DOI: 10.22122/jims.v39i612.13856 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۱۲/هفته‌ی چهارم فروردین ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۶ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۱/۲۸

ویرایش ژنی هدفمند در سلول‌های T پرایمری انسان با استفاده از ریبونوکلئوپروتئین‌های CRISPR/Cas9

الهه کمالی[۱]، زهره حجتی[۲]، فاطمه رهبری‌زاده[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ناک اوت ژنی سلول‌های T پرایمری با واسطه‌ی Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) محدودیت‌های زیادی برای کاربردهای بالینی دارد. انتقال مستقیم پروتئین نوترکیب Cas9 و Guide RNA (gRNA) سنتتیک به عنوان یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی از پیش مونتاژ شده (Ribonucleoprotein یا RNP) به یک روش قدرتمند برای ویرایش ژنی بسیار کارآمد در سلول‌های T پرایمری تبدیل شده است. در این مطالعه، از سیستم انتقال مبتنی بر Cas9 RNP برای ناک‌اوت هدفمند ژن‌های T Cell receptor alpha constant (TRAC) و β2 microglobulin (B2M) در سلول‌های T پرایمری انسانی استفاده گردید.

روش‌ها: بدین منظور gRNAهای اختصاصی برای هدف قرار دادن اگزون‌های ابتدایی ژن‌های TRAC و B2M طراحی شدند. پروتئین Cas9 و gRNAهای سنتتیک مربوطه به طور جداگانه ترکیب شدند و به سلول‌های T پرایمری انسانی جدا شده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC) الکتروپوریت شدند. کارایی ویرایش ژنی با روش تجزیه و تحلیل Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) و فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: سه روز پس از الکتروپوریشن سلول‌های T پرایمری با استفاده از کمپلکس‌های RNP هدف‌گیری کننده‌ی TRAC و B2M، آنالیز TIDE کارایی ناک‌اوت ۶۰-۱۳ درصد را برای gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی TRAC و ۵۳-۲۱ درصد را برای gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی B2M مشخص کرد. آنالیز فلوسایتومتری نیز به ترتیب میزان ۷۶ و ۲۷ درصد سرکوب کامل بیان ژن را برای کارآمدترین gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی TRAC (TRAC-gRNA3) و B2M (B2M-gRNA2) تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه، نشان می‌دهد که سیستم Cas9 RNP می‌تواند به طور کارآمدی به سلول‌های T پرایمری منتقل و منجر به ناک‌اوت هدفمند ژن گردد. شیوه‌نامه‌ی شرح داده شده در این مطالعه، راهکار ساده و بسیار کارآمدی برای به حداکثر رساندن کارایی ویرایش در سلول‌های T پرایمری فراهم می‌سازد و روند ویرایش ژن برای ایمنوتراپی‌های نسل بعدی را تسهیل می‌کند.

واژگان کلیدی: ناک‌اوت ژن؛ ایمنوتراپی؛ گیرنده‌ی سلول T

ارجاع: کمالی الهه، حجتی زهره، رهبری‌زاده فاطمه. **ویرایش ژنی هدفمند در سلول‌های T پرایمری انسان با استفاده از ریبونوکلئوپروتئین‌های CRISPR/Cas9**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۱۲): ۷۵-۶۶

مقدمه

سیستم Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated 9 (Cas9)، امکان تولید سریع و کارآمد ناک‌اوت ژنی در انواع مختلفی از سلول‌ها را فراهم کرده است. دستکاری عملکرد ژن یا ویرایش ژنی در سلول‌های T پرایمری، به عنوان تنظیم کننده‌ها و افکتورهای اصلی پاسخ‌های ایمنی تطبیقی، از منظر درمانی و به ویژه با ظهور ایمونوتراپی‌های مبتنی بر سلول‌های T پرایمری همچون سلول‌های Chimeric antigen receptor T (CAR T) بسیار حایز اهمیت

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: زهره حجتی؛ استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فن‌آوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

است. ویرایش ژن با واسطه‌ی سیستم CRISPR/Cas9، نیازمند دو جزء اصلی است: DNA اندونوکلئاز Cas9 و یک RNA راهنما (Guide RNA) که از طریق ایجاد جفت‌باز، Cas9 را به یک توالی DNA خاص هدایت می‌کند (۱) که پس از اتصال به توالی DNA، با ایجاد شکاف‌های دو رشته‌ای (Double strand breaks یا DSB) در جایگاه هدف همراه است. اگر این شکاف‌ها در ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن ایجاد شوند، از طریق فعال شدن مسیر غالب ترمیم DNA یعنی اتصال انتهای غیر همولوگ Non-homologous end joining (NHEJ) موجب ایجاد ناکاوت ژن می‌گردد. این مسیر ترمیمی، اغلب با ایجاد حذف‌شدگی‌ها و درج‌شدگی‌های کوچک (Insertion–deletion یا Indels) در محل برش همراه است و اگر این تغییرات چارچوب خوانش ژن را تغییر دهند، موجب ایجاد یک کدون ختم زودرس و در نهایت، ناکاوت عملکردی ژن می‌گردد.

با وجود این که ویرایش ژن با واسطه‌ی CRISPR/Cas9 برای رده‌های سلولی T امکان پذیر بود، در ابتدای ظهور این تکنولوژی، روش سریع و کارآمدی برای ایجاد ناکاوت ژنی در سلول‌های پرایمری T انسانی وجود نداشت و بدین ترتیب، کاربرد گسترده‌ی CRIPSR/Cas9 به خاطر محدودیت‌های ترنسفکشن و همچنین، نیاز به تحریک گیرنده‌های سلول T با موانعی مواجه بود. در تلاش‌های اولیه جهت استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژن در سلول‌های T پرایمری انسانی از انتقال ویروسی Cas9 و gRNA (۳-۲) یا الکتروپوریشن سازه‌های بیانی Cas9 و gRNA (۵-۴) استفاده می‌شد. با توجه به این که الکتروپوریشن پلاسمید برای سلول‌های T بسیار سمی است، این رویکردها با کارایی بسیار پایین ویرایشی همراه بود. در مقابل، در رویکردهای جدیدتر، کمپلس‌های پروتئین نوترکیب Cas9 همراه با gRNAهای رونویسی شده در آزمایشگاه یا gRNAهای سنتتیک، موسوم به ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas9 (Cas9 Ribonucleoproteins یا RNP)، به کمک الکتروپوریشن به سلول‌های T پرایمری انسانی فعال شده انتقال داده می‌شوند که با کارایی ۹۰-۵۰ درصد ویرایش ژنی همراه بوده است (۹-۶).

