

Wilma Wadman

Gene expression editing in myeloma cell lines using CRISPR/Cas9 technique

Bachelor's thesis in Biomedical Laboratory Science

Supervisor: Toril Holien

Co-supervisor: Ingrid Quist-Løkken

June 2023

Wilma Wadman

Gene expression editing in myeloma cell lines using CRISPR/Cas9 technique

Bachelor's thesis in Biomedical Laboratory Science
Supervisor: Toril Holien
Co-supervisor: Ingrid Quist-Løkken
June 2023

Norwegian University of Science and Technology
Faculty of Natural Sciences
Department of Biomedical Laboratory Science



Abstract

Multiple myeloma or myeloma is a bone marrow cancer which characterizes by uncontrolled proliferation of mutant plasma cells. It is a disease that claims many lives every