; 131(5): 861-872.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-676.

Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, Wyvekens N, Khayter C, Iafrate AJ, Le LP, Aryee MJ. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nature biotechnology 2015; 33(2): 187-197.

Voit RA, Hendel A, Pruett-Miller SM, Porteus MH. Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. Nucleic acids research 2013; 42(2): 1365-1378.

Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, Zhang J, Chen J, Yao C, Zhao Q, Liu S, Chen K, Du J, Yang Z. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. Cell research 2012; 22(4): 637-648.

Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. nature. 2007; 448(7151): 318-324.

Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, Kan YW. Seamless gene correction of β-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. Genome research. 2014; 24(9): 1526-1533.

Yang Y, Zhang X, Yil, Hou Z, Chen J, Kou X, Zhao Y, Wang H, Sun Xf, Jiang C, Wang Y. Naıve Induced Pluripotent Stem Cells Generated From b-Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9. Stem Cell Translational Medicine 2016; 5: 8-19.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007; 318(5858): 1917-1920.

Zou J, Mali P, Huang X, Dowey SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. Blood 2011; 118(17): 4599-4608.