در حال حاضر، در بیشتر رویکردهای ایمنوتراپی سلولی، از سلول های T اتولوگ استفاده می‌شود که از خود بیمار گرفته می‌شود و ممکن است به دلیل مشکلات مرتبط با کیفیت و کمیت سلول‌های T و زمان و هزینه‌ی تولید محصولات سلول T اتولوگ با موانعی همراه باشد. در ایمنوتراپی آلوژنیک، سلول‌های T در راستای حذف عواملی که موجب شناسایی آن‌ها توسط سیستم ایمنی فرد گیرنده می‌گردد، تغییر داده می‌شوند. با این حال، T Cell Receptor (TCR)های اندوژن بر روی سلول‌های T آلوژنیک ممکن است آلوآنتی‌ژن‌های فرد گیرنده‌ی سلول را تشخیص دهند و منجر به بیماری پیوند در مقابل میزبان (Graft versus host disease یا GVHD) شوند. به علاوه، بیان مولکول‌های Human leukocyte antigen (HLA) در سطح سلول‌های T آلوژنیک می‌تواند باعث رد شدن سریع آن‌ها توسط سیستم ایمنی میزبان یا واکنش Host versus graft disease (HVGD) شود. جدیدترین پیشرفت‌ها در تکنولوژی ایمنوتراپی شامل دستکاری انتخابی پروتئین‌های سطح سلولی نظیر گیرنده‌های TCR و پروتئین‌های HLA به منظور ایجاد سلول‌های T فراگیر است که می‌تواند برای درمان تعداد بسیار قابل توجهی از بیماران به کار رود.

گیرنده‌های TCR αβ به طور گسترده‌ای در سطح سلول‌های T بیان می‌شوند و در شناسایی آنتی‌ژن‌های عرضه شده به آن‌ها توسط سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن (Antigen presenting cells) دخالت دارند. کمپلکس TCR از دو زنجیره‌ی آلفا و بتا تشکیل می‌شود. زنجیره‌ی TCRα توسط یک ژن منفرد T Cell receptor alpha constant (TRAC) و زنجیره‌ی TCRβ توسط دو ژن T Cell Receptor Beta Constant (TRBC) کد می‌شوند. این دو زنجیره، برای حفظ بیان و عملکرد TCR در سطح سلول‌های T، یک دایمر تشکیل می‌دهند. از آن جایی که گیرنده‌های TCR αβ به منظور بیان یک مولکول سطح سلولی عملکردی نیاز به تشکیل هترودایمر دارند، ناکاوت یکی از دو ژن TRAC یا TRBC برای حذف بیان کمپلکس TCR αβ کافی است. در تأیید این فرضیه، مشخص شده است که وقوع یک جهش در ژن TRAC منجر به فقدان بیان TCR αβ می‌گردد (۱۰). ژن بتا-۲ میکروگلوبولین (B2M) زنجیره‌ی جانبی مولکول‌های HLA گروه I را کد می‌کند و برای بیان سطحی هترودایمرهای HLA-I ضروری است (۱۱). حذف B2M، یک راهکار شناخته شده برای سرکوب بیان سطحی HLA کلاس I است و می‌تواند در ایمنوتراپی انتخابی برای ایجاد سلول‌های ایمنی فراگیر یا هایپوایمینوژنیک (Hypoimmunogenic)، که ایمیونوژنیسیتی کمتری نسبت به سلول‌های طبیعی دارند، مورد استفاده قرار گیرد.

در این مطالعه، به منظور سرکوب بیان ژن‌های TRAC و β2 microglobulin (B2M)، کارآمدترین روش ناکاوت ژنی بر پایه‌ی سیستم CRISPR/Cas9 که مبتنی بر الکتروپوریشن کمپلکس‌های ریبونوکئوپروتئینی حاوی gRNA سنتتیک و پروتئین Cas9 است، به کار گرفته شد. با استفاده از این روش، نسبت بالایی از ناکاوت ژن تنها با یک ترنسفکشن منفرد در جایگاه‌های ژنی هدف به دست آمد که با کاهش بیان پروتئین‌های هدف نیز تأیید شد.

روش‌ها

طراحی gRNA به طور معمول، gRNAها باید ۴۰ درصد ابتدایی ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن را هدف بگیرند تا شانس ناکاوت یا از دست رفتن عملکرد ژن افزایش یابد. برای طراحی gRNAها، توالی اگزون ابتدایی ژن‌های TRAC و B2M از سایت Ensembl انتخاب شد. سپس، با استفاده از ابزار طراحی آنلاین CRISPOR (http://crispor.tefor.net) (۱۲)

طراحی gRNAها صورت گرفت. طراحی gRNA توسط این ابزار و بیشتر ابزارهای طراحی، به طور معمول شامل سه مرحله است: در مرحله‌ی اول، توالی ناحیه‌ی ژنی مورد نظر (در مطالعه‌ی حاضر، توالی اگزون ابتدایی ژن‌های مورد هدف) در باکس مربوط وارد می‌شود. در مرحله‌ی دوم، ژنوم موجود مورد نظر انتخاب می‌گردد (در این مطالعه، ژنوم انسان انتخاب شد) و در مرحله‌ی سوم، نوع موتیف PAM (در این مطالعه NGG) انتخاب می‌شود. پس از وارد کردن و سابمیت اطلاعات، این ابزار لیستی از gRNAها ارایه می‌نماید که از این بین، gRNAها بر مبنای دارا بودن بالاترین امتیاز هدف‌گیری (On-target score) (۱۳) و بالاترین میزان اختصاصیت (Off-target score) یا به عبارتی کم بودن تعداد Off-target (۱۴) انتخاب می‌شوند. به طور ترجیحی، gRNAهایی انتخاب شدند که با وجود داشتن امتیاز On-target بالا یا کارایی بالا از نظر هدف‌گیری و برش در توالی هدف، امتیاز Off-target یا اختصاصیت بالایی نیز داشته باشند. بدین ترتیب، احتمال ایجاد اثرات خارج از هدف تا حد امکان کاهش خواهد یافت. در نهایت، از بین gRNAهای پیشنهاد شده، سه gRNA به منظور هدف‌گیری اگزون ابتدایی ژن TRAC و سه gRNA به منظور هدف‌گیری اگزون ابتدایی ژن B2M انتخاب و فرم سنتیک هر gRNA از شرکت Sigma (Sigma-Aldrich, USA) سفارش داده شد (جدول ۱).

جدول ۱. gRNAهای انتخاب شده جهت هدف‌گیری ژن‌های T Cell receptor alpha constant (TRAC) و β2 microglobulin (B2M) و امتیازهای On-target و Off-target پیش‌بینی شده برای هر gRNA توسط ابزار CRISPOR

نام	توالی	امتیاز On-target	امتیاز Off-target
TRAC-gRNA1	TCTCTCAGCTG GTACACGGC	۵۲	۸۵
TRAC-gRNA2	TAGGCAGACA GACTTGTCAC	۶۰	۷۱
TRAC-gRNA3	AGAGTCTCTC AGCTGGTACA	۶۷	۵۹
B2M-gRNA1	CGCGAGCACA GCTAAGGCCA	۶۲	۷۹
B2M-gRNA2	GAGTAGCGCG AGCACAGCTA	۵۶	۹۳
B2M-gRNA3	ACTCTCTCTTT CTGGCCTGG	۶۹	۵۲

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cell یا PBMC): سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از محلول Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, USA) و گرادیان شیب غلظت جدا شدند (۱۵). بدین ترتیب که ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی همراه با ضد انعقاد در لوله‌های هپارینه‌ی استریل جمع‌آوری و سپس، به نسبت برابر با بافر فسفات سالین (Phosphate-buffered saline یا PBS) رقیق و به آرامی به صورت لایه‌ای بر روی فایکول ریخته شد. سپس، ترکیب خون محیطی و PBS به مدت ۳۰-۲۵ دقیقه با شتاب ۲۵۰۰ دور/دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که به صورت لایه‌ی کدر و مجزایی بین پلاسما و فایکول قرار می‌گیرند، به آرامی جدا شدند. سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده، دو مرحله با PBS شستشو داده شد و رسوب سلولی در محیط کامل Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Thermo Fisher, USA) به صورت سوسپانسیون در آمد.

جداسازی سلول‌های T CD3+ با استفاده از کیت جداسازی Pan T cell: سلول‌های T CD3+ انسانی با استفاده از کیت جداسازی Pan T Cell (Miltenyi Biotec, Germany) مورد انتخاب مغناطیسی قرار گرفتند. ابتدا مقادیر مورد نیاز از سلول‌های PBMC شمارش و به مدت ۱۰ دقیقه در شتاب ۳۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سپس، پلت سلولی در ۴۰ ماکرولیتر بافر Magnetic-ativated cell sorting (MACS) (Miltenyi Biotec, Germany) حل شد. ۱۰ ماکرولیتر از بافر Pan T cell biotin-antibody cocktail موجود در کیت به میزان 10^7 سلول اضافه و به خوبی ترکیب و سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. بار دیگر، ۳۰ ماکرولیتر از بافر MACS و سپس، ۲۰ ماکرولیتر از بافر Pan T cell microBead cocktail اضافه و بعد از ترکیب شدن، سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. در ادامه، از دستگاه AutoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec, Germany) و برنامه‌ی Depletes برای جداسازی سلول‌های T CD3+ استفاده شد. با استفاده از این کیت، تمامی سلول‌ها به جز سلول‌های T به صورت مگنتیک نشان‌دار شدند و جمعیت سلولی هدف (سلول‌های T) بدون لیبل باقی ماندند و تحت عنوان جمعیت منفی توسط دستگاه جداسازی شدند.

فعال‌سازی و تحریک سلول‌های T جدا شده با استفاده از دینابیدهای فعال کننده‌ی CD3/CD28 و IL-2: دینابیدهای CD3/CD28 (Thermo Fisher, USA) امکان فعال‌سازی سلول‌های T انسانی را بدون نیاز به سلول‌های عرضه کننده‌ی آنتی‌ژن Antigen-presenting cells (APC) فراهم می‌آورند (۱۶). دینابیدها به نسبت ۱:۱ به سلول‌های T اضافه شدند. بدین منظور، بر طبق شیوه‌نامه‌ی این محصول، حدود ۲۵ ماکرولیتر از این دینابیدها برای فعال‌سازی یک میلیون سلول T کافی خواهد بود. ابتدا، مقادیر مورد نیاز از دینابیدها با استفاده از PBS شسته و در حجم معادل از محیط کشت سلول‌های T حل شد. سپس، سلول‌های T جدا شده در مرحله‌ی قبلی به منظور ایجاد پلت

سلولی در شتاب g ۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و داینابیدها به نسبت ۱:۱ به سلول‌های T اضافه شدند. به منظور تحریک تکثیر سلول‌های T، اینترلوکین ۲ (IL-2) نوترکیب (Miltenyi Biotec, Germany) به میزان ۳۰ واحد/میلی‌لیتر به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. سلول‌های T در محیط کشت RPMI 1640 (Thermo Fisher, USA) غنی شده با گلوتامکس (Thermo Fisher, USA)، سدیم پیروات (Thermo Fisher, USA) و ۱۰ درصد Fetal bovine serum (Thermo Fisher, USA) (FBS) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن در حضور داینابیدهای مغناطیسی ضد CD3/CD28 (Thermo Fisher, USA) و IL-2 نوترکیب انسانی (Miltenyi Biotec, Germany) به مدت ۴۸–۷۲ ساعت تحریک شدند و تکثیر یافتند.

تشکیل کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی CRISPR/Cas9. کمپلکس های ریبونوکلئوپروتئینی، بلافاصله قبل از هر آزمایش و از طریق ترکیب دو بخش سنتتیک gRNA یعنی CRISPR RNA (crRNA) و Trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) و پروتئین Cas9 ایجاد شدند. توالی‌های سنتتیک crRNA (Sigma-Aldrich, USA) و tracrRNA (Sigma-Aldrich, USA) لیوفیلیزه شده در بافر حاوی Tris با pH معادل ۷/۴ حل شدند تا استوک‌های ۱۰۰ میکرومولاری ایجاد شود. در تمام مراحل، مقادیر یکسان مولی از crRNA و tracrRNA ترکیب شدند تا هیبریدهای crRNA:tracrRNA شکل بگیرند. سپس، دوبلکس‌های crRNA و tracrRNA و پروتئین Cas9 (Sigma-Aldrich, USA) به آرامی ترکیب و حداقل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند تا کمپلکس‌های CRISPR/Cas9 RNP تشکیل شود. کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئینی بلافاصله پس از تشکیل، با استفاده از نوکلئوفکشن به سلول‌های هدف منتقل شدند.

ترنسفکشن سلول‌های T. سه روز پس از تحریک اولیه‌ی سلول‌های T، دایناپیدهای ضد CD3/CD28 به روش مغناطیسی حذف و سلول‌های T در غیاب بیدها به مدت ۶ ساعت کشت داده شدند و پس از آن، با استفاده از کیت نوکلئوفکشن P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit S، V4XP-3032 (Lonza, Basel, Switzerland) الکتروپوریت شدند. بدین منظور، حدود 10^6 سلول T شمارش و با استفاده از بافر PBS شسته و به مدت ۵ دقیقه در g ۸۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس، پلت سلولی همراه با کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی مورد نظر در ۲۰ ماکرولیتر محلول نوکلئوفکشن حل شد. ترکیب حاصل، به سرعت به کووت‌های مخصوص نوکلئوفکشن منتقل و در دستگاه نوکلئوفکشن 4D-Nucleofection Amaxa (Lonza, Germany) با برنامه‌ی اختصاصی EH-115 برای سلول‌های T ترنسفکت شد. بعد از اتمام نوکلئوفکشن، محتویات کووت‌ها به آرامی به پلیت سلولی حاوی محیط کشت از قبل گرم شده منتقل و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد.

آنالیز کارایی ویرایش ژنی توسط سیستم CRISPR/Cas9. فراوانی Indelهای ایجاد شده توسط سیستم ویرایشی CRISPR/Cas9 یا به عباراتی کارایی ویرایش ژنی، با استفاده از ابزار آنلاین Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) (۱۷) مبنی بر توالی‌یابی DNA، اندازه‌گیری شد. بدین منظور، دو روز بعد از ترنسفکشن، DNAی ژنومی سلول‌های ویرایش شده و سلول‌های کنترل با استفاده از بافر استخراج سریع Quick extract (Epicenter, USA) استخراج شد؛ سلول‌ها ابتدا در سوسپانسیون استخراج، تجزیه (۴۰۰۰–۳۰۰۰ سلول در هر میکرولیتر) شدند و سوسپانسیون سلولی در دمای ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و سپس، در دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از استخراج DNA، نواحی مورد هدف gRNAهای انتخاب شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در بر گیرنده‌ی ناحیه‌ی مورد هدف، با Polymerase chain reaction (PCR) تکثیر شدند (جدول ۲).

جدول ۲. پرایمرهای طراحی شده جهت آنالیز کارایی ناک‌اوت ژنی توسط سیستم CRISPR/Cas9 در جایگاه‌های ژنی T Cell receptor alpha constant (TRAC) و β2 microglobulin (B2M)

نام	توالی
TRAC- Forward primer	TCACGAGCAGCTGGTTTCTA
TRAC- Reverse primer	ATGCTGTTGTTGAAGGCGTT
B2M- Forward primer	TCTCTCTAACCTGGCACTGC
B2M- Reverse primer	GCCCTAAACTTTGTCCCGAC

سپس، به منظور آنالیز فراوانی تغییرات اللی ایجاد شده توسط سیستم ویرایشی CRISPR/Cas9 با استفاده از روش TIDE، محصولات PCR در بر گیرنده‌ی ناحیه‌ی مورد ویرایش ژنی از نمونه‌ی شاهد (ترنسفکت نشده) و نمونه‌های ترنسفکت شده با کمپلکس‌های RNP مربوط، توالی‌یابی و با استفاده از ابزار آنلاین TIDE (http://shinyapps.datacurators.nl/tide/) مورد تجزیه و تحلیل قرا گرفتند.

فلوسایتومتری: روش فلوسایتومتری، به منظور تأیید ناک‌اوت ژنی و اختلال در بیان سطحی پروتئین‌های TCR و B2M مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، چهار روز بعد از ترنسفکشن، سلول‌های پرایمری T انسانی با بافر PBS شستشو و با آنتی‌بادی‌های لیبل شده شامل PE Mouse Anti-Human β2-Microglobulin

APC Mouse Anti-Human CD3 (BD Bioscience, USA) و (BD Bioscience, USA) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی رنگ‌آمیزی شدند. دستگاه BD FACSCalibur (BD Bioscience, USA) به منظور انجام آنالیزهای فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت. تمام داده‌های فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowJo مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته‌ها

ارزیابی کارایی ویرایش ژنی و آنالیز فراوانی Indelهای ایجاد شده توسط سیستم ویرایشی CRISPR/Cas9. در اولین قدم از ویرایش سلول‌های پرایمری T انسانی، gRNAهایی به منظور هدف‌گیری اگزون ابتدایی ژن‌های TRAC و B2M طراحی شدند. جهت طراحی gRNAها، ابتدا توالی ژن مورد نظر در پایگاه‌های طراحی gRNA نظیر CRISPOR (http://crispor.tefor.net) (۱۲) وارد شد تا توالی‌های gRNA بر اساس شناسایی توالی موتیف PAM (NGG) طراحی شوند. با توجه به این که توالی‌های gRNA مختلف، کارایی ویرایش متفاوتی در یک ناحیه‌ی ژنی مورد هدف نشان می‌دهند، gRNAهای متعددی به منظور هدف‌گیری ژن‌های TRAC و B2M طراحی شد و مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). از بین gRNAهای طراحی شده توسط ابزار CRISPOR، سه gRNA جهت ناک‌اوت ژن TRAC و سه gRNA جهت ناک‌اوت ژن B2M بر مبنای دارا بودن بالاترین امتیاز هدف‌گیری (On-target score) و بالاترین میزان اختصاصیت (Off-target score) یا کم بودن تعداد Off-target انتخاب شدند.

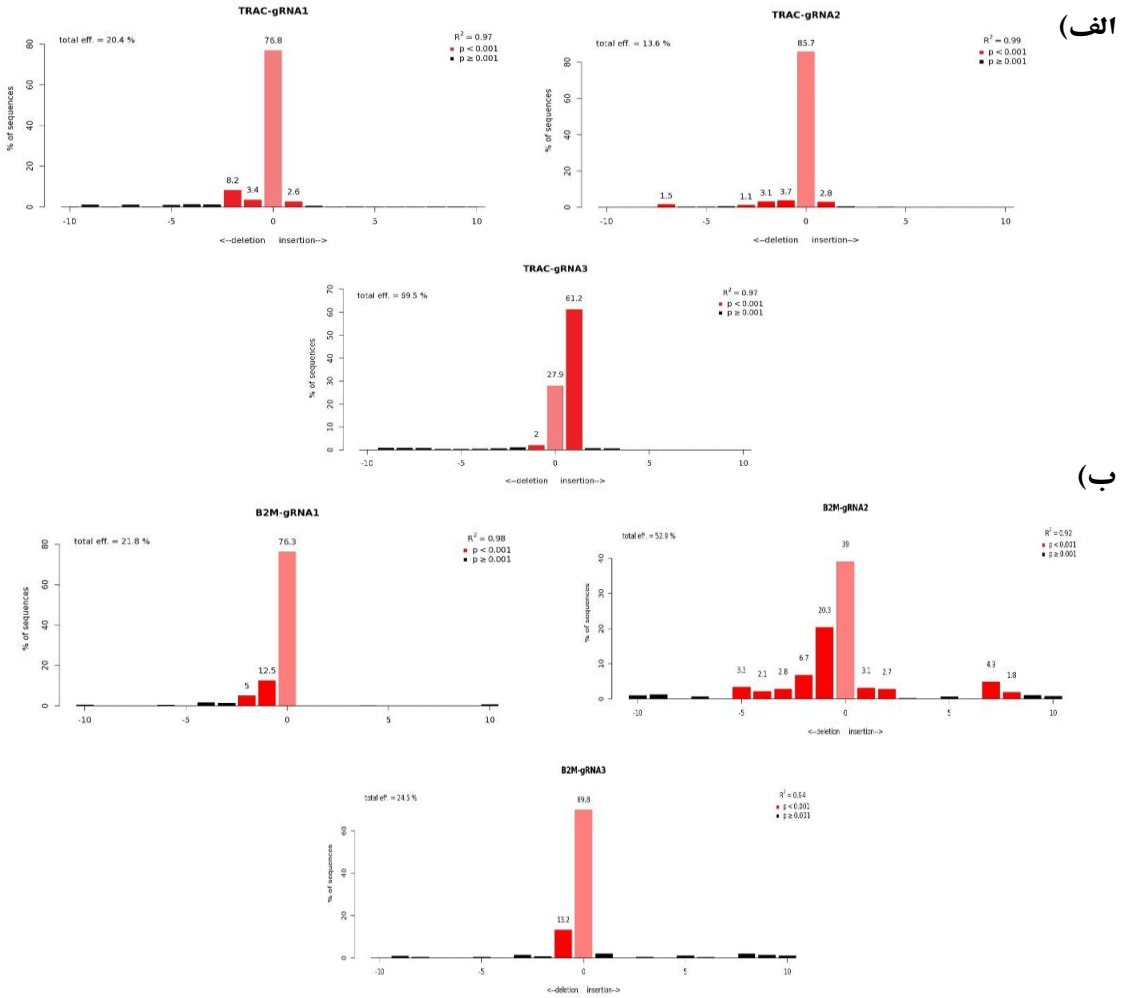
به منظور ارزیابی کارایی ناک‌اوت ژنی با واسطه‌ی سیستم CRISPR و عملکرد gRNAها، سلول‌های پرایمری T تحریک شده با دانابیدهای آنتی CD3/CD28، به طور جداگانه با کمپلکس‌های RNP مجزا ترنسفکت شدند. ۴۸ ساعت بعد از ترنسفکشن سلول‌های T، DNAی ژنومی سلول‌ها استخراج و کارایی ناک‌اوت ژنی با استفاده از روش TIDE (۱۷) مورد بررسی قرار گرفت. بر خلاف روش‌های تشخیصی بر پایه‌ی آنزیم که تنها می‌توانند فراوانی کلی ویرایش ژنی را تخمین بزنند، روش TIDE تخمین به نسبت دقیقی از فراوانی Indelهای ایجاد شده توسط سیستم CRISPR ارایه می‌دهد. این روش، بر پایه‌ی دو واکنش PCR است که بر روی نمونه‌ی ویرایش شده و یک نمونه‌ی شاهد (ویرایش نشده) انجام می‌شود. سپس، محصولات PCR با استفاده از روش استاندارد توالی‌یابی Sanger، توالی‌یابی می‌شوند و دو فایل نهایی توالی‌یابی در وب سایت TIDE بارگذاری می‌شوند. کروماتوگرام‌های توالی‌یابی با استفاده از یک الگوریتم توسعه یافته‌ی ویژه به منظور تعیین تغییرات نوکلئوتیدی ایجاد شده به واسطه‌ی سیستم CRISPR در نمونه‌ی ویرایش شده مورد آنالیز قرار می‌گیرند و فراوانی تغییرات نوکلئوتیدی ایجاد شده یا Indelها که نشانگر اختلال در ژن مورد هدف است، با آنالیز مخلوطی از توالی‌ها و مقایسه‌ی نمونه‌ی ویرایش شده با نمونه‌ی شاهد، محاسبه می‌شود.

TIDE، ارزیابی جامع و معتبری از نتیجه‌ی ویرایش ژنی فراهم می‌آورد و پروفایل درج‌شدگی‌ها و حذف‌شدگی‌های (indel) اصلی در DNA نمونه‌های ویرایش شده را که به واسطه‌ی رویدادهای ویرایشی مستقل از DNA الگو رخ می‌دهد، به تصویر می‌کشد. نتیجه‌ی آنالیز کارایی عملکرد gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی ژن TRAC و ژن B2M یا به عبارتی طیف و فراوانی Indelهای کوچک ایجاد شده در نتیجه‌ی ویرایش ژنی با استفاده از الگوریتم TIDE نشان داه شده است (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۱- الف مشاهده می‌شود، در مورد gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی ژن TRAC، طیفی از درج‌شدگی‌ها و حذف‌شدگی‌های متنوع با فراوانی مشخص، مشاهده شد. در بین تمام Indelهای ایجاد شده توسط هر سه gRNA، درج‌شدگی یک جفت‌بازی (+1bp) ایجاد شده توسط gRNA3، بالاترین فراوانی (۶۱ درصد) را به خود اختصاص داد. در مورد هر سه gRNA، شماری از حذف‌شدگی‌های بزرگ‌تر با فراوانی متغیر نیز مشاهده شد. درصد کلی فراوانی ویرایش ژنی با واسطه‌ی gRNA1، gRNA2 و gRNA3 به ترتیب ۲۰/۴، ۱۳/۶ و ۶۹/۵ درصد برآورد شد.

در مورد gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی ژن B2M، حذف یک جفت‌بازی (-1bp) اصلی‌ترین Indel ایجاد شده همراه با تنوعی از درج‌شدگی‌ها و حذف‌شدگی‌ها با فراوانی کمتر بود. gRNA1 تنها منجر به ایجاد حذف‌های ۲-۱ جفت‌بازی، gRNA2 منجر به ایجاد حذف‌های ۵-۱ جفت‌بازی، درج‌شدگی‌های ۲-۱ جفت‌بازی و تعدادی درج‌شدگی بزرگ‌تر (۸-۷ جفت‌بازی) شد. در نهایت، gRNA3 تنها با ایجاد درج‌شدگی ۱ جفت‌بازی همراه بود. درصد کلی فراوانی ویرایش ژنی با واسطه‌ی gRNA1، gRNA2 و gRNA3 به ترتیب ۲۱/۸، ۵۲/۹ و ۲۴/۵ درصد محاسبه شد (شکل ۱- ب).

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، از شش gRNA هدف گیری کننده‌ی ژن‌های TRAC و B2M، TRAC-gRNA3 و B2M-gRNA2 به ترتیب با بالاترین کارایی ویرایش ژنی برابر با حدود ۷۰ و ۵۰ درصد همراه بودند. بنابراین، این دو gRNA قادر به ایجاد میزان بالایی ویرایش و به عبارتی ناک‌اوت ژنی بودند. اغلب Indelهای شناسایی شده توسط TIDE قادر به ایجاد تغییر در چارچوب خوانش ژنی هستند که با ناک‌اوت ژن و در نتیجه، ایجاد پروتئین‌های کوتاه شده‌ی غیر عملکردی همراه است.

آنالیز عملکردی به منظور تأیید غیر فعال شدن بیان پروتئین‌های TCR و HLA بعد از تأیید کارایی gRNAهای هدف‌گیری کننده‌ی ژن‌های TRAC و B2M، کارآمدترین gRNAها از نظر ناک‌اوت ژنی، یعنی TRAC-gRNA3 و B2M-gRNA2، انتخاب و قابلیت عملکردی

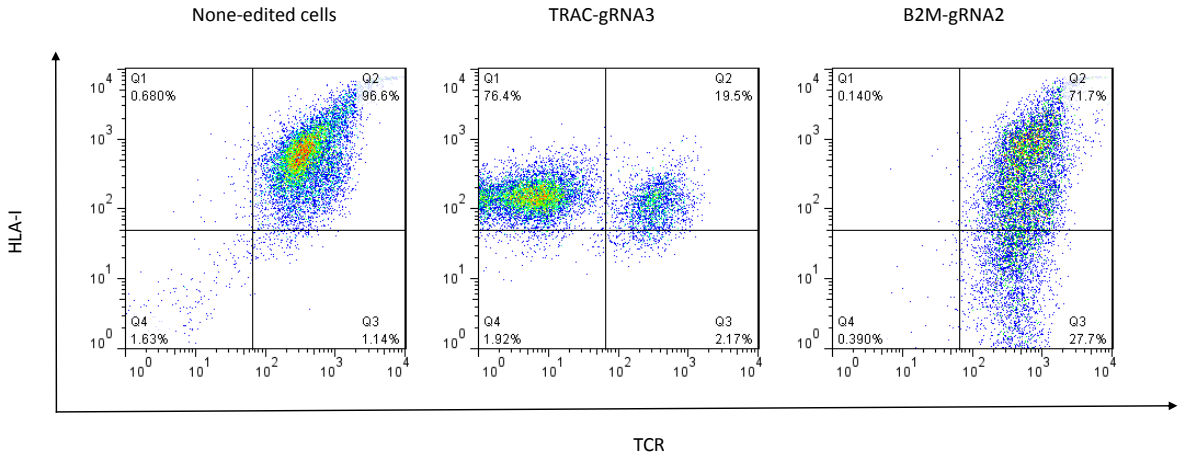


شکل ۱. نتیجه‌ی آنالیز Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) به منظور محاسبه‌ی اندازه و درصد فراوانی Indelهای ایجاد شده توسط gRNAهای منتخب جهت ناک‌اوت الف) ژن T Cell receptor alpha constant (TRAC) و ب) ژن β2 microglobulin (B2M). اندازه‌ی Indelها بر روی محور X (جفت‌باز) و فراوانی آن‌ها بر روی محور Y نمایش داده شده است. الل وحشی به رنگ صورتی و Indelها به رنگ قرمز (P < ۰/۰۰۱) یا مشکی (P > ۰/۰۰۱) (نمایانگر معنی‌دار بودن تشخیص) مشخص شده‌اند.

این دو gRNA در ایجاد اختلال در بیان پروتئین‌های مربوط در سلول‌های پرایمری T مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، میزان بیان سطحی پروتئین‌های هدف در سلول‌های ویرایش شده با استفاده از فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری بیان کمپلکس TCR، از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه CD3ε استفاده شد. CD3ε تنها زمانی که کمپلکس TCRαβ بیان می‌شود، در سطح سول‌های T حضور دارد (۱۸). از طرف دیگر، از آن جایی که B2M برای تجمع و بیان کمپلکس HLA-I ضروری است (۱۹)، از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه B2M به منظور ارزیابی بیان کمپلکس HLA-I استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری کاهش قابل ملاحظه‌ی بیان پروتئین‌های TCR (۷۶ درصد) و HLA-I (۲۷ درصد) را تأیید کرد (شکل ۲).

بحث

در این مطالعه، از روش مبتنی بر انتقال کمپلکس‌های Cas9 RNP به عنوان کارامدترین روش ویرایش ژن در سلول‌های دشوار از نظر ترنسفکشن، در این مطالعه سلول‌های T پرایمری انسانی، با هدف ناک‌اوت دو ژن TRAC و B2M استفاده شد. روش کار مبتنی بر جداسازی و فعال سازی سلول‌های T پرایمری انسانی و به دنبال آن نوکلئوفکشن کمپلکس‌های ریبونوکلئوپروتئینی حاوی پروتئین Cas9 و gRNAهای اختصاصی برای ژن‌های TRAC و B2M بود.



شکل ۲. نتیجه‌ی آنالیز عملکردی ناک‌اوت ژنی با واسطه‌ی کمپلکس‌های Cas9 RNP. ۴ روز پس از ترنسفکشن با gRNAهای دارای بالاترین کارایی ویرایش ژنی یعنی TRAC-gRNA3 و B2M-gRNA2، سلول‌های T پرایمری به منظور اندازه‌گیری بیان سطح سلولی کمپلکس‌های T Cell Receptor (TCR) و Human leukocyte antigen-I (HLA-I) مورد آنالیز فلوسایتومتری قرار گرفتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، ترنسفکشن کمپلکس‌های RNP مربوط، با ناک‌اوت ۷۶ درصدی بیان TCR و ناک‌اوت ۲۷ درصدی بیان HLA-I همراه بود.

ارزیابی کارایی ویرایش ژنی و میزان Indelهای ایجاد شده توسط هر gRNA با استفاده از توالی یابی و آنالیز به کمک ابزار TIDE نشان داد که تمامی gRNAهای مورد مطالعه قادر به ایجاد ایندل‌های تغییر دهنده‌ی چارچوب خواندن یا به عبارتی ایجاد ناک اوت عملکردی در سلول‌های T پرایمری انسانی هستند. از بین gRNAهای مورد بررسی، TRAC-gRNA3 و B2M-gRNA2 با بالاترین میزان ناک اوت ژنی یا بالاترین میزان Indel تغییر دهنده‌ی چارچوب به ترتیب برابر با ۷۰ و ۵۰ درصد به عنوان کارامدترین gRNAها و به منظور بررسی آنالیزهای عملکردی بیشتر انتخاب شدند. آنالیز داده‌های فلوسایتومتری برای دو gRNAی که بالاترین میزان فعالیت را از نظر ویرایش ژنی داشتند، یعنی TRAC-gRNA3 و B2M-gRNA2 نیز کاهش قابل ملاحظه‌ی سطح بیان پروتئین‌های TCR(CD3) و HLA-I را به ترتیب به میزان ۷۶ و ۲۷ درصد در سلول‌های T مربوط تأیید کرد.

لنفوسیت‌های T، تنظیم کننده‌های مهم و تأثیرگذار در پاسخ‌های ایمنی سازگار هستند. مطالعه‌ی عملکرد ژن در سلول‌های T پرایمری نه تنها از منظر تحقیق، بلکه برای ایمونوتراپی‌های مبتنی بر سلول T نیز بسیار حایز اهمیت است. راهبردهای متعددی برای ترکیب ویرایش ژنی با توسعه‌ی نسل بعدی سلول‌های T بیان کننده‌ی گیرنده‌ی آنتی‌ژن کایمریک (Chimeric antigen receptor یا CAR) با هدف درمان سرطان‌های مختلف دنبال می‌شود. این رویکردها، شامل حذف گیرنده‌های اندوژن سلول‌های T (TCR) و مولکول‌های HLA گروه I به منظور تولید سلول‌های T فراگیر یا اختلال در گیرنده‌های مهاری همچون Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) یا Programmed cell death protein 1 (PD-1) است (۲۰، ۷). در حال حاضر، تکنیک‌های اصلی ویرایش ژن از جمله Zinc finger nucleases (ZFN) (۲۱)، Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) (۲۴-۲۲) و CRISPR-Cas9 (۲۵، ۲۰، ۷) با موفقیت برای ناک‌اوت کردن TCR و در نتیجه، جلوگیری از اثرات ناخواسته‌ی GVHD مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین، از راهبردهای ویرایش ژنوم در جهت حذف یا کاهش بیان آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی بر روی سلول‌های T دهنده به منظور جلوگیری یا تأخیر در رد شدن سلول های آلوژنیک توسط سیستم ایمنی گیرنده استفاده شده است (۲۵).

تکنولوژی CRISPR/Cas9 امکان ویرایش سریع و کارآمد ژن را برای انواع بسیاری از سلول‌ها و گونه‌ها، به واقعیت تبدیل کرده است. زمانی که این سیستم دو جزیی به سلول‌های هدف وارد می‌شود، موجب ایجاد شکاف‌های اختصاصی جایگاه در DNA می‌شود که توسط مکانیسم‌های ذاتی ترمیم سلول، ترمیم می‌شوند. مسیر ترمیمی، همراه با جهش NHEJ با فراوانی بالایی در سلول‌ها رخ می‌دهد و موجب ایجاد حذف یا اضافه شدگی‌هایی در محل شکست می‌شود که اغلب با از دست دادن عملکرد ژن همراه است. ویرایش ژنی در سلول‌های T پرایمری با ایجاد موش‌های تراریخته‌ی Cas9 امکان پذیر شده است (۲۷-۲۶). با این حال، ویرایش ژن با واسطه‌ی سیستم CRISPR/Cas9 در سلول‌های T پرایمری در شرایط آزمایشگاهی به دلیل عدم وجود روش‌های ترانسفکشن کارآمد با محدودیت‌هایی مواجه بود. در رویکردهای اخیر، از الکتروپوریشن ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas9 (RNP) برای ترنسفکت سلول‌های پرایمری T انسانی فعال شده استفاده می‌شود که با کارایی بسیار

بالای ناک‌اوت ژنی همراه بوده است (۳۰-۲۸).

بر خلاف ترنسفکشن پلاسمید که به خاطر ایجاد سمیت و مرگ سلولی، امکان ایجاد ویرایشی ژنی مؤثر را با محدودیت مواجه کرده است (۴)، سیستم انتقال مبتنی بر Cas9 RNP امکان ویرایش کارامد ژن را در سلول‌های T پرایمری انسانی که مقاوم به ترنسفکشن DNA هستند، فراهم کرده است؛ بدین ترتیب، از خطرات احتمالی ادغام ژنتیکی ناخواسته جلوگیری می‌شود. استفاده از این روش، نیاز به روش‌های انتقال اجزای سیستم CRISPR را که وابسته به کلونینگ یا ترنسداکشن ویروسی است، برطرف می‌کند. بنابراین، یک روش دستکاری ژنی ایمن و مؤثر از نظر بالینی محسوب می‌شود. الکتروپوریشن Cas9 RNP در جهت افزایش کارایی ترنسفکشن و زنده‌مانی سلول‌های T بهینه شده است. کارایی بالای ناک‌اوت ژنی توسط این روش، نیاز به انتخاب یا جداسازی جمعیت سلول‌های ویرایش شده را تا حد زیادی برطرف کرده است. از مزایای دیگر این سیستم، توانایی ترکیب چندین gRNA است که امکان هدف قرار دادن چندین ژن و در نتیجه، امکان مطالعه‌ی اثرات ترکیبی را نیز فراهم می‌کند.

در این مطالعه، کارایی سیستم انتقالی مبتنی بر ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas9 RNP جهت ایجاد بستری برای ادغام با ایمنوتراپی‌های آینده بر پایه‌ی سلول‌های CAR T و تولید سلول‌های CAR T آلوژنیک یا فراگیر مورد ارزیابی قرار گرفت؛ هر چند عملکرد سایتوتوکسیک این سلول‌ها باید مورد ارزیابی قرار گیرد. همان‌طور که اشاره شد، از کار انداختن TCR و HLA-I به ترتیب از بروز واکنش‌های GVHD و HVGD جلوگیری می‌کند. قابل توجه است که فقدان مولکول‌های HLA گروه I، ممکن است منجر به ایجاد پاسخ سلول‌های کشنده‌ی طبیعی علیه سلول‌های T آلوژنیک گردد. بنابراین، این مسأله باید برای اهداف ایمونوتراپی آینده مد نظر قرار گیرد. یک راه حل ممکن، مهندسی سلول‌های T با تزاید بیان سایر مولکول‌های HLA گروه I نظیر HLA-G یا HLA-E به منظور اجتناب از فعال شدن سلول‌های NK است. به جای ناک‌اوت کردن مولکول‌های HLA گروه I، می‌توان سایر ژن‌ها از جمله CD52 (۲۳) یا دئوکسی سیتیدین کیناز (dCK) (۲۴) را به ترتیب به منظور ایجاد سلول‌های T آلوژنیک مقاوم به آلمتوزوماب یا آنالوگ‌های نوکلئوتید پورین ناک‌اوت کرد. این داروها به طور رایج برای شیمی‌درمانی در جهت تخلیه‌ی لنفوسیت‌ها استفاده می‌شوند و بدین ترتیب، امکان حذف لنفوسیت‌های بیمار را فراهم می‌کنند؛ در حالی که از شناسایی و تخریب سلول‌های آلوژنیک توسط سلول‌های سیستم ایمنی میزبان ممانعت خواهد شد.

نتیجه‌گیری

ویرایش ژنی با استفاده از کمپلکس‌های Cas9 RNP از پیش مونتاژ شده به جای DNA پلاسمیدی، امکان ویرایش کارآمد و دقیق ژنوم را در سلول‌های مختلف انسانی از جمله سلول‌های پرایمری فراهم کرده است. این روش، با برطرف کردن مشکلات و محدودیت‌های مرتبط با ترنسفکشن DNA، امکان ویرایش ژنی را نه تنها در تحقیقات پایه‌ای، بلکه در کاربردهای پزشکی و بیوتکنولوژی گسترش داده است. به دلیل مزایای گسترده، این سیستم انتقالی برای کاربردهای درمانی انسانی ترجیح داده می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه از پایان‌نامه‌ی دکتری تخصصی خانم الهه کمالی استخراج و توسط گروه تحقیقاتی دانشگاه اصفهان و مؤسسه‌ی BRIC دانشگاه کپنهاگ دانمارک پشتیبانی شده است. طرح مربوط با شماره‌ی ۸۱۷۸ در معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان تصویب شده است. نویسندگان تحقیق حاضر از پشتیبانی مالی و مشاوره‌ی دکتر Morten Frödin کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012; 337(6096): 816-21.
2. Wang W, Ye C, Liu J, Zhang D, Kimata JT, Zhou P. CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. PLoS One 2014; 9(12): e115987.
3. Li C, Guan X, Du T, Jin W, Wu B, Liu Y, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. J Gen Virol 2015; 96(8): 2381-93.
4. Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, Meissner TB, Boutwell CL, Friesen M, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. Cell Stem Cell 2014; 15(5): 643-52.
5. Su S, Hu B, Shao J, Shen B, Du J, Du Y, et al. CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. Sci Rep 2016; 6: 20070.
6. Gomes-Silva D, Srinivasan M, Sharma S, Lee CM, Wagner DL, Davis TH, et al. CD7-edited T cells expressing a CD7-specific CAR for the therapy of T-cell malignancies. Blood 2017; 130(3): 285-96.
7. Ren J, Zhang X, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, et al. A versatile system for rapid multiplex genome-edited CAR T cell generation. Oncotarget 2017; 8(10): 17002-11.
8. Seki A, Rutz S. Optimized RNP transfection for

highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. J Exp Med 2018; 215(3): 985-97.
9. Liang X, Potter J, Kumar S, Zou Y, Quintanilla R, Sridharan M, et al. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. J Biotechnol 2015; 208: 44-53.
10. Morgan NV, Goddard S, Cardno TS, McDonald D, Rahman F, Barge D, et al. Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells. J Clin Invest 2011; 121(2): 695-702.
11. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 1987; 329(6139): 506-12.
12. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. Nucleic Acids Res 2018; 46(W1): W242-W245.
13. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nat Biotechnol 2016; 34(2): 184-91.
14. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 2013; 31(9): 827-32.
15. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1968; 97: 77-89.
16. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. J Immunol Methods 2003; 275(1-2): 251-5.
17. Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. Nucleic Acids Res 2014; 42(22): e168.
18. Geisler C, Kuhlmann J, Rubin B. Assembly, intracellular processing, and expression at the cell surface of the human alpha beta T cell receptor/CD3 complex. Function of the CD3-zeta chain. J Immunol 1989; 143(12): 4069-77.
19. Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC. Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulitis resistant. Diabetes 1994; 43(3): 505-9.
20. Liu X, Zhang Y, Cheng C, Cheng AW, Zhang X, Li N, et al. CRISPR-Cas9-mediated multiplex gene editing in CAR-T cells. Cell Res 2017; 27(1): 154-7.
21. Torikai H, Reik A, Liu PQ, Zhou Y, Zhang L, Maiti S, et al. A foundation for universal T-cell based immunotherapy: T cells engineered to express a CD19-specific chimeric-antigen-receptor and eliminate expression of endogenous TCR. Blood 2012; 119(24): 5697-705.
22. Berdien B, Mock U, Atanackovic D, Fehse B. TALEN-mediated editing of endogenous T-cell receptors facilitates efficient reprogramming of T lymphocytes by lentiviral gene transfer. Gene Ther 2014; 21(6): 539-48.
23. Poirot L, Philip B, Schiffer-Mannioui C, Le CD, Chion-Sotinel I, Derniame S, et al. Multiplex genome-edited T-cell manufacturing platform for "off-the-shelf" adoptive T-cell immunotherapies. Cancer Res 2015; 75(18): 3853-64.
24. Valton J, Guyot V, Marechal A, Filhol JM, Juillerat A, Duclert A, et al. A Multidrug-resistant engineered CAR T cell for allogeneic combination immunotherapy. Mol Ther 2015; 23(9): 1507-18.
25. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. Clin Cancer Res 2017; 23(9): 2255-66.
26. Chu VT, Weber T, Graf R, Sommermann T, Petsch K, Sack U, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. BMC Biotechnol 2016; 16: 4.
27. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. Cell 2014; 159(2): 440-55.
28. Hendel A, Bak RO, Clark JT, Kennedy AB, Ryan DE, Roy S, et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. Nat Biotechnol 2015; 33(9): 985-9.
29. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, et al. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. Sci Rep 2017; 7(1): 737.
30. Schumann K, Lin S, Boyer E, Simeonov DR, Subramaniam M, Gate RE, et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(33): 10437-42.

DOI: *10.22122/jims.v39i612.13856* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 612, 4th Week, April 2021**

Received: 23.10.2020 Accepted: 04.02.2021 Published: 26.04.2021

Targeted Gene Editing in Human Primary T Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins

Elahe Kamali[1], Zohreh Hojati[2], Fatemeh Rahbarizadeh[3]

Original Article

Abstract

Background: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9)-mediated gene knockout of primary T cell has several limitations for clinical applications. Direct delivery of recombinant Cas9 protein and synthetic gRNA, as a pre-assembled ribonucleoprotein (RNP) complex, has become a potent approach to introduce highly efficient gene editing in primary T cells. In this study, we employed Cas9 RNP-based delivery system for targeted T Cell receptor alpha constant (TRAC) and β2 microglobulin (B2M) genes knockout in human primary T cells.

Methods: Specific gRNAs were designed to target the first exons of TRAC and B2M genes. Cas9 protein and respective synthetic gRNAs were then mixed separately, and electroporated into human primary T cells isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The gene editing efficiency was quantified using tracking of indels by decomposition (TIDE) analysis and flow cytometry.

Findings: Three days after electroporation of primary T cells with the TRAC and B2M targeting RNP complexes, TIDE analysis revealed the knockout efficiency of 13-60 percent for the TRAC-targeting gRNAs and 21-53 percent for B2M-targeting gRNAs. Flow cytometry analysis confirmed ~76% and ~27% complete loss of expression for the most efficient gRNAs targeting TRAC (TRAC-gRNA3) and B2M (B2M-gRNA2), respectively.

Conclusion: Our results demonstrate that Cas9 RNP system can be efficiently delivered into primary T cells and result in targeted gene knockout. The protocol described here enables a streamlined and highly efficient solution for maximizing editing efficiency in primary T cells, and simplifies the gene editing process for next-generation immunotherapies.

Keywords: Gene knockout techniques; Immunotherapy; T-Cell receptor

Citation: Kamali E, Hojati Z, Rahbarizadeh F. **Targeted Gene Editing in Human Primary T Cells Using CRISPR/Cas9 Ribonucleoproteins.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(612): 66-75.

1- PhD Candidate, Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Science and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Professor, Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, School of Biological Science and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Zohreh Hojati, Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir