تولید رده سلولی ناک اوت IDUA توسط تکنیک ویرایش ژنی CRISPR/Cas

علی حاتمی بردر[۱]، محسن عظیمی نژاد[۲]، مجتبی جعفری نیا[۳]، حمیدرضا گودرزی[۳]، مجید مجرد[۴]

۱- دانشجوی دکترا، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۲- استادیار، گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی نیشابور، نیشابور، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

۴- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

یافته / دوره ۲۲ / شماره ۴ / زمستان ۹۹ / مسلسل ۸۶

چکیده

دریافت مقاله: ۹۹/۸/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۹/۹/۲۴

مقدمه: موکوپلی ساکاریدوز تیپ I (MPSI) بیماری شایع ذخیره ای لیزوزومی است که به واسطه کمبود آنزیم آلفا-ال -ایدورونیداز (IDUA) بر روی کروموزوم ۴ (4p16.3) ایجاد می گردد. این آنزیم در تجزیه گلیکوزآمینوگلیکانها یا موکوپلی ساکاریدهای درماتان سولفات و هپاران سولفات دخالت دارد و نقص در آنزیم مذکور منجر به افزایش سطح گلیکوز آمینو گلیکان ها (GAG) در خون و تجمع آن در اعضای مختلف بدن می شود. این ترکیبات پروتئوگلیکانی زیربنای ساختاری ماتریکس خارج سلولی و ساختار غضروفی نقاطی مثل مفاصل، دریچه‌های قلبی را فراهم می‌نماید؛ بعلاوه در تنظیم ارتباطات سلولی نقش دارد. در این مطالعه ما سیستم CRISPR/Cas را طراحی کردیم که ژن کد کننده انزیم IDUA را مورد هدف قرار داده است و ما توانستیم سلوهای ناک اوت این ژن را تولید کنیم.

مواد و روش‌ها: ابتدا sgRNA هدف IUDA در پلاسمید px335 کلون شد، با استفاده از نقشه برداری محدودکننده، پلاسمید نوترکیب تأیید شد. سپس پلاسمید نوترکیب به رده سلولی اپیتلیال انسانی، HEK-293 ترانسفکت شد. کلون های جهش یافته توسط آنالیز melting غربالگری شدند و جهش آنها با تعیین توالی سنگر مشخص شد.

یافته‌ها: هضم آنزیمی و تعیین توالی سنگر، القای جهش ایندل را در دو کلون هتروزیگوت و یک کلون هموزیگوت تایید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، ما با استفاده از سیستم CRISPR-Cas9 یک مدل سلولی سندرم هورلر تولید کردیم که این مدل می تواند جهت استفاده در رویکرد های درمانی این بیماری استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: سندرم هرلر، CRISPR-Cas، ژن ناک اوت، IDUA.

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی.

پست الکترونیک: Mojaradm@mums.ac.ir

مقدمه

سندرم هورلر (HS) یا MPSI شایع ترین شکل اختلالات ذخیره لیزوزومی (LSD) است (۱). بروز این اختلال یک مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ تولد زنده است. HS در نتیجه از دست دادن جهش های عملکردی در ژن آلفا-۱-ایدورونیداز (IDUA) رخ می دهد. آلفا -۱- ایدورونیداز هیدرولیز گلیکوزآمینوگلیکانهایی مانند سولفات درماتان و سولفات هپاران را کاتالیز می کند. اختلال در فعالیت این ژن منجر به تجمع تدریجی گلیکوزآمینوگلیکان در لیزوزوم ها و در نتیجه آسیب و از کار افتادن اندام های مختلف می شود (۲).

کودکان مبتلا به MPSI از بدو تولد طبیعی به نظر می رسند اما در سن ۱۲ تا ۲۴ ماهگی، طیف وسیعی از علائم مانند تأخیر در رشد، ماکروسفالی، ناهنجاری های دریچه قلب، صورت خشن، هپاتوسپلنومگالی و ماکروگلوسی را نشان می دهند. بدون درمان، اکثر بیماران فقط تا اواخر کودکی زنده می مانند. بیماری های قلبی و انسداد مجاری تنفسی عمده ترین دلایل مرگ و میر این بیماران هستند (۳).

از آنجایی که آلفا -۱- ایدورونیداز می تواند توسط سلول ها، در جریان خون ترشح شود و همچنین توسط سلول های دیگر جذب شود، درمان های حاضر بر تأمین آنزیم عملکردی در جریان خون متمرکز است. درمان جایگزینی آنزیم (ERT) و پیوند مغز استخوان (BMT) دو گزینه درمانی این بیماری هستند. با این حال، این روش های درمانی با چالش های محدودکننده ای روبرو هستند. پیوند مغز استخوان همراه با سرکوب سیستم ایمنی بدن است که به طور قابل توجهی زندگی بیمار را تحت تاثیر قرار می دهد.

از طرف دیگر درمان جایگزینی آنزیم، یک درمان دائمی نیست و تداوم استفاده از این آنزیم های گران قیمت، درمان را از نظر اقتصادی بی نتیجه کرده است. با توجه به محدودیت های موجود، یک درمان دائمی و بدون این محدودیت ها برای مدیریت بیماران بسیار ضروری است (۳). در سالهای اخیر ، ویرایش ژنی سلولهای بنیادی مغز استخوان بیمار، نتایج امیدوار کننده ای را نشان داده است و اصلاح ژنتیکی ژن IDUA و جایگزینی ژن معیوب با یک نسخه سالم یک درمان ایده آل را ارایه می دهد. توسعه این رویکرد درمانی می تواند امید به زندگی بیماران MPSI را افزایش دهد (۴).

The Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR) و پروتئین Cas9 از اجزای سیستم ایمنی تطبیقی میکروبی است که در سالهای اخیر برای دستکاری ژنوم در سلولهای کشت یافته و یا کل ارگانیسم ها مورد استفاده قرار گرفته است (۵). اندونوکلئاز Cas9 توسط یک RNA تک رشته راهنمای برنامه ریزی شده (sgRNA) برای ایجاد شکستگی های دو رشته ای در مکان های خاصی از ژنوم هدایت می شوند.

این شکست های دو رشته ای مکان مناسبی را برای دستکاری موثر ژن فراهم می کنند. در سال های اخیر ، با کمک فناوری CRISPR ، پیشرفت های عظیمی در زمینه های مختلف ژن درمانی در انواع بیماری ها حاصل شده است. با این حال، نگرانی های زیادی در مورد القای غیر اختصاصی شکست های دو رشته ای خارج از اهداف در ژنوم توسط CRISPR وجود دارد که ممکن است منجر به نتایج ناخواسته شود.

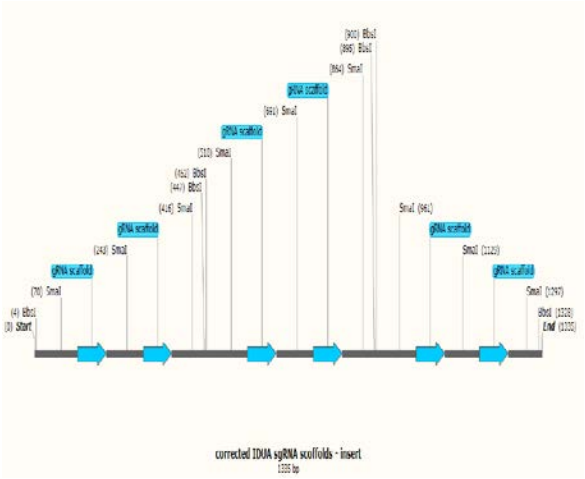
یکی از رویکرهای حل این مشکل، غیرفعال کردن یکی از دمین های DNA نیکاز در آنزیم Cas9 است. این جهش فعالیت نوکلئازی Cas9 را از بین می برد، اما همچنان Cas9 دارای فعالیت نیکازی می باشد. با طراحی دو sgRNA مجاور، می توان دو نیکاز را در نزدیکی یکدیگر القا کرد و جهش DSB را القا نمود. واضح است که القای یک نیکاز در DNA اثر جهش زایی بر روی ژنوم ندارد. با استفاده از این استراتژی، اختصاصیت سیستم CRISPR به طور چشمگیری افزایش می یابد.

در روش های جدید تکنولوژی CRISPR مبتنی بر نیکاز، میزان عملکرد غیر اختصاصی این سیستم کاهش یافته است، اما این استراتژی نیز با این چالش مواجه است که باید چندین sgRNA همزمان به سلول وارد شود. به عنوان مثال، القای یک جهش حذف نیاز به ۴ توالی sgRNA دارد. روشهای مختلفی برای حل این مشکل ایجاد شده است مانند انتقال همزمان sgRNA با پروتئین Cas9 یا تولید پلاسمیدهای چند کاست.

با توجه به محدودیت های مختلف این استراتژی ها، توسعه روشی برای انتقال همزمان sgRNA های متعدد و Cas9 به صورت یک واحد، به سلول هدف هنوز مورد نیاز است. در طی سال ۲۰۰۶، Xie و همکارانش از دستگاه پیرایش tRNA برای تقویت ویرایش مولتی پلکس CRISPR / Cas9 در برنج استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که استفاده از سیستم پردازش درون زای tRNA می تواند به طور قابل توجهی قدرت و کارایی سیستم CRISPR / Cas9 را افزایش دهد. بر این اساس، ما یک پلاسمید بیان کننده دو sgRNA را طراحی کردیم که از این سیستم استفاده می کند و می تواند برای هدف قرار دادن ژن IDUA استفاده شود.

مواد و روش‌ها

از آنجا که تعداد زیادی جهش IDUA در اگزون ۷ رخ می دهد، sgRNA ها برای هدف قرار دادن اگزون ۷ طراحی شده اند. طراحی sgRNA با توجه به پارامترهای دقیق انجام شده است. sgRNA نباید هدف غیر اختصاصی داشته باشد. علاوه بر این، برای افزایش اختصاصیت هدف، از Cas9n (نیکاز Cas-9) برای مورد هدف قرار ژن استفاده شد. بنابراین sgRNA های مبتنی بر نیکاز به صورت دو sgRNA طراحی شدند که جایگاه هایی را روی رشته های مکمل هدف قرار می دهند. هر sgRNA با یک دنباله tracrRNA طراحی شده و از sgRNA مجاور خود توسط یک tRNA گلیسین جدا شده است. (شکل ۱A) سپس توالی طراحی شده، سنتز شد و در پلاسمید pGH کلون گردید (شکل ۱B).



شکل ۱A، سه جفت sgRNA

شکل ۱B، نقشه پلاسمید pGH

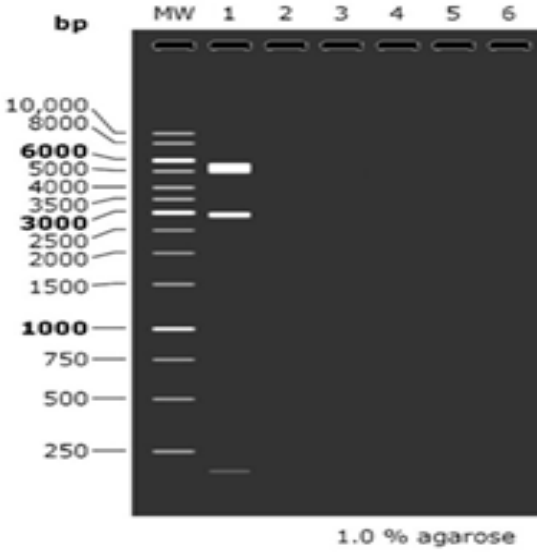
کلون SgRNA در پلاسمید pX335

پلاسمید سنتز شده توسط کلونینگ تکثیر شد و با آنزیم BbsI هضم گردید. به طور خلاصه، ۳۱µl از پلاسمید pGH، ۵µl از بافر NEB Cut Smart۱۰x و ۲ واحد از آنزیم محدود کننده BbsI مخلوط شد و با آب مقطر به حجم ۵۰µl رسید و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. آرایه بیان کننده sgRNA از ژل آگارز استخراج گردید. پلاسمید pX335 نیز طبق پروتکل فوق توسط آنزیم BbsI هضم شد. توالی های پلاسمید و sgRNA آماده شده با استفاده از T4 DNA لیگاز به

یکدیگر متصل شدند. ۰/۵ µg آرایه بیان کننده sgRNA تخلیص شده، ۱µg پلاسمید pX335 هضم شده، ۱µl بافر DNA۱۰ x لیگاز و ۱۰ واحد HC T4 DNA Ligase مخلوط شده و با آب مقطر به حجم ۱۰µl رسید و در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز انکوبه شد. محلول حاصل توسط پروتکل استاندارد شوک حرارتی به سلولهای DH5α واجد شرایط انتقال داده شد.

