

NGHIÊN CỨU CHỈNH SỬA GEN TRÊN TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU BẰNG HỆ THỐNG CRISPR/CAS9

Vũ Thị Hà^{1,✉}, Đoàn Thị Kim Phượng¹, Lương Thị Lan Anh¹, Nguyễn Văn Long²
Bạch Huy Anh², Đào Ngọc Bắc¹, Trần Thị Huyền Trang¹
Nguyễn Việt Trung¹, Trần Đức Phấn¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Bưu Điện

Tế bào gốc tạo máu là tế bào hứa hẹn nhiều tiềm năng ứng dụng lâm sàng cho điều trị các bệnh về máu cũng như một số bệnh lý ung thư, tự miễn nói chung. Thu thập, chỉnh sửa gen ở tế bào gốc, nuôi cấy, tăng sinh tế bào gốc làm tiền đề cho các nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng còn là thách thức của y học. Hệ thống *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* và *CRISPR-associated protein* là công cụ đem lại hiệu quả chỉnh sửa gen cao và có triển vọng trong ứng dụng lâm sàng nhằm kiểm soát các gen quan tâm. Các tế bào gốc từ tế bào máu cuống rốn được thu thập với marker bề mặt CD34+CD38-bằng hệ thống máy đếm dòng chảy tế bào, gây đột biến gen đích bằng hệ thống trên, chỉnh sửa gen theo mục tiêu, nuôi cấy tăng sinh dòng tế bào đột biến. Kết quả thu được tỷ lệ tế bào gốc tạo máu từ máu cuống rốn là 0,3%. Khả năng gây đột biến trên gen *Spre1* của hệ thống *CRISPR/Cas9* xảy ra ở cả mức độ DNA và protein. Các tế bào gốc sau chỉnh sửa có khả năng tăng sinh và biệt hóa thành các dòng tế bào. Nghiên cứu đã thành công trong việc thu thập tế bào gốc, các tế bào gốc sau khi được chỉnh sửa gen đích tăng sinh, biệt hóa thành các dòng tế bào độc lập và trở thành tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Tế bào gốc tạo máu, CRISPR/Cas9, liệu pháp gene, tế bào máu cuống rốn.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tạo máu là quá trình hình thành hàng tỷ tế bào máu trưởng thành từ một quần thể nhỏ tế bào gốc. Các tế bào gốc này có khả năng tự đổi mới và biệt hóa thành các dòng tế bào máu đảm nhiệm các chức năng và vai trò khác nhau trong cơ thể. Máu cuống rốn là nguồn dồi dào tế bào gốc, có khả năng thay thế cho tế bào gốc từ tủy xương hay ở máu ngoại vi. Tuy nhiên, khả năng nuôi cấy tế bào gốc ở môi trường *in vitro* vẫn còn gặp nhiều khó khăn khiến cho nó là một thách thức lớn trong việc ứng dụng trên lâm sàng.¹ Hơn nữa, trong việc ứng dụng liệu pháp tế bào gốc, để tạo ra dòng tế bào như

mong muốn, cần tiến hành chỉnh sửa gen mục tiêu; nhưng tế bào gốc với khả năng tự sửa sai sẽ khiến cho việc duy trì dòng tế bào đã biến đổi gen không hề dễ dàng.

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. 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

Tác giả liên hệ: Vũ Thị Hà

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: vuthiha@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 07/11/2022

Ngày được chấp nhận: 20/12/2022

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. Kỹ thuật chỉnh sửa gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 gần đây đã nổi lên như một công cụ tiềm năng mạnh mẽ không chỉ trong các liệu pháp điều trị ung thư mà còn được áp dụng trong liệu pháp tế bào gốc nhờ tính hiệu quả và độ chính xác cao của nó.²⁻⁴ Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu thu thập, chỉnh sửa gen theo mục tiêu, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc tạo máu bằng hệ thống CRISPR/Cas9 và đánh giá hiệu quả của việc ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen trên tế bào gốc tạo máu.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

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

Đoạn trình tự đích của sgRNA bao gồm 20pb (ACCCGAGATGACTCAAGTGG) được tổng hợp, biến tính và chèn vào plasmid PX330. Plasmid mang đoạn trình tự đích được đưa vào tế bào bằng xung điện (Amaza Mouse neural stem Nucleofector Kit, Lonza, Basel, Switzerland). SgRNA đích được thiết kế trên vùng exon 2 của gen *Spred1*.

2. Thu thập tế bào gốc và nuôi cấy tế bào gốc

Các tế bào gốc tạo máu với hai marker bề mặt là CD34 và CD38 (CD34+CD38-) được thu thập trực tiếp từ tế bào máu cuống rốn từ trẻ sơ sinh có nhu cầu lưu trữ tế bào máu cuống rốn tại Trung tâm Tế bào gốc và Di truyền,

Bệnh viện Bưu Điện. Tế bào gốc sau khi thu thập bằng máy đếm dòng chảy tế bào (Flow Cytometry-Novocyte USA) được nuôi cấy trong môi trường StemSpan (Stemcell Technologies) và bổ sung thêm một số cytokine.

3. Quy trình kỹ thuật gây đột biến của hệ thống CRISPR/Cas9 và kiểm tra đột biến trên tế bào gốc

Tế bào gốc sau khi được thu thập được nuôi cấy 24h và gây đột biến bằng hệ thống CRISPR/Cas9 với xung điện. Tế bào được nuôi cấy để tăng sinh, biệt hóa thành các dòng tế bào trong khoảng 12 - 14 ngày. Tất cả các dòng được thu thập ngẫu nhiên để đánh giá hiệu quả gây đột biến. Hiệu quả gây đột biến trên các dòng được kiểm tra ở mức độ DNA bằng kỹ thuật giải trình tự gen với trình tự mỗi xuôi ATTTGCCTCTGGGATCCTT, và mức độ biến đổi protein bằng kỹ thuật Westernblotting.

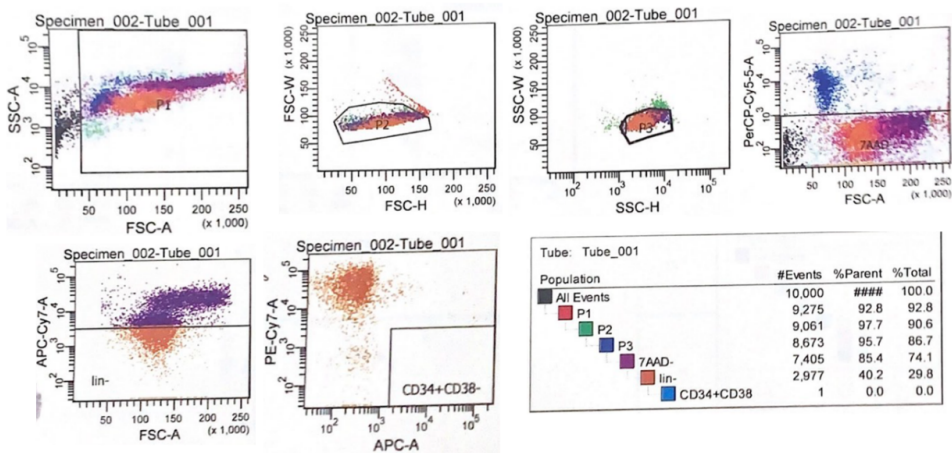
4. Đạo đức nghiên cứu

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. Đặc điểm tế bào gốc với CD34+CD38- được tách từ tế bào máu cuống rốn.

Hình ảnh và các bước thu thập tế bào gốc với marker bề mặt CD34+CD38- bằng máy đếm dòng chảy tế bào được thể hiện ở hình 1.



