

NGHIÊN CỨU CHỈNH SỬA GEN BẰNG HỆ THỐNG CRISPR/CAS9 TRONG DÒNG TẾ BÀO UNG THƯ

Vũ Thị Hà^{1,2,✉}, Bùi Tường An¹, Đoàn Thị Kim Phượng^{1,2}

¹Trường Đại học Y Hà Nội, ²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Hệ thống CRISPR/Cas9 là một trong những công cụ đem lại hiệu quả chỉnh sửa gen cao và có triển vọng trong ứng dụng lâm sàng. Với mục tiêu chỉnh sửa gen *RAPTOR* và *Atg5* trên dòng tế bào bạch cầu mạn tính dòng tủy K562 và tế bào ung thư não TGS04 bằng hệ thống CRISPR/Cas9, chúng tôi thiết kế hệ thống CRISPR/Cas9 bằng cách chèn đoạn trình tự đích vào plasmid PX330. Plasmid này được đưa vào tế bào đích bằng xung điện. Để đánh giá hiệu quả của quá trình chỉnh sửa gen chúng tôi sử dụng các kỹ thuật PCR, giải trình tự gen và Western blotting. Kết quả cho thấy CRISPR/Cas9 được thiết kế đã gây xóa exon3 trên gen *RAPTOR*; gây đột biến mất đoạn gen *Atg5* dẫn đến tăng rõ rệt mức độ biểu hiện của protein LC3I và giảm đáng kể mức độ biểu hiện của protein LC3II. Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra rằng hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa được các gen đích dẫn đến sự biến đổi protein và các sản phẩm trong con đường hoạt hóa gen.

Từ khóa: CRISPR/Cas9, liệu pháp gen, tế bào ung thư.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

CRISPR/Cas9 được viết tắt từ những chữ cái đầu của cụm Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats và CRISPR-associated (Cas) protein, là một hệ miễn dịch ở sinh vật nhân sơ giúp chúng có khả năng ghi nhớ và tạo miễn dịch với các yếu tố di truyền ngoại lai. Trình tự CRISPR lần đầu tiên được nhà khoa học Nhật Bản Yoshizumi Ishino và cộng sự tìm ra vào năm 1987 trên *E. coli* và nhiều vi khuẩn khác sau đó. Đến năm 2013 cơ chế hoạt động của CRISPR/enzym Cas được làm sáng tỏ và sử dụng trong các tế bào động vật có vú, đặt cơ sở cho việc áp dụng CRISPR / Cas9 như một công cụ chỉnh sửa bộ gen. Hoạt động của hệ CRISPR/Cas9 có sự tham gia của hai thành phần chính là Cas9 protein và đoạn dẫn RNA không mã hóa (được gọi là sgRNA). Phân tử sgRNA bắt cặp với trình tự của vùng

đệm spacer trên DNA đích mới xâm nhập và giúp protein Cas (CRISPR-associated) nhận ra và thực hiện cắt đứt, sửa chữa sợi DNA tại vùng bắt cặp. Kết quả là DNA có thể được sửa đổi nhanh hơn và dễ dàng hơn nhiều so với khả năng sử dụng các phương pháp chỉnh sửa gen trước đó.^{1,2} Trên thế giới, nhiều nghiên cứu đã sử dụng hệ thống này để sửa chữa DNA của bộ gen trên một số dòng tế bào ung thư hoặc trên tế bào gốc.³ Heckl D. và cộng sự, năm 2014, đã dùng hệ thống CRISPR/Cas9 tạo đột biến gây ung thư tủy bào ở chuột.⁴ Ở một nghiên cứu khác, Xue W. và cộng sự đã gây đột biến gen ung thư ở gan chuột với mục đích phá vỡ chức năng của gen ung thư.⁵ Tuy nhiên ở Việt Nam, những nghiên cứu về hệ thống CRISPR/Cas9 còn khá mới mẻ và chưa được sử dụng rộng rãi. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *RAPTOR* trên dòng tế bào ung thư máu và gen *Atg5* trên dòng tế bào ung thư não, đồng thời đánh giá hiệu quả của quá trình chỉnh sửa đó .

Tác giả liên hệ: Vũ Thị Hà,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: vuthiha@hmu.edu.vn.

Ngày nhận: 13/12/2019

Ngày được chấp nhận: 03/03/2020

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành tại: Bộ môn Y Sinh học – Di truyền, Trường ĐHY Hà Nội.

Thời gian nghiên cứu: 10/2018 - 10/2019

2. Thiết kế và sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9

Đoạn trình tự đích sgRNA thích hợp lựa chọn từ thư viện sgRNA6 gồm 20 pb được biến tính và chèn vào plasmid PX330 sau khi được cắt bởi enzym BbsI. Plasmid mang đoạn trình tự đích được đưa vào tế bào bằng xung điện (Amaya Mouse neural stem Nucleofector Kit, Lonza, Basel, Switzerland). Sử dụng đồng thời hai sgRNA đích trên vùng intron giữa exon2 với exon3 (GCCGAAATACAAATGAACGT) và vùng intron giữa exon3 với exon4 (GAAATTTACCACGGACTCCA) để gây xóa đoạn exon3 của gen *RAPTOR* trên dòng tế bào ung thư máu, hoặc một sgRNA trên gen *Atg5* (GGCCATCAATCGGAAACTCA) để gây đột biến gen *Atg5* trên dòng tế bào ung thư não.

3. Tạo đột biến trên các tế bào và nuôi cấy dòng tế bào

Sử dụng tế bào Leukemia mạn tính dòng tủy K562 và tế bào ung thư não TGS04 được cung cấp bởi giáo sư Atsushi Hirao, Trung tâm ung thư, trường Đại học Kanazawa, Nhật Bản. Tế bào ung thư máu và tế bào ung thư não được nuôi cấy trong môi trường RPMI (Sigma-

Aldrich) và DMEM/F12 (Wako) tương ứng.

4. Các kỹ thuật kiểm tra hiệu quả gây đột biến của hệ thống CRISPR/Cas9

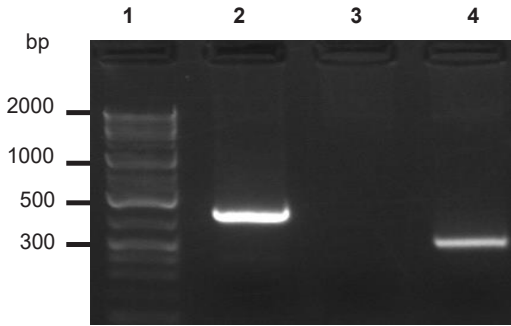
Tế bào sau khi gây đột biến được thu hoạch và khuếch đại vùng đột biến bằng kỹ thuật PCR với ba mỗi đồng thời. Sử dụng phần mềm primer3 để thiết kế các mồi trên vùng intron trước và sau exon3 của gen *RAPTOR* (Mồi xuôi: CTGGAACCCACTCTGAAAT, mồi ngược thứ nhất: CGATGGTTTCCAGAGCTTTC và mồi ngược thứ hai: CACACCCACCTTGTGAAGA). Sử dụng cặp mồi xuôi: GGCCATCAATCGGAAACTCA, và mồi ngược: TGAGTTTCCGATTGATGGCC cho kỹ thuật giải trình tự gen cho gen *Atg5*. Các sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra trên gel Agarose 2%. Protein của gen tương ứng được kiểm tra bằng kỹ thuật Western blotting với các kháng thể tương ứng ATG5 (Novusbio, Littleton, CO, USA, NB110 - 53818; 1:500), LC3 (NanoTools, Teningen, Germany; clone 5F10, 0231; 1:200), β - actin (Sigma - Aldrich A5441; 1:2000). Trình tự DNA hay trình tự mRNA được kiểm tra bằng kỹ thuật giải trình tự gen trên máy giải trình tự 3500 của Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific.

5. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu tuân thủ các quy định về đạo đức trong nghiên cứu y sinh. Các thí nghiệm trong nghiên cứu tuân thủ theo đúng các quy trình, quy tắc phòng thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ

1. Hệ thống CRISPR/Cas9 xóa hoàn toàn exon3 trên gen *RAPTOR*



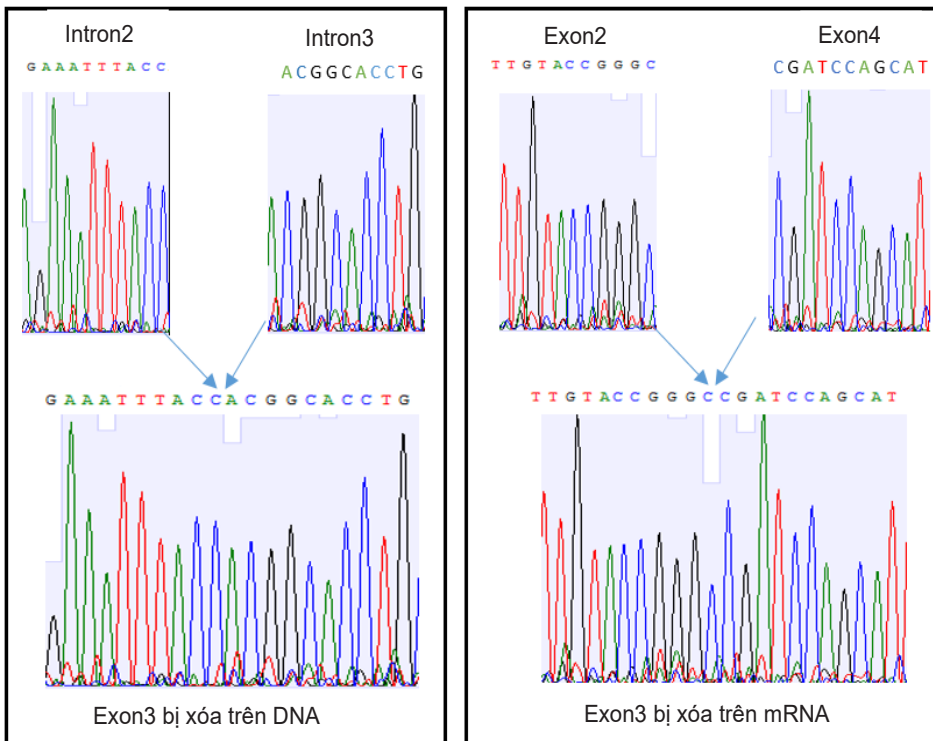
Hình 1. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR phát hiện xóa đoạn exon3 trên gen *RAPTOR*.

Cột 1- Thang chuẩn
 Cột 2- Tế bào K562 không gây đột biến
 Cột 3- Tế bào không ung thư
 Cột 4- Tế bào K562 gây đột biến.

(Hình 1) Cột 2: Xuất hiện băng exon3 ở tế bào không gây đột biến. Cột 3: không hiển thị sản phẩm PCR do kích thước của đoạn intron rất lớn, các cặp mồi không thể bắt cặp, do đó phản ứng PCR không xảy ra. Cột 4: xuất hiện băng đột biến chứng tỏ exon 3 bị xóa bỏ.

Để khẳng định thêm bằng chứng exon 3 bị xóa bỏ hoàn toàn, chúng tôi kiểm tra trình tự genome và trình tự mRNA của tế bào đột biến.

(Hình 2) A) Đoạn DNA nằm trong khoảng giữa hai sgRNA đích bao gồm cả exon 3 và một phần intron trước và sau exon 3 bị xóa bỏ. B) Trên mRNA, exon 3 bị xóa bỏ hoàn toàn, exon 2 và exon 4 kết nối lại với nhau.



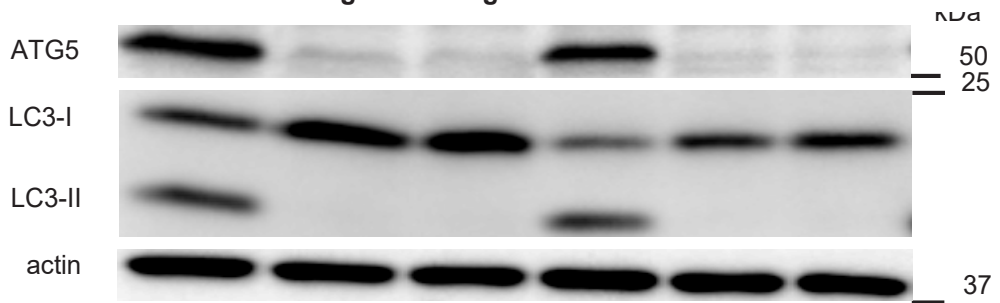
Hình 2. Kết quả giải trình tự DNA (A) và trình tự mRNA (B) của gen *RAPTOR* trên tế bào K562 bị gây đột biến.

2. CRISPR/Cas9 gây knockout gen Atg5 dẫn đến sự biến đổi protein và các sản phẩm trong con đường hoạt hóa của gen đó.

(Hình 3) Mẫu đột biến bị xóa các trình tự gen tương ứng với các axit amin K, L, M, E. Sự xóa đoạn gen *Atg5* được khẳng định bằng thí nghiệm kiểm tra sự biến đổi của các protein mà bị ảnh hưởng bởi gen này.

WT	AC	AGA	TTT	GAC	CAG	TTT	TGG	GCC	ATC	AAT	CGG	AAA	CTC	ATG	GAA	TAT	CCT	
	GCA	GAA	GAA	AAT														
	R	F	D	Q	F	W	A	I	N	R	K	L	M	E	Y	P	A	
E	E	N																
	GGA	TTT	CGT	TAT	ATC	CCC	TTT	AGA	ATA	TAT	CAG	G						
MT	AC	AGA	TTT	GAC	CAG	TTT	TGG	GCC	ATC	AAT	CGG	AAA	CTC	ATG	G	AA	TAT	CCT
	GCA	GAA	GAA	AAT														
	R	F	D	Q	F	W	A	I	N	R	K	L	M	E	N	I	L	
Q	K	K	M															
	GGA	TTT	CGT	TAT	ATC	CCC	TTT	AGA	ATA	TAT	CAG	G						

Hình 3. Kết quả giải trình tự gen Atg5 và các acid amin tương ứng bị đột biến trên dòng tế bào ung thư não



Hình 4. Hình ảnh xóa gen Atg5 trên dòng tế bào ung thư não TGS04. Mẫu đột biến được kiểm tra bằng Western blotting. Mẫu bình thường: 1, 4; Mẫu đột biến: 2,3,5,6

(Hình 4) Gen *Atg5* có vai trò hoạt hóa LC3I thành LC3II trong quá trình tự thực bào của tế bào. Nếu gen *Atg5* bị đột biến mất chức năng thì phân tử LC3I cũng không được kích hoạt thành LC3II, dẫn tới sự không hình thành LC3II. Hình 4 cho thấy ở mẫu đột biến, protein *Atg5* và LC3II biến mất hoàn toàn, đồng thời LC3I tăng lên đáng kể.

IV. BÀN LUẬN

Hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas9 đã được biết đến với hiệu quả cao chỉnh sửa gen, từ đó mở ra một ứng dụng vô cùng to lớn và hữu ích trong tương lai để nghiên cứu các chức năng gen và điều trị bệnh di truyền. So sánh với các kỹ thuật chỉnh sửa gen khác, thì hệ thống CRISPR/Cas9 cho chi phí sử dụng thấp, sử dụng đơn giản và dễ thực hiện. Nó không đòi hỏi phải thiết kế các phức hợp protein cũng như

các kỹ thuật liên quan khác như các kỹ thuật Meganucleases (MNs), Zinc Finger Nucleases (ZNFs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs).^{1,2} RAPTOR là một trong những thành phần cấu tạo nên gen mTOR – một gen quan trọng trong con đường hoạt hóa PI3K-mTOR tham gia nhiều hoạt động của tế bào.⁸ *Atg5* là một gen tham gia vào quá trình tự thực bào tế bào. Nghiên cứu của Ha và cộng

sự, năm 2018, cũng cho thấy dòng tế bào ung thư não bị đột biến gen *Atg5* kết hợp với một số thuốc chống ung thư, kết quả điều trị có hiệu quả rõ rệt so với dòng tế bào không bị đột biến.⁹ Nhiều nghiên cứu gần đây đã chỉ ra vai trò quan trọng của những gen này trong tế bào ung thư, và đột biến gen này có thể đưa lại hiệu quả điều trị khác biệt rõ rệt trong ung thư máu và ung thư não.⁸⁻¹⁰

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra hệ thống CRISPR/Cas9 có thể xóa hoàn toàn exon3 trên gen RAPTOR bằng cách sử dụng hai sgRNA đích khác nhau trên những vùng khác nhau của gen. Thí nghiệm tương tự với exon4 và một số exon khác, cũng cho hiệu quả xóa đoạn tương tự. Như vậy, với việc sử dụng đồng thời hai hay nhiều sgRNA đích trên cùng một gen hoặc trên các gen khác nhau, chúng ta có thể xóa bỏ một exon hoặc nhiều exon, xóa bỏ một hoặc nhiều gen mong muốn khác nhau. Điều này mở ra khả năng mới trong nghiên cứu về những rối loạn mang tính chất đa gen phức tạp.³

Nghiên cứu này cũng đã tạo ra một hệ thống CRISPR/Cas9 gây xóa gen *Atg5* dẫn đến thay đổi mức độ biểu hiện protein tương ứng. Điều đó chứng tỏ rằng CRISPR/Cas9 có khả năng xóa hoàn toàn chức năng của gen, làm biến đổi các sản phẩm protein trong con đường hoạt hóa của chúng. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng CRISPR/Cas9 có thể gây nhiều dạng đột biến khác nhau như đột biến điểm với sự mất, hoặc thêm một nucleotide, hoặc xóa bỏ một hay nhiều gen, và có thể là sự sắp xếp lại cấu trúc nhiễm sắc thể. Ứng dụng khả năng gây đột biến đa gen của hệ thống CRISPR/Cas9, Heckl và cộng sự đã gây đột biến đồng thời 5 gen trong tế bào gốc tạo máu chuột để tạo ra mô hình bệnh bạch cầu tủy cấp tính. Tương tự như vậy, nhiều tác giả đã sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để bất hoạt hai hoặc nhiều gen ức chế khối u trong ung thư gan, phổi ở trên chuột.^{4,5,11} Với nhiều kết quả nghiên cứu

khả quan về hiệu quả chỉnh sửa gen, hiện nay hệ thống CRISPR/Cas9 đã và đang được thử nghiệm lâm sàng, đặc biệt là trong trị liệu gen và liệu pháp điều trị miễn dịch ung thư.^{2,9,10}

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra được hiệu quả gây đột biến gen RAPTOR và *Atg5* trên dòng tế bào ung thư máu và ung thư não bằng hệ thống CRISPR/Cas9. Hiệu quả gây đột biến này biểu hiện ở cả ba mức độ gen, mRNA và protein.

Trong tương lai chúng tôi tiếp tục ứng dụng khả năng gây đột biến đa gen của hệ thống này để đồng thời knockout hai hay nhiều gen không mong muốn, ứng dụng trong liệu pháp gen và liệu pháp miễn dịch trên lâm sàng, đặc biệt là trên bệnh ung thư và bệnh di truyền.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Bộ môn Y Sinh học – Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội, Trung tâm Tư vấn Di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà nội và sự giúp đỡ của giáo sư Atsushi Hirao, Trung tâm Ung thư, Đại học Kanazawa, Nhật Bản đã cung cấp các nguồn vật liệu cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gaj T, Sirk SJ, Shui S-L, Liu J. Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(12):a023754. doi:10.1101/cshperspect.a023754
2. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096. doi:10.1126/science.1258096
3. Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* 2013;339(6121):819-823. doi:10.1126/science.1231143

4. Heckl D, Kowalczyk MS, Yudovich D, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32(9):941-946. doi:10.1038/nbt.2951
5. Xue W, Chen S, Yin H, et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature.* 2014;514(7522):380-384. doi:10.1038/nature13589
6. Wang T, Birsoy K, Hughes NW, et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science.* 2015;350(6264):1096. doi:10.1126/science.aac7041
7. Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF- β Signaling Maintains Tumorigenicity of Glioma-Initiating Cells through Sry-Related HMG-Box Factors. *Cell Stem Cell.* 2009;5(5):504-514. doi:10.1016/j.stem.2009.08.018
8. Earwaker P, Anderson C, Willenbrock F, Harris AL, Protheroe AS, Macaulay VM. RAPTORG up-regulation contributes to resistance of renal cancer cells to PI3K-mTOR inhibition. *PLoS One.* 2018;13(2):e0191890-e0191890. doi:10.1371/journal.pone.0191890
9. Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, et al. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. *Cancer Sci.* 2018;109(8):2497-2508. doi:10.1111/cas.13695
10. Ghosh J, Kapur R. Regulation of Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Leukemia Maintenance by the PI3K-mTORC1 Pathway. *Curr Stem Cell Rep.* 2016;2(4):368-378. doi:10.1007/s40778-016-0067-z
11. Platt RJ, Chen S, Zhou Y, et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell.* 2014;159(2):440-455. doi:10.1016/j.cell.2014.09.014

Summary

A STUDY ON GENE EDITING BY CRISPR/CAS9 SYSTEM IN CANCER CELL LINE

CRISPR/Cas9 system is one of the most high efficiency tool that could allow for clinical utilization to editing the gene of interest. The aim of study is editing *RAPTOR* and *Atg5* gene on chronic myeloid leukemia cell line K562 and human glioma cell line TGS04 by using CRISPR/Cas9 system. The targeted sequences of sgRNA were designed and inserted into the pX330 plasmid. The pX330- inserted target sgRNA plasmids were transfected to targeted cells by electroporation. *RAPTOR* and *Atg5* gene disruption were confirmed by PCR, sequencing and Western blotting. The results showed that CRISPR/Cas9 system could delete exon3 on *RAPTOR* gene; knockout *Atg5* gene consequently significantly simultaneously increase and decrease protein expression levels of LC3I and LC3II. Therefore, CRISPR/Cas9 system could edit gene of interest resulting in alteration of proteins and other products in their pathway.

Keywords: CRISPR/Cas9, gene therapy, cancer cell line.