

การสร้างลักษณะการกลายพันธุ์แบบ Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin
ใน K562 ด้วยเอนไซม์ที่มีการตัดลำดับเบสแบบจำเพาะ
Establishment of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Mutation in K562
Using Site Specific Nuclease

เนตรชนก ลีลาอดิสร (Netchanok Leela-adisorn)* ดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ (Dr.Preawphan Ingrungrueangloet)**
ดร.นิพัจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา (Dr.Nipan Israsena)***

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียในกลุ่ม Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) มีการแสดงออกของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (Hemoglobin F; Hb F) มากกว่าปกติ ซึ่งช่วยลดความรุนแรงของโรคได้ ผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียในกลุ่ม HPFH ที่มีการ Deletion ของ 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene จะมีการแสดงออก Hb F ประมาณร้อยละ 40 ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยกลุ่มอื่นๆ และไม่แสดงอาการโลหิตจาง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตัด genome เพื่อให้เกิด DNA deletion ขนาดใหญ่เลียนแบบการเกิดการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยกลุ่ม HPFH ด้วยเทคนิค CRISPR/Cas9 ใน erythroleukemia cell line (K562) โดยพบว่า designed CRISPR sgRNA ร่วมกับ Cas9 สามารถทำให้เกิด DNA double strand break (DSB) และตัด DNA fragment ขนาด 3.5 kb ในตำแหน่งที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังประสบความสำเร็จในการสร้าง designed CRISPR sgRNA ที่สามารถตัด DNA ขนาดเล็ก (80 bp. ภายใน 3.5 kb) ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งการเกาะของ BCL11a ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ Hb F ทั้งนี้ genetic engineered K562 และ designed CRISPR sgRNA ที่สร้างได้จะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้สำหรับศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของ Hb F และพัฒนาวิธีการกระตุ้น Hb F สำหรับไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยต่อไป

ABSTRACT

Increasing levels of fetal hemoglobin expressed in Beta-Thalassemia patients of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) can ameliorate the clinical course of inherited disorders of beta globin gene expression. When this is compared to the other mutations, the patients who have deletion of 3.5 kb in γ - δ globin gene express high levels of fetal hemoglobin ($\geq 40\%$) and do not have clinical presentation of anemia. For this study, the natural deletion was mimicked in HPFH patients by developing genome editing method to cut a large region of DNA sequences, using CRISPR/Cas9 to modify DNA sequences in erythroleukemia cell line (K562). Designed CRISPR sgRNA with Cas9 used for cutting specific DNA sequences could induce DNA double strand break (DSB) and site-specific deletion of 3.5 kb in γ - δ globin gene. Additionally, designing CRISPR sgRNA, which could cut a small region of DNA sequences (80bp in 3.5 kb in γ - δ globin gene) including binding site of BCL11A was successfully developed. This site is an important transcription factor, which involves in a silencer of fetal hemoglobin. Hence, genetic engineered K562 and designed CRISPR sgRNA newly created will be available for further studies of control mechanism of fetal hemoglobin expression and fetal hemoglobin reactivation, which might provide effective treatment in Beta-thalassemia patients in the future.

คำสำคัญ: เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน การแก้ไขจีโนม

Keywords: Fetal Hemoglobin, Genome Editing, BCL11A

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** นักวิจัยหลังปริญญาเอก สาขาวิชาเซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟู คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

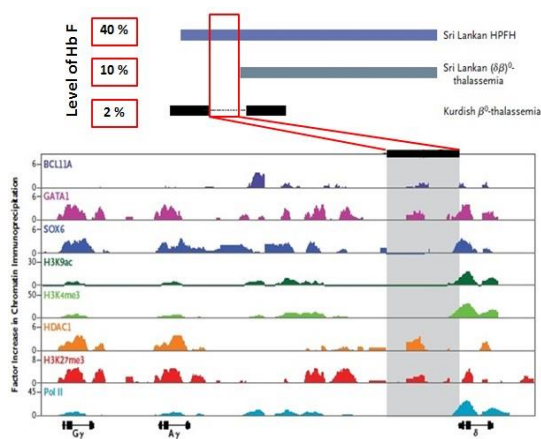
*** อาจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เบต้าธาลัสซีเมีย (Beta-Thalassemia) คือ โรคโลหิตจางที่เกิดขึ้นจากความผิดปกติทางพันธุกรรมของเบต้าโกลบินยีน โดยจะส่งผลกระทบต่อ Hemoglobin A ; Hb A ที่มีเบต้าโกลบินเป็นองค์ประกอบ ทำให้สร้างได้น้อยลงหรือไม่ได้เลย (สุวดีและคณะ 2557) จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ผู้ป่วยโรคเบต้าธาลัสซีเมียในกลุ่ม Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) คือ กลุ่มที่มีการแสดงออกของเซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (Fetal hemoglobin; Hb F) มากกว่าปกติ จะมีอาการของโรคไม่รุนแรง มีภาวะซีดไม่มาก หรือไม่มีอาการซีดเลย (Bethlenfalvay et al., 1975; Forget 1998; Wilcox et al., 2009; Carrocini et al., 2011; Carrocini et al., 2011) จากข้อมูลนี้ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ Hb F ในการบรรเทาความรุนแรงของโรคในผู้ป่วยโรคเบต้าธาลัสซีเมีย ทำให้มีผู้วิจัยจำนวนมากสนใจที่จะศึกษาหาวิธีในการกระตุ้นการแสดงของ Hb F เพื่อนำมาใช้ในการรักษา และบรรเทาความรุนแรงของโรคเบต้าธาลัสซีเมียในอนาคต

Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) เกิดจากการกลายพันธุ์ของลำดับเบสใน β -globin locus ซึ่งรูปแบบของการกลายพันธุ์นั้นพบได้หลายลักษณะ เช่น การเกิด Point mutation หรือการเกิด Deletion (Forget 1998) การเกิดกลายพันธุ์ในทั้งสองลักษณะ จะส่งผลกระทบต่อแสดงออกของ Hb F ได้ไม่เท่ากัน พบว่า การเกิด Deletion จะส่งผลให้มีการแสดงออกของ Hb F ที่มากกว่าการเกิด Point mutation (Bank 2005) การเกิดการกลายพันธุ์แบบ Deletion ยังพบได้หลายลักษณะ เช่น การเกิด Deletion ขนาด 7.2 kb บริเวณ δ - β globin gene (Corfu deletion) ทำให้มีการแสดงออกของ Hb F เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 80 ประกอบกับมีอาการโลหิตจางเพียงเล็กน้อย (Bank 2005; Chakalova et al., 2005) หรือการเกิด Deletion ขนาด 101 kb บริเวณ γ - β globin gene ซึ่งเป็นลักษณะของการเกิด HPFH ที่พบได้ในคนไทย มีการแสดงออกของ Hb F เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 20 (Panyasai et al., 2004) ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่า เพราะเหตุใดการกลายพันธุ์ของลำดับเบสในบริเวณดังกล่าวจึงสามารถทำให้เกิดการแสดงออกของ Hb F ได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมในการกลายพันธุ์ non-anemic HPFH พบว่ามีการเกิด single-nucleotide polymorphism (SNPs) ในลำดับเบสของยีน BCL11A (Lettre et al., 2008; Uda et al., 2008; Galameau et al., 2010) ซึ่งเป็น transcription factor ที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Hb F จึงทำให้นักวิจัยสนใจ BCL11A มากขึ้น พบว่า BCL11A มี binding site หลายตำแหน่ง ใน β -globin locus (Sankaran et al., 2008; Sankaran et al., 2009; Xu et al., 2013) และจากการศึกษาของ Sankaran et al., 2011 ทำให้ทราบถึงการกลายพันธุ์รูปแบบหนึ่งของ HPFH คือ การขาดหายไปของลำดับเบสขนาด 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene และพบว่า ในบริเวณดังกล่าวยังมีตำแหน่งของ BCL11A binding site อีกด้วย (Sankaran et al., 2011) แต่อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการพิสูจน์ว่า 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene และการทำงานของ BCL11A ในบริเวณดังกล่าวมีความสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ γ -globin gene หรือไม่

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษายบริเวณดังกล่าวว่าจะสามารถสร้างรูปแบบลำดับเบสให้เหมือนกับลักษณะของ HPFH ที่เกิดการขาดหายไปของลำดับเบส 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene และศึกษาถึงความสำคัญของ BCL11A binding site ใน 3.5 kb โดยใช้เทคนิค CRISPR/Cas9 ซึ่งเป็น Genome Editing ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ CRISPR/Cas9 กันอย่างแพร่หลายในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสขนาดเล็กๆ (Cradick et al.,



2013; Xie et al., 2014; Song et al., 2015; Xu et al., 2015; Dever et al., 2016; Niu et al., 2016; Traxler et al., 2016) การเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสขนาดใหญ่ยังมีไม่มากนัก ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำเทคนิค CRISPR/Cas9 มาเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ทั้งนี้เพื่อเป็นการสร้าง model ที่จะนำไปใช้ศึกษาต่อในอนาคตได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาวิธีการใช้ CRISPR/Cas9 มาตัดลำดับเบส ณ ตำแหน่งหนึ่งของ BCL11A binding site และ 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene ในเซลล์ K562

วิธีการวิจัย

1. เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง คือ K562 (Human Erythroleukemic cell line) เลี้ยงด้วย Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media ผสมกับ Fetal Bovine Serum (FBS) 10%, Penicillin-Streptomycin (P/S) 1% และ L-Glutamine 1% เลี้ยงในตู้ incubator 5% CO₂ ที่ 37°C

2. การออกแบบ CRISPR/Cas9

2.1 สังเคราะห์ single strand oligo nucleotide (primer) โดยโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบคือ <http://crispr.mit.edu/> จากนั้นนำสาย primer ที่ได้ไป clone เข้า pX458 backbone (Cas9 from *S. pyogenes* with 2A-EGFP) โดยจะออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณที่เป็น BCL11A binding site และ 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene

2.2 Oligo annealing และ cloning เข้าสู่ backbone vectors ทำการ Linearize pX458 2 ug ด้วย BbsI 30 นาที-1 ชั่วโมง ที่ 37°C

2.3 Run gel electrophoresis linearized pX458 แล้ว purify ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit

2.4 ทำการ anneal oligos แต่ละคู่

- 1 ul oligo 1 (100 μ M)

- 1 ul oligo 2 (100 μ M)

- 1 ul 10X T4 Ligation Buffer (NEB)

- 6.5 ul ddH₂O

- 0.5 ul T4 PNK (NEB)