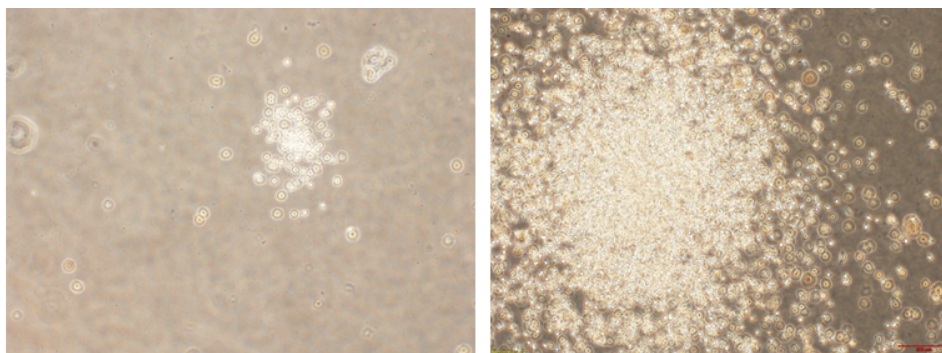
Hình 1. Tế bào gốc tạo máu được thu bằng Flow cytometry dựa vào marker bề mặt CD34 và CD38

Bảng 1. So sánh số lượng tế bào và tỷ lệ sống giữa tế bào đơn nhân và tế bào gốc

Loại tế bào	Số lượng TB/mL	Tỷ lệ sống %
Tế bào đơn nhân ban đầu	$1,3 \times 10^7 \pm 132$	$89\% \pm 3$
Tế bào gốc với CD34+ CD38-	$4 \times 10^4 \pm 34$	100%

Các tế bào đơn nhân trong mẫu máu cuống rốn được nhuộm với marker bề mặt là CD34 và CD38, các tế bào gốc có CD34+ và CD38- sẽ được thu thập bằng hệ thống máy đếm dòng chảy tế bào. Tổng số tế bào đơn nhân trong mỗi ml máu cuống rốn trung bình là $1,3 \times 10^7 \pm 132$, với tỷ lệ sống là $89\% \pm 3$, tổng số tế bào gốc với CD34+CD38- là $4 \times 10^4 \pm 34$, chiếm tỷ lệ trung bình là 0,3%.

Các tế bào gốc sau thu thập sẽ được gây đột biến trên gen đích Spred1 bằng hệ thống CRISPR/Cas9 với xung điện. Sau khi gây đột biến, các tế bào gốc tiếp tục được nuôi cấy, tăng sinh trong môi trường dịch keo có bổ sung một số cytokin cần thiết. Khả năng tăng sinh, biệt hóa thành các dòng tế bào của tế bào gốc sau chỉnh sửa trong môi trường dịch keo được đánh giá bằng các hình ảnh clone



Ngày thứ 5

Ngày thứ 14

Hình 2. Hình ảnh tế bào gốc tạo máu tăng sinh thành các dòng (Clone) sau khi nuôi cấy và gây đột biến bằng CRISPR/Cas9

Tại ngày thứ 5 (hình bên trái), số lượng tế bào gốc tương đối ít tuy nhiên vẫn tạo thành các cụm quan sát được trên kính hiển vi. Tại

ngày thứ 14 (hình bên phải), từ cụm có kích thước nhỏ ban đầu, tế bào gốc tăng sinh về mặt số lượng và tạo thành cụm có kích thước lớn.

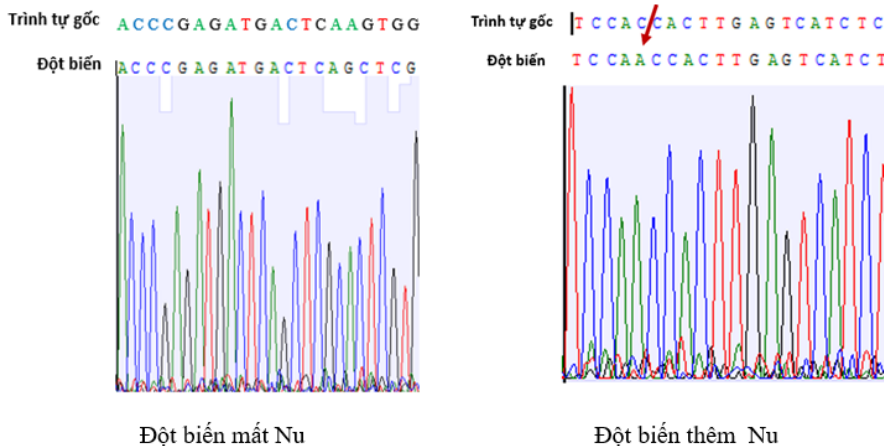
2. CRISPR/Cas9 gây knockout gen *Spred1* dẫn đến sự biến đổi gen, protein và các sản phẩm trong con đường hoạt hóa của gen đó

Bảng 2. Kết quả giải trình tự gen của một số dòng tế bào gốc

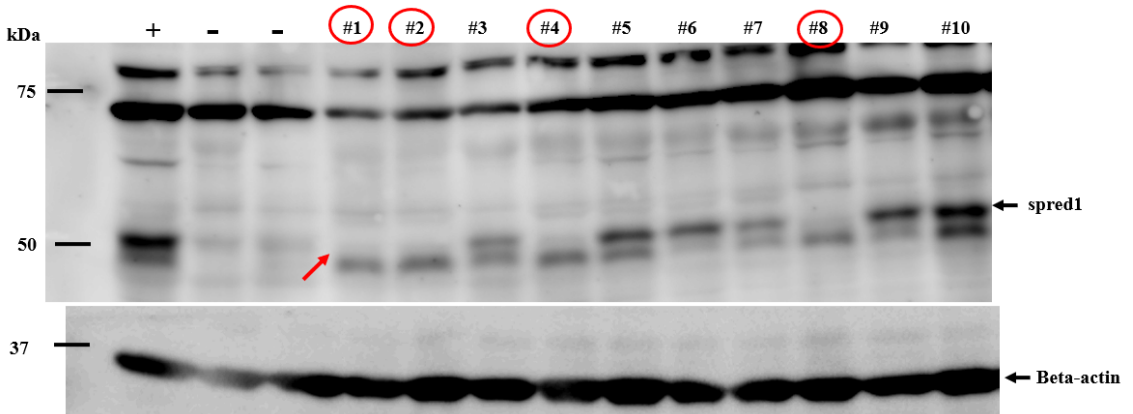
Đơn dòng	Trình tự sg-RNA <i>spred1</i>	Phân loại đột biến
Wild type	ACCCGAGATGACTCAAGTGG	
1	ACCCTAGATGAC.....TGG	Mất nhiều Nucleotid
2	ACCCGAGATGAC.....TGG	Mất nhiều Nucleotid
3	ACCCGAGATGACTCATGTGG	Thay thế một Nu
4	ACCCGAGATGA.....G	Mất nhiều Nucleotid
5	ACCCGAGATGACTCAAGATGG	Thay thế một Nu
6	ACCCGAGATGGTTACCACTTGG	Thay thế nhiều Nu
7	ACCCGAGATGACTCAAGA.TGG	Mất một Nu
8	ACCCGAGATGAC.....TGG	Mất nhiều Nucleotid
9	ACCCGAGATGACTTGGTGGATGG	Thay thế nhiều Nu
10	ACCCGAGATGACTCAAGATGG	Thêm một Nu

Dưới tác động của hệ thống CRISPR/Cas9, các tế bào gốc ban đầu bị gây đột biến gen đích (gen *Spred1*) theo nhiều hướng khác nhau. Sau đó các tế bào gốc tăng sinh và biệt hóa tạo

thành các clone khác nhau. Kết quả giải trình tự gen từ các clone ở bảng trên chỉ ra các dạng đột biến khác nhau của tế bào gốc.



Hình 3. Hình ảnh minh họa cho đột biến gen *Spred1* dưới tác động chỉnh sửa của hệ thống CRISPR/Cas9



Hình 4. Kết quả westernblotting kiểm tra sản phẩm protein của gen *Spred1* sau đột biến

Chú thích:

Cột 1 là mẫu chứng dương, cột 2, 3 là mẫu chứng âm; các cột khác là các clone khác nhau.

Trong hình ảnh trên, sản phẩm protein của gen *Spred1* bị biến mất ở một số clone (#1, #2, #4, #8), nhưng một số clone thì vẫn còn (#3, #5, #6, #7, #9, #10). Điều đó chứng tỏ sự biến đổi trên gen *Spred1* có thể là đột biến làm ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein dẫn đến giảm hoặc thiếu hụt sản phẩm protein của gen đó, bên cạnh đó cũng có các đột biến trên gen nhưng không làm thay đổi sản phẩm protein.

IV. BÀN LUẬN

Máu cuống rốn ở người là nơi cung cấp nguồn tế bào gốc tạo máu dồi dào; không giống như tế bào gốc tủy xương, thu thập tế bào gốc máu cuống rốn ít xâm lấn, thuận tiện và đơn giản. Ngoài ra, các tế bào gốc từ máu cuống rốn còn có khả năng biệt hóa thành các dòng tế bào khác nhau, giúp thúc đẩy quá trình sửa chữa mô, điều hòa các phản ứng miễn dịch và chống lại ung thư.⁵

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 (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs).⁴ Gen *Spred1* nằm trên nhiễm sắc thể số 15q13.2 và mã hóa cho phân tử protein cùng tên có vai trò điều hòa ngược âm tính với con đường tín hiệu Ras/MAPK. Con đường Ras/MAPK tham gia vào quá trình tăng trưởng và phân chia của tế bào, quá trình biệt hóa tế bào và quá trình chết theo chương trình. Protein *Spred1* gắn với sản phẩm do gen *Raf* – một thành viên của con đường trên, qua đó làm bất hoạt protein *Raf*, ức chế phần còn lại của con đường Ras/MAPK và cho kết quả cuối cùng là giảm quá trình phân chia và biệt hóa tế bào.⁶⁻⁸ Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, hệ thống CRISPR/Cas9 có hiệu quả trong việc gây đột biến ở gen *Spred1* với bằng chứng ở kết quả giải trình tự gen, kết quả Western-blotting và thậm chí ở mức độ tế bào khi bất hoạt *Spred1* làm mất đi chất ức chế con đường tăng sinh tế bào, góp phần vào sự thành công của nuôi cấy tế bào gốc. Vai trò đó cũng đã được khẳng định trong một số nghiên cứu trước đây thông qua việc gây đột biến xóa gen *Spred1*

bằng hệ thống CRISPR/Cas9.⁸

Nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra CRISPR/Cas9 có thể gây ra các kiểu đột biến rất đa dạng trên gen *Spred1* ở tế bào gốc từ thay thế nucleotide, thêm một nucleotide, đến xóa một đoạn trình tự nucleotide hoặc kết hợp giữa các dạng trên. Các tế bào gốc sau khi được chỉnh sửa gen vẫn tiếp tục tăng sinh, biệt hóa, tạo các dòng. Như vậy, việc ứng dụng CRISPR/Cas9 trong việc điều chỉnh gen ở trên tế bào gốc là khả thi và đem lại hiệu quả rõ ràng. Điều này mở ra khả năng mới trong nghiên cứu về việc sử dụng công cụ này trong việc khám phá chức năng của các gen liên quan đến quá trình tạo máu, cũng như sửa lỗi ở một số bệnh lý đột biến gen ở tế bào gốc tạo máu như tế bào hồng cầu hình liềm, β -thalassemia và bệnh thiếu hụt miễn dịch bẩm sinh.⁷

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã thành công trong việc thu thập, chỉnh sửa gen *Spred1*, nuôi cấy tăng sinh tế bào gốc tạo máu từ máu cuống rốn, qua đó hứa hẹn tiềm năng rộng mở cho việc ứng dụng liệu pháp tế bào gốc trong điều trị trên lâm sàng. Ngoài ra, nghiên cứu cũng cho thấy khả năng chỉnh sửa gen qua hệ thống CRISPR/Cas9 trên tế bào gốc là khả thi. Hiệu quả gây đột biến này biểu hiện ở mức độ gen, protein và tế bào. Trong tương lai, chúng tôi tiếp tục ứng dụng tiềm năng của tế bào gốc và khả năng gây đột biến gen đa dạng của hệ thống này để đồng thời knockout hai hay nhiều gen không mong muốn, ứng dụng trong liệu pháp gen và liệu pháp tế bào gốc trên lâm sàng, đặc biệt là trên bệnh về máu, 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 Di truyền – Tế bào gốc,

Bệnh viện Bưu Điện 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. Yao CL, Hwang SM. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells from human cord blood in serum-free conditions. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2007; 407: 165-175. doi: 10.1007/978-1-59745-536-7_13.
2. Gundry MC, Brunetti L, Lin A, Mayle AE, Kitano A, Wagner D, Hsu JI, Hoegenauer KA, Rooney CM, Goodell MA, Nakada D. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep*. 2016 Oct 25; 17(5): 1453-1461. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.092. PMID: 27783956; PMCID: PMC5087995.
3. Ferrari Samuele, Vavassori Valentina, et al. Gene Editing of Hematopoietic Stem Cells: Hopes and Hurdles Toward Clinical Translation. *Frontiers in Genome Editing*. 2021; (3):10.3389/fgeed.2021.618378. 2673-3439.
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. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant*. 2015; 24(3): 339-347. doi: 10.3727/096368915X686841.
6. Pasmant E, Gilbert-Dussardier B, Petit A, et al. SPRED1, a RAS MAPK pathway inhibitor that causes Legius syndrome, is a tumour suppressor downregulated in paediatric acute myeloblastic leukaemia. *Oncogene*. 2015; 34(5): 631-638. doi: 10.1038/onc.2013.587.

7. Bak RO, Dever DP, Porteus MH. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nat Protoc.* 2018; 13(2): 358-376. doi: 10.1038/nprot.2017.143.

8. Tadokoro Y., Hirao A, et al. Spred1

Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. *Cell Stem Cell.* 2018 May 3; 22(5): 713-725.e8. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.002. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29706577.

Summary

A STUDY ON GENE EDITING BY CRISPR/CAS9 SYSTEM IN HEMATOPOIETIC STEM CELL

Hematopoietic stem cells are cells with many potential clinical applications for the treatment of blood diseases as well as cancers and autoimmune diseases treatment in general. Collecting, editing genes in stem cells, culturing, and proliferating stem cells as a premise for clinical trials are still a challenge of medicine. The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein system is a highly efficient and promising gene editing tool for clinical application to control genes of interest. Stem cells are collected based on surface marker CD34+CD38- by flow cytometry system, targeted gene editing, mutated clone were cultured and proliferated through the aforementioned system. Result showed that ratio of hematopoietic stem cell in the cord blood cell were 0.3%. The efficiency of Spred1 editing by CRISPR/Cas9 system occurred at the DNA and protein level. The research has successfully collected stem cells, stem cells after being edited with target genes proliferate, differentiate into independent cell lines and become a premise for further studies.

Keywords: Hematopoietic stem cell, CRISPR/Cas9, gene therapy, human cord blood cell.