هضم آنزیمی

کلونی های نوترکیب به مدت یک شبانه روز در محیط LB کشت داده شدند. پلاسمیدها با استفاده از کیت استاندارد و طبق دستورالعمل استخراج گردیدند. پلاسمیدهای نوترکیب توسط هضم آنزیمی SmaI بررسی شدند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pX335-sgRNA توسط SmaI سه باند با طول های ۲۹۷۴ جفت باز، ۵۵۴۸ جفت باز و ۱۶۸ جفت باز ایجاد می کند.



شکل ۲، هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pX335-sgRNA توسط SmaI

کشت سلولی و ترانسفکشن

رده سلولی اپیتلیال کلیه جنینی انسانی HEK293، در محیط RPMI 1640 با ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر جنتامایسین و ۱۰٪ FBS کشت داده شد. سلول های ۱۰۵ × ۲/۵ به مدت ۳ روز قبل از ترانسفکشن در فلاسک ۲۵ میلی متر مربع قرار داده شدند. پس از رسیدن سلول ها به سطح تراکم ۶۰٪ ، طبق دستورالعمل، ۸ میکروگرم از پلاسمید pX335-sgRNA با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به سلولها ترانسفکت شد. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، محیط کشت با RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. هفتاد و دو ساعت بعد، سلولها تریپسینه شده و تک کلونها با روش رقیق سازی سریالی آماده شدند. سپس سلول ها به مدت یک هفته در میکروپلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و DNA از این چاهک ها استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اگزون ۷ ژن IDUA انجام شد. توالی های پرایمر در جدول ۱ ذکر شده است. نتایج PCR با استفاده از روش منحنی ذوب استاندارد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و نمونه ها با الگوی ذوب متفاوت تحت توالی یابی سنجر قرار گرفتند.

جدول ۱. پرایمرهای توالی اگزون ۷

Primer name	Sequence	Product size
IDUAEX7F	ACTACATCTCCCTCCACAG	489bp
IDUAEX7R	CATTGTCGTTGCTCAGGA	

یافته ها

تولید پلاسمید هدف IDUA

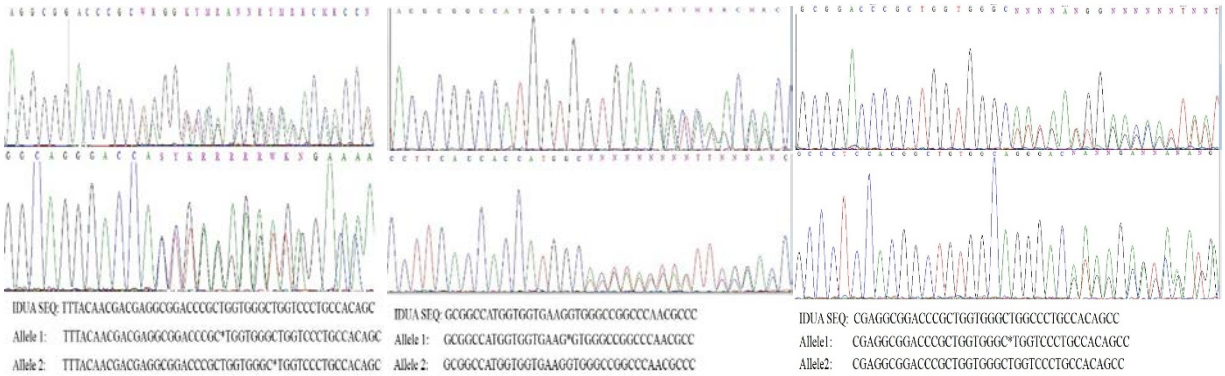
پلاسمیدهای نوترکیب pGH با استفاده از آنزیم BbsI هضم شدند. طبق نقشه پلاسمید نوترکیب pGH ، هضم پلاسمید pGH-sgRNA با آنزیم BbsI یک قطعه DNA، ۴۴۳ جفت باز می دهد. پلاسمیدهای هضم شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و قطعه مورد نظر از ژل استخراج و به پلاسمید pX335 خطی متصل شد. تشخیص پلاسمید pX335-sgRNA نوترکیب با استفاده از هضم آنزیمی SmaI انجام شد. طبق نقشه pX335-sgRNA، هضم پلاسمید توسط SmaI سه قطعه با طول های ۵۵۵۸ جفت باز ، ۲۹۵۰ جفت باز و ۱۷۳ جفت باز ایجاد می کند. پلاسمیدهای هضم شده بر روی ژل آگارز

۱٪ الکتروفورز شدند، برخی از پلاسمیدها الگوی مورد نظر را نشان دادند. در نهایت توالی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از توالی یابی سنگر تأیید شد.

تولید رده سلولی ناک اوت IDUA

در این مطالعه، با استفاده از سیستم CRISPR-nCas9، شکست های تک رشته ای مجاور در اگزون ۷ ژن IDUA ایجاد شد که در نهایت منجر به شکستگی دو رشته در این ژن می شود. به دنبال ترمیم شکست های دو رشته ای از طریق سیستم non-homologous end joining، جهش های حذف و درج در این مرحله رخ می دهد که اغلب منجر به تغییر در چارچوب خواندن و از بین رفتن عملکرد ژن می شود.

ده کلون از محصولات ترانسفکشن جدا شد و با استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اگزون ۷ IDUA در سلولهایی که منحنی ذوب آن انحراف داشت، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و توالی یابی شد. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، کلون های شماره ۳ و ۵ دارای جهش هتروزیگوت بودند. در مقابل، سلولهای کلون ۸ برای دو جهش مختلف ایندل هتروزیگوت بودند. هر سه جهش مشاهده شده جهش هایی با تغییر در چارچوب هستند که منجر به از دست دادن عملکرد ژن می شوند. با این حال، به دلیل ماهیت اتوزومی مغلوب سندرم هرلر، فقط کلون ۸ ژنوتیپ مورد نظر را داشت.



شکل۳. نتیجه توالی یابی ژن IDUA در کلون شماره (۳A)، کلون شماره ۵(۳B)و کلون شماره ۸ (۳C)

بحث و نتیجه گیری

در حال حاضر، روشهای متعددی برای تسهیل درمان LSD وجود دارد (۶). ویرایش ژنی می تواند درمان مناسبی برای این بیماری ها فراهم کند. سه سیستم ویرایش ژن شامل (۷) zinc finger nucleases (ZFNs) ، transcription activator-like effectors nucleases (TALENs) (۸) و (۹) homing endonucleases ارایه شدند. اما به دلیل ماهیت پیچیده و چالش برانگیز پیش بینی برهمکنش میان DNA و پروتئین، طراحی و استفاده از این روش ها دشوار است. سیستم CRISPR-Cas9 به عنوان یک تکنیک ویرایش ژنوم اخیراً مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۰). که یک روش درمانی برای بیماران مبتلا به LSD، جهت بازیابی فعالیت آنزیمی در سلولهای آتولوگ گرفته شده از بیمار را ارایه می دهد (۱۱). اگرچه استفاده از CRISPR / Cas9 هنوز در مراحل اولیه بالینی قرار دارد، اما اصلاح سلولهای انسانی با استفاده از سایر سیستم ویرایش ژنی در سالهای اخیر راه خود را برای کاربردهای بالینی باز کرده است (۱۲). مکانیسم مولکولی که برای قرار دادن قطعات DNA در ژنوم عمل می کنند به واسطه سیستم ترمیم DNA از طریق شکست دو رشته ای ایجاد شده توسط Cas9 فعال می شوند (۱۳). که آلل های مورد هدف اغلب تغییرات اضافی مانند حذف، ادغام جزئی یا چندگانه پلاسمید هدف و حتی مضاعف سازی را

دارند (۱۴). اما فنـاوری مهندسـی ژنـوم CRISPR / Cas9 ابزار بسیار با ارزش را در اختیار محققان قرار داده است تـا تولید مدل های مختلف برای تحقیقات زیست پزشـکی در داخل بدن را تسریع کنند (۱۵،۱۶).

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شـده است. از تمامی کسانی که در این پروژه ما را یـاری کردنـد به ویژه آقای سعید بزرگ قمی تشکر می کنیم.

References

1. Aldenhoven M, van den Broek BTA, Wynn RF, O'Meara A, Veys P, Rovelli A, et al. Quality of life of Hurler syndrome patients after successful hematopoietic stem cell transplantation. Blood advances. 2017;1(24):42-2236.
2. Tatapudi R, Gunashekhar M, Raju PS. Mucopolysaccharidosis type I Hurler-Scheie syndrome: A rare case report. Contemporary clinical dentistry. 2011;2(1):8-66.
3. Beck M, Arn P, Giugliani R, Muenzer J, Okuyama T, Taylor J, et al. The natural history of MPS I: global perspectives from the MPS I Registry. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics. 2014;16(10):65-759.
4. Moore D, Connock MJ, Wraith E, Lavery C. The prevalence of and survival in Mucopolysaccharidosis I: Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes in the UK. Orphanet journal of rare diseases. 2008;3:24.
5. Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. Nature reviews Genetics. 2015;16(5):299-311.
6. Sun A. Lysosomal storage disease overview. Annals of translational medicine. 2018;6(24):476.
7. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics. 2011;188(4):82-773.
8. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. Nature reviews Molecular cell biology. 2013;14(1):49-55.
9. Chevalier BS, Stoddard BL. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic acids research. 2001;29(18):74-3757.
10. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. Nature reviews Genetics. 2016;17(5):12-300.
11. De Carvalho TG, da Silveira Matte U, Giugliani R, Baldo G. Genome editing: potential treatment for lysosomal storage diseases. Current Stem Cell Reports. 2015;1:9-15.
12. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols. 2013;8(11):308-2281.
13. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annual review of biochemistry. 2010;79:181-211.
14. Li J, Shou J, Guo Y, Tang Y, Wu Y, Jia Z, et al. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. Journal of molecular cell biology. 2015;7(4):98-284.
15. Qin W, Kutny PM, Maser RS, Dion SL, Lamont JD, Zhang Y, et al. Generating Mouse Models Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. Current protocols in mouse biology. 2016;6(1):39-66.
16. Reardon S. CRISPR gene-editing creates wave of exotic model organisms. Nature. 2019;568(7753):2-441.

Generation of IDUA knockout cell lines by CRISPR/Cas mediated genome editing

Hatami bardar A[1], Aziminejad M[2] , Jafarinia M[3] , Goodarzi H[3] , Majid Mojarad[4]
1- PhD students, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
2- Assistant professor, Department of Basic Medical Sciences, Neyshabour University of Medical Sciences, Neyshabour, Iran.
3- Assistant professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran.
4- Assistant professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, Mojaradm@mums.ac.ir

Received: *11 Nov 2020* Accepted: *14 Dec 2020*

Abstract

***Background*:** The hurler syndrome is the most common form of lysosomal storage diseases (LSDs). In the present experiment, we intended to generate an IDUA targeting CRISPR-Cas system and deactivate the target gene using it.

Materials and Methods: IUDA targeting sgRNA pair were cloned into the px335 plasmid and resulted plasmid identity was confirmed using restriction mapping. Recombinant plasmid was transfected into the human epithelial cell line, HEK-293. Mutated clones were screened by melting analysis and their mutation was characterized by Sanger sequencing.

Results: Analytical digestion and Sanger sequencing confirmed indel mutation induction in two clones in heterozygote and one clone in homozygote state.

Conclusion: In this study, we produced an IDUA knockout cell model using CRISPR-nCas9 system. This model can be used in the therapeutic approaches of this disease.

Keywords: Hurler syndrome, CRISPR-Cas, Gene knock out, IDUA

****Citation:*** Hatami bardar A, Aziminejad M, Jafarinia M, Goodarzi H, Majid Mojarad. Generation of IDUA knockout cell lines by CRISPR/Cas mediated genome editing.Yafte. 2021; 22(4):162-169.