Anneal ด้วยเครื่อง thermocycler โดยใช้ parameters ดังนี้

- 37°C นาน 30 นาที

- 95°C นาน 5 นาที แล้วค่อยๆ ลดอุณหภูมิเป็น 25°C โดยลดครั้งละ 5°C ต่อ นาที

2.5 Ligate reaction และทำการบ่มที่ 4°C ตลอดคืน

- X ul BbsI linearized pX458 ที่ได้จากขั้นที่ 2.3 (50 ng)

- 1 ul oligo duplex จากขั้นที่ 2.4

- 5 ul 2X T4 ligation Buffer (NEB)

- X ul ddH₂O ให้เป็น 10 ul

- 1 ul T4 Ligase (NEB)

2.6 Transformation

นำ Ligate reaction ที่ได้จากขั้น 2.5 มา transform เข้า competent bacteria (TOP10 or XL-1 blue strain) Spread ลงบน LB agar plate ที่มี ampicillin และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบความถูกต้องของ CRISPR/Cas9 subcloning

3.1 การตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ เลือกโคโลนีที่ขึ้นในหลอดใน 15 ml tube ที่มี 5 ml LB broth + ampicillin บ่มที่ 200 rpm 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

3.2 ปั่นตกตะกอนแบคทีเรียที่ได้ และทำการสกัด plasmid

3.3 นำ plasmid 1 ug มาตัดด้วยเอนไซม์ BbsI เป็นเวลา 30 นาที

3.4 Run agarose gel electrophoresis เพื่อทำการแยกชิ้น DNA หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ CRISPR subclone ที่ถูกต้องจะไม่ถูกตัดด้วย BbsI

3.5 ยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสอีกทีด้วยการส่ง sequencing

4. ทดสอบประสิทธิภาพของ CRISPR/Cas9 ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสสายคู่ (Double Strand Break) ตรงตำแหน่งที่ต้องการ ในเซลล์เพาะเลี้ยง K562

4.1 DNA transfection ทำการ transfect CRISPR/Cas9 plasmid แต่ละคู่เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง K562 ด้วยวิธี Nucleofection โดยใช้ชุด SF Cell Line 4D-Nucleofector® X Kit L

4.2 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการ transfected ไปแล้ว 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ให้ครบ 48 ชั่วโมง

4.3 ทำการ sort กลุ่มเซลล์ที่มี GFP Positive โดยใช้ Flow cytometer จากนั้นเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์

4.4 นำเซลล์ทั้งหมดมาสกัด genomic DNA

5. ตรวจสอบการเกิดการตัดลำดับเบสแบบสายคู่

5.1 ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนสายลำดับเบสในบริเวณ BCL11A binding site และ 3.5 kb ณ ตำแหน่ง γ - δ globin gene จาก genomic DNA ของเซลล์ K562 ที่ไม่ได้ transfected CRISPR/Cas9 (control) และ K562 + CRISPR/Cas9 (Test)

5.2 ทำให้เกิด Hybridization โดยใช้ Thermocycler ใช้ parameters ดังนี้

-37°C นาน 30 นาที

-95°C นาน 5 นาทีแล้วค่อยๆลดอุณหภูมิเป็น 25°C โดยลดครั้งละ 5°C ต่อนาที

	Control (ul)	Test (ul)
K562	20	10
K562 + CRISPR	-	10
Buffer 2 (NEB)	25	2.5
ddH ₂ O	1.5 to 24 ul	1.5 to 24 ul

5.3 ตัดชิ้น product ที่ได้ ด้วย T7 endonuclease 1ul ในแต่ละหลอด บ่ม 15 นาที ซึ่งจะเกิดการตัดสายลำดับเบสที่ตำแหน่ง mismatched base pairs ในขณะที่กลุ่ม Control จะไม่ถูกตัด

5.4 Run agarose gel electrophoresis เพื่อทำการแยกชิ้น DNA

ผลการวิจัย

การออกแบบและตรวจสอบความถูกต้องของ CRISPR/Cas9

จากงานวิจัย Sankaran ในปี 2011 ทำให้ทราบถึง region ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการ silence Fetal hemoglobin ทำการหาลำดับเบสดังกล่าวไปออกแบบ CRISPR ต่อไป โดยทำการออกแบบ sgRNA ของ CRISPR ที่สามารถตัดได้ทั้งลำดับเบสขนาดเล็ก (80 bp) และขนาดใหญ่ (3.5 kb) จากการออกแบบได้คู่ CRISPR มาจำนวน 3 คู่ คือ หนึ่งคู่ของ HBG20#1, HBG20#3 ที่จะตัดลำดับเบสขนาดเล็ก และสองคู่ของ 3.5 A Begin, 3.5 B Begin, 3.5 A End และ 3.5 B End ที่จะตัดลำดับเบสขนาดใหญ่ (รูปที่ 1A, B) ทำการโคลนนิ่ง sgRNA เข้าสู่เวกเตอร์ pX458 (addgene) จากนั้นเลือก sub clone ที่ได้จากการ transformation มาอย่างละ 3 Sub clone คือ HBG20#1 (1)(2)(3), HBG20#3 (1)(2)(3), 3.5 A Begin (1)(2)(3), 3.5 B Begin (1)(2)(3), 3.5 A End (1)(2)(3) และ 3.5 B End (1)(2)(3) ทำการตรวจสอบความถูกต้องของ CRISPR/Cas9 แต่ละ Sub clone ด้วยการใส่เอนไซม์ตัดจำเพาะ BbsI โดย Sub Clone ที่ถูกต้องจะต้องไม่โดนตัดด้วยเอนไซม์ BbsI (รูปที่ 2A) พบว่า ทุกโคลนที่เลือกมา ไม่เกิดการตัดด้วยเอนไซม์ BbsI ยกเว้น 3.5 B End (2) ที่เอนไซม์ BbsI สามารถตัดได้ และวิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA Sequencing โดยวิเคราะห์อย่างละ 2 Sub clone พบว่า แต่ละ Sub Clone มีการแทรกตัวของ sgRNA ตามที่ได้ออกแบบไว้ (รูปที่ 2B) ซึ่งจะนำ CRISPR vector ที่สร้างได้ไปทดสอบความสามารถในการตัดลำดับเบสในตำแหน่งที่ต้องการ

การทดสอบประสิทธิภาพของ CRISPR/Cas9

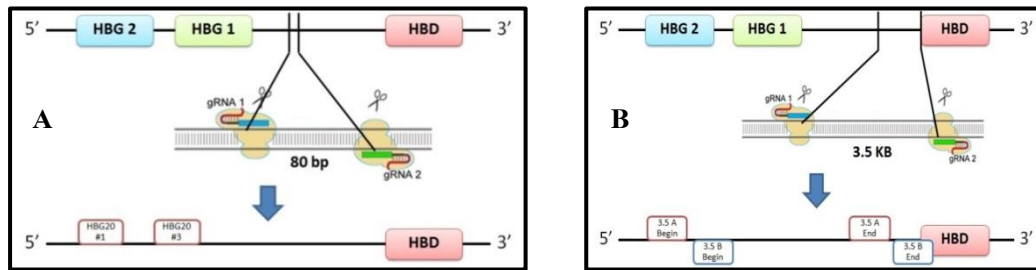
เพื่อศึกษาถึงความสามารถของ CRISPR ที่สร้างได้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์เพาะเลี้ยง K562 เนื่องจาก K562 เป็นเซลล์ประเภท erythroleukemia สามารถมีการแสดงออกของ Hemoglobin และสามารถ differentiate ไปเป็น early-stage ของ erythrocyte ได้ ผู้วิจัยได้เลือก Sub clone ของ CRISPR/Cas9 ที่จะนำมา transfect คือ HBG20#1 (2), HBG20#3 (2), 3.5 A Begin (1), 3.5 A End (1), 3.5 B Begin (1) และ 3.5 B End (1) โดยจับคู่กันระหว่าง HBG20 #1 + HBG20#3, 3.5 A Begin + End และ 3.5 B Begin + End ทำการ transfect CRISPR/Cas9 plasmid เข้าสู่เซลล์ K562 passage number 5 ด้วย SF Cell Line 4D-Nucleofector® X Kit L ใช้ plasmid อย่างละ 2 ug และเลี้ยงต่อจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากหลังการ transfection จะทำให้เซลล์บางส่วนตาย จากนั้นเลี้ยงต่ออีกจนครบ 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาดูได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีเซลล์ K562 ที่มี GFP Positive ประมาณร้อยละ 20-25 (รูปที่ 3 A-C) แล้วนำเซลล์ K562 ทั้งหมด มาแยกกลุ่มเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CRISPR/Cas9 โดยใช้ Flow cytometry ทำการ sort กลุ่มเซลล์ที่เป็น GFP Positive คือ กลุ่ม P2 (รูปที่ 4 A-C) นำกลุ่มเซลล์ K562 ที่ได้จากการ sort มาเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวน โดยเลี้ยงต่ออีก 2 วันและทำการสกัด DNA เพื่อนำไปตรวจสอบการเกิดการตัดลำดับเบส โดยการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจ โดยใช้ primer check HBG 20 และ 3.5 kb ทำการ amplified กลุ่มคอนโทรล (non-transfected) และกลุ่มทดสอบ (transfected) พบว่า ในกลุ่มของคอนโทรลจะสามารถ amplified ดีเอ็นเอได้ขนาด 500 bp กับ 3.5 kb ในขณะที่กลุ่ม transfected ด้วย HBG20 #1#3 มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสจึงสามารถ amplified ดีเอ็นเอได้ขนาด 400 bp และในกลุ่มที่ transfected ด้วย 3.5 A Begin+End ก็มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสเช่นเดียวกันจึงสามารถ amplified ดีเอ็นเอได้ขนาด 612 bp แต่ในกลุ่มที่ transfected ด้วย 3.5 B Begin+End ไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสได้ จึงสามารถ amplified ดีเอ็นเอได้แค่ขนาด 3.5 kb เท่านั้น (รูปที่ 5 A-D) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า designed CRISPR sgRNA สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตัดลำดับเบสในตำแหน่งที่ต้องการได้ทั้งขนาด 80 bp. และ 3.5 kb

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากงานศึกษาที่ผ่านมาการใช้ CRISPR/Cas9 มาช่วยในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน β -globin gene เป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ point mutation (Cradick et al., 2013; Xie et al., 2014; Song et al., 2015; Xu et al., 2015; Traxler et al., 2016), การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบ deletion ขนาดเล็ก (Cradick et al., 2013; Xie et al., 2014; Traxler et al., 2016) แต่การตัดลำดับเบสขนาดใหญ่ยังมีการศึกษาอย่างจำกัด (Zhang et al., 2015; Young et al., 2016) และยังไม่มีการศึกษาใน Globin gene ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการใช้ designed CRISPR sgRNA ในการตัด DNA ขนาดใหญ่เพื่อสร้าง model เลียนแบบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียกลุ่ม HPFH สำหรับใช้ในการศึกษากลไกการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Hb F ทั้งนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมว่าการตัด 3.5 kb นั้น จะกระตุ้น Hb F ใน Peripheral blood CD34+ cells ได้เพียงใด เทียบเท่าในผู้ป่วยกลุ่ม HPFH หรือไม่ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าทำให้เกิด mutation ที่ บริเวณ HBG promoter โดยการตัดลำดับเบสที่อยู่ก่อน promoter ใน PBMC CD34+ cells สามารถกระตุ้นให้ Hb F แสดงออกได้มากขึ้น 10 เท่า (Traxler et al., 2016) นอกจากนี้ ผู้วิจัยพบว่า จำนวนเซลล์ที่สามารถเกิดการตัดลำดับเบสได้นั้น ยังมีจำนวนไม่มากซึ่งยังต้องทำการศึกษาต่อเพิ่มเติมในเรื่องของการเพิ่มประสิทธิภาพของ CRISPR/Cas9 โดยอาจจะเปลี่ยนเป็น transfect RNA หรือโปรตีนแทนในอนาคต (Dever et al., 2016; Gundry et al., 2016; Traxler et al., 2016) และผู้วิจัยต้องคำนึงถึงเรื่องการลด off-target (Doench et al., 2016; Kleinstiver et al., 2016) อีกด้วย

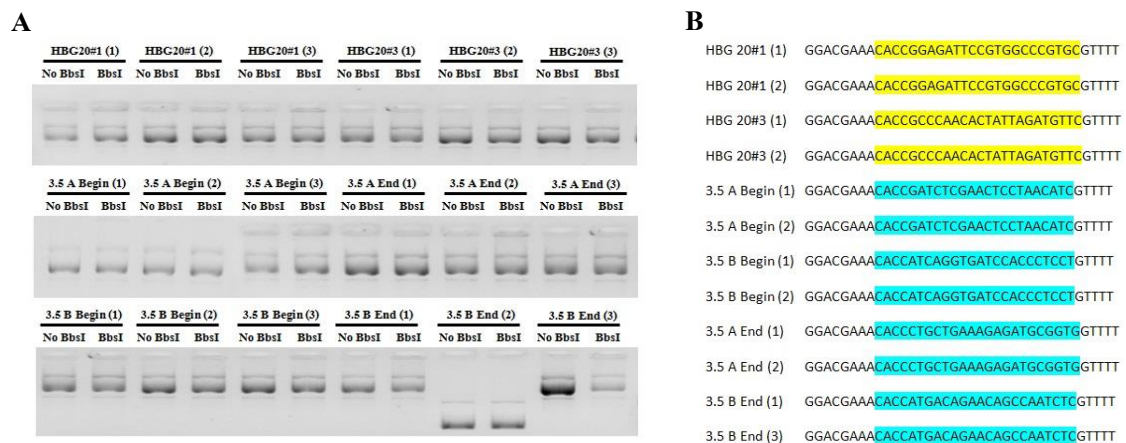
จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบถึงความสำคัญของ BCL11A ในการเป็น Transcription Factor ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการแสดงออกของ Hb F (Sankaran et al., 2010; Sankaran et al., 2010; Sankaran et al., 2013) ได้มีหลายงานวิจัยพยายามกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Hb F โดยการหาวิธีลดการทำงานของ BCL11A เช่น การ Knockdown โดยใช้ shRNA พบว่า ทำให้การแสดงออกของ Hb F เพิ่มขึ้น แต่มีข้อจำกัด คือ ปริมาณ shRNA ที่ transfect เข้าไป จะมีผลต่อระดับการแสดงออกของ Hb F (Sankaran et al., 2008; Xu et al., 2013) รวมไปถึงการ Knockout BCL11A พบว่า สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ Hb F ได้ (Sankaran et al., 2009; Xu et al., 2011) แต่อย่างไรก็ดี BCL11A ยังมีบทบาทในเรื่องของ lymphoid development (Liu et al., 2003; Yu et al., 2012) และ neuronal morphogenesis (John et al., 2012) ดังนั้น การลดปริมาณของ BCL11a โดยตรงจึงไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ทางคลินิก แนวทางในการศึกษาที่มีผู้สนใจมากในปัจจุบัน คือการหาตำแหน่งอื่นที่รบกวนการทำงานของ BCL11a อย่างจำเพาะในเซลล์ที่ต้องการ เช่น การทำ serial deletion ที่บริเวณ BCL11A erythroid specific enhancer พบว่า ส่งผลให้มีการแสดงออกของ Hb F เพิ่มขึ้นได้ (Canver et al., 2015) ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกที่จะสนใจในบริเวณที่มี potential BCL11A binding site ทำให้ไม่ส่งผลกระทบต่อระบบอื่นๆที่ต้องอาศัยการทำงานของ BCL11a ร่วมด้วย

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการตัด 80bp ซึ่งเป็นบริเวณที่มี potential BCL11A binding site ที่อยู่ใน 3.5 kb ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาว่า ช่วง DNA ดังกล่าวมีความสำคัญต่อการควบคุมการแสดงออกของ Hb F อย่างไร โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการกระตุ้นการแสดงออกของ Hb F ที่มีประสิทธิภาพในอนาคต



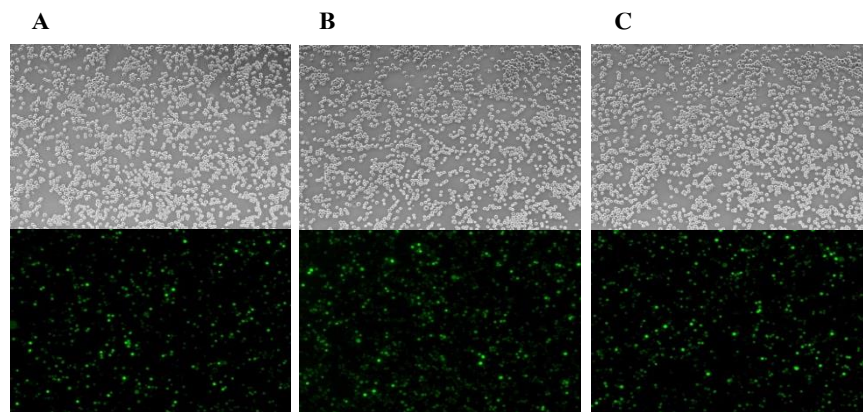
รูปที่ 1 ไคอะแกรมแสดงการออกแบบ single strand oligo nucleotide

- (A) คู่ CRISPR ที่ตัดลำดับเบสออก 80 bp: HBG20#1 และ HBG20#3
(B) คู่ CRISPR ที่ตัดลำดับเบสออก 3.5 kb: 3.5 A Begin + 3.5 A End และ 3.5 B Begin + 3.5 B End



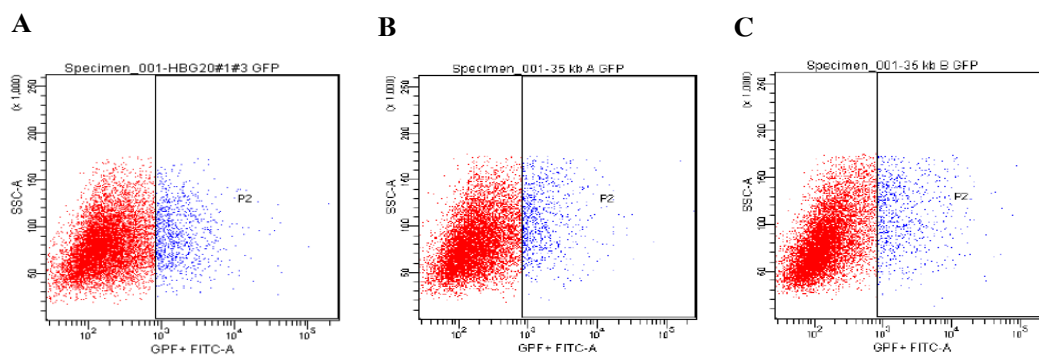
รูปที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบความถูกต้องของแต่ละ Sub clone CRISPR/Cas9

- (A) โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ BbsI พบว่า ทุกโคลนที่เลือกมา ไม่เกิดการตัดด้วยเอนไซม์ BbsI ยกเว้น 3.5 B End (2) ที่เอนไซม์ BbsI สามารถตัดได้
(B) วิเคราะห์ลำดับ DNA ด้วยเทคนิค DNA Sequencing ทำอย่างละ 2 Sub clone พบว่า ทุกโคลนที่เลือกมา มีการแทรกตัวของ designed sgRNA

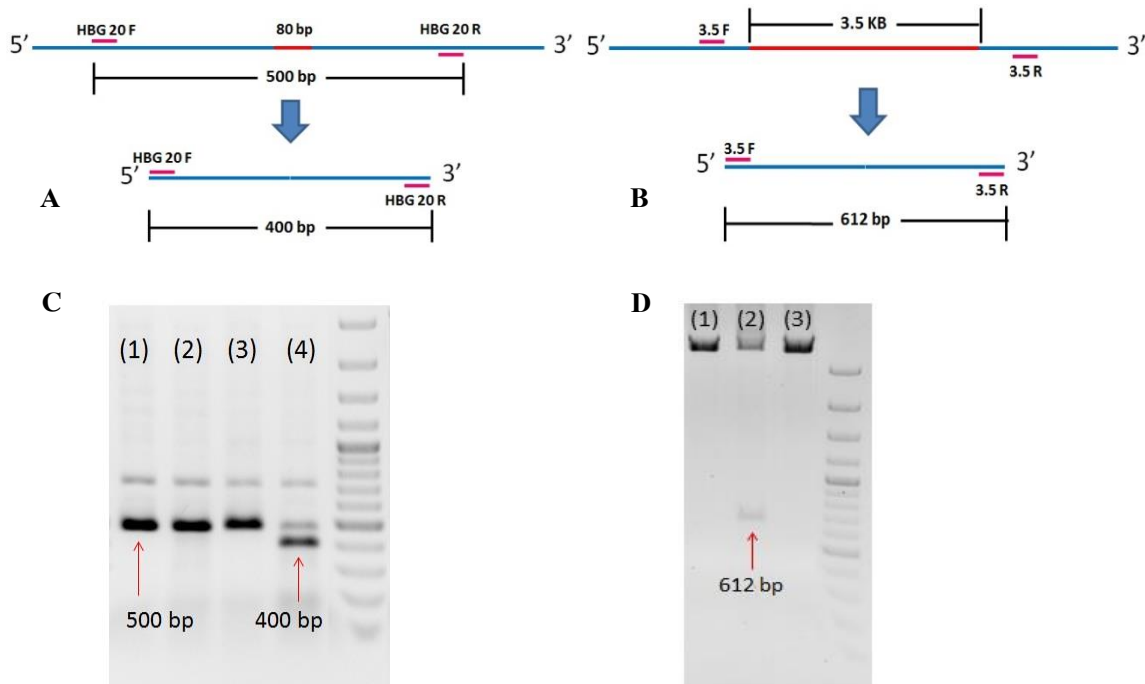


รูปที่ 3 แสดงผลหลังจากการ transfected ได้ 24 ชั่วโมงในเซลล์ K562 โดยนำไปส่องได้กล้องเพื่อดูเซลล์ GFP Positive

- (A) ภาพ Bright field และภาพ Fluorescence ของเซลล์ K562 หลังการ transfected HBG20#1 + HBG20#3
- (B) ภาพ Bright field และภาพ Fluorescence ของเซลล์ K562 หลังการ transfected 3.5 A Begin + End
- (C) ภาพ Bright field และภาพ Fluorescence ของเซลล์ K562 หลังการ transfected 3.5 B Begin + End



รูปที่ 4 แสดงผลการ sort เซลล์ กลุ่มเซลล์ K562 GFP positive คือ กลุ่ม P2 ที่ transfected ด้วย CRISPR/Cas9, HBG20#1 + HBG20#3 (A), 3.5 kb A Begin + End (B), 3.5 kb B Begin + End (C)



รูปที่ 5 แสดงผลการ amplified ด้วย primer check HBG20 และ 3.5 kb โดยแกรมแสดงขนาดชิ้นส่วนลำดับเบสที่ได้จากการ amplified ด้วย primer check HBG20 (A) และ 3.5 kb (B) (C) ขนาดของลำดับเบสที่ได้จากการ amplified ด้วย primer check HBG20 (Ladder 100 bp) แถว 1 คือ กลุ่มคอนโทรล ได้แบนขนาด 500 bp แถว 2 คือ กลุ่มคอนโทรล + T7 ได้แบนขนาด 500 bp แถว 3 คือ HBG20#1 + HBG20#3 ได้แบนขนาด 500 bp แถว 4 คือ HBG20#1 + HBG20#3 + T7 สามารถเกิดการตัดลำดับเบส ได้แบนขนาด 400 bp (D) ขนาดของลำดับเบสที่ได้จากการ amplified ด้วย primer check 3.5 kb (Ladder 1 kb) แถว 1 คือ กลุ่มคอนโทรล ได้แบนขนาด 3.5 kb แถว 2 คือ 3.5 A Begin+End สามารถเกิดการตัดลำดับเบส ได้แบนขนาด 612 bp แถว 3 คือ 3.5 B Begin+End ไม่สามารถเกิดการตัดลำดับเบส ได้แบนขนาด 3.5 kb

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.นพ.นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ พี่ทิพย์, ดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกๆด้านและคอยให้คำปรึกษาในทุกๆเรื่อง และสุดท้ายขอขอบคุณสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการเซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม

เอกสารอ้างอิง

- Bank, A. (2005). "Understanding globin regulation in beta-thalassemia: It's as simple as alpha, beta, gamma, delta." *J Clin Invest* 115(6): 1470-3.
- Bethlenfalvay, N. C., A. G. Motulsky, B. Ringelhann, H. Lehmann, J. R. Humbert and F. I. Konotey-Ahulu (1975). "Hereditary persistence of fetal hemoglobin, beta thalassemia, and the hemoglobin delta-beta locus: Further family data and genetic interpretations." *Am J Hum Genet* 27(2): 140-54.
- Canver, M. C., E. C. Smith, F. Sher, L. Pinello, N. E. Sanjana, O. Shalem, et al. (2015). "Bcl11a enhancer dissection by cas9-mediated in situ saturating mutagenesis." *Nature* 527(7577): 192-7.
- Carrocini, G. C., L. S. Ondei, P. J. Zamaro and C. R. Bonini-Domingos (2011). "Evaluation of hpfh and deltabeta-thalassemia mutations in a brazilian group with high hb f levels." *Genet Mol Res* 10(4): 3213-9.
- Carrocini, G. C., P. J. Zamaro and C. R. Bonini-Domingos (2011). "What influences hb fetal production in adulthood?" *Rev Bras Hematol Hemoter* 33(3): 231-6.
- Chakalova, L., D. Carter, E. Debrand, B. Goyenechea, A. Horton, J. Miles, et al. (2005). "Developmental regulation of the beta-globin gene locus." *Prog Mol Subcell Biol* 38: 183-206.
- Cradick, T. J., E. J. Fine, C. J. Antico and G. Bao (2013). "Crispr/cas9 systems targeting beta-globin and ccr5 genes have substantial off-target activity." *Nucleic Acids Res* 41(20): 9584-92.
- Dever, D. P., R. O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C. E. Nicolas, et al. (2016). "Crispr/cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells." *Nature* 539(7629): 384-89.
- Doench, J. G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E. W. Vaimberg, K. F. Donovan, et al. (2016). "Optimized sgrna design to maximize activity and minimize off-target effects of crispr-cas9." *Nat Biotechnol* 34(2): 184-91.
- Forget, B. G. (1998). "Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin." *Annals of the New York Academy of Sciences* 850(1): 38-44.
- Galarneau, G., C. D. Palmer, V. G. Sankaran, S. H. Orkin, J. N. Hirschhorn and G. Lettre (2010). "Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation." *Nat Genet* 42(12): 1049-51.
- Gundry, M. C., L. Brunetti, A. Lin, A. E. Mayle, A. Kitano, D. Wagner, et al. (2016). "Highly efficient genome editing of murine and human hematopoietic progenitor cells by crispr/cas9." *Cell Rep* 17(5): 1453-61.
- John, A., H. Brylka, C. Wiegrefe, R. Simon, P. Liu, R. Juttner, et al. (2012). "Bcl11a is required for neuronal morphogenesis and sensory circuit formation in dorsal spinal cord development." *Development* 139(10): 1831-41.
- Kleinstiver, B. P., V. Pattanayak, M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, Z. Zheng, et al. (2016). "High-fidelity crispr-cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects." *Nature* 529(7587): 490-5.
- Lettre, G., V. G. Sankaran, M. A. Bezerra, A. S. Araujo, M. Uda, S. Sanna, et al. (2008). "DNA polymorphisms at the bcl11a, hbs11-myb, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33): 11869-74.

- Liu, P., J. R. Keller, M. Ortiz, L. Tessarollo, R. A. Rachel, T. Nakamura, et al. (2003). "Bcl11a is essential for normal lymphoid development." *Nat Immunol* 4(6): 525-32.
- Niu, X., W. He, B. Song, Z. Ou, D. Fan, Y. Chen, et al. (2016). "Combining single strand oligodeoxynucleotides and crispr/cas9 to correct gene mutations in beta-thalassemia-induced pluripotent stem cells." *J Biol Chem* 291(32): 16576-85.
- Panyasai, S., S. Fucharoen, S. Surapot, G. Fucharoen and K. Sanchaisuriya (2004). "Molecular basis and hematologic characterization of deltabeta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in thailand." *Haematologica* 89(7): 777-81.
- Sankaran, V. G., T. F. Menne, J. Xu, T. E. Akie, G. Lettre, B. Van Handel, et al. (2008). "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor bcl11a." *Science* 322(5909): 1839-42.
- Sankaran, V. G. and D. G. Nathan (2010). "Reversing the hemoglobin switch." *New England Journal of Medicine* 363(23): 2258-60.
- Sankaran, V. G. and S. H. Orkin (2013). "The switch from fetal to adult hemoglobin." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(1): a011643.
- Sankaran, V. G., J. Xu, R. Byron, H. A. Greisman, C. Fisher, D. J. Weatherall, et al. (2011). "A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing." *New England Journal of Medicine* 365(9): 807-14.
- Sankaran, V. G., J. Xu and S. H. Orkin (2010). "Transcriptional silencing of fetal hemoglobin by bcl11a." *Ann N Y Acad Sci* 1202: 64-8.
- Sankaran, V. G., J. Xu, T. Ragoczy, G. C. Ippolito, C. R. Walkley, S. D. Maika, et al. (2009). "Developmental and species-divergent globin switching are driven by bcl11a." *Nature* 460(7259): 1093-97.
- Song, B., Y. Fan, W. He, D. Zhu, X. Niu, D. Wang, et al. (2015). "Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassemia induced pluripotent stem cells by crispr/cas9 system." *Stem Cells Dev* 24(9): 1053-65.
- Traxler, E. A., Y. Yao, Y. D. Wang, K. J. Woodard, R. Kurita, Y. Nakamura, et al. (2016). "A genome-editing strategy to treat beta-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition." *Nat Med* 22(9): 987-90.
- Uda, M., R. Galanello, S. Sanna, G. Lettre, V. G. Sankaran, W. Chen, et al. (2008). "Genome-wide association study shows bcl11a associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(5): 1620-25.
- Wilcox, I., K. Boettger, L. Greene, A. Malek, L. Davis, M. H. Steinberg, et al. (2009). "Hemoglobin kenya composed of α - and ($\alpha\gamma\beta$)-fusion-globin chains, associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin." *American Journal of Hematology* 84(1): 55-58.
- Xie, F., L. Ye, J. C. Chang, A. I. Beyer, J. Wang, M. O. Muench, et al. (2014). "Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific ipscs using crispr/cas9 and piggybac." *Genome Res* 24(9): 1526-33.

- Xu, J., D. E. Bauer, M. A. Kerenyi, T. D. Vo, S. Hou, Y. J. Hsu, et al. (2013). "Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by bcl11a." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(16): 6518-23.
- Xu, J., C. Peng, V. G. Sankaran, Z. Shao, E. B. Esrick, B. G. Chong, et al. (2011). "Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing." *Science* 334(6058): 993-6.
- Xu, P., Y. Tong, X. Z. Liu, T. T. Wang, L. Cheng, B. Y. Wang, et al. (2015). "Both talens and crispr/cas9 directly target the hbb ivs2-654 (c > t) mutation in beta-thalassemia-derived ipscs." *Sci Rep* 5: 12065.
- Young, C. S., M. R. Hicks, N. V. Ermolova, H. Nakano, M. Jan, S. Younesi, et al. (2016). "A single crispr-cas9 deletion strategy that targets the majority of dmd patients restores dystrophin function in hipsc-derived muscle cells." *Cell Stem Cell* 18(4): 533-40.
- Yu, Y., J. Wang, W. Khaled, S. Burke, P. Li, X. Chen, et al. (2012). "Bcl11a is essential for lymphoid development and negatively regulates p53." *J Exp Med* 209(13): 2467-83.
- Zhang, L., R. Jia, N. J. Palange, A. C. Satheka, J. Togo, Y. An, et al. (2015). "Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using crispr/cas9." *PLoS One* 10(3): e0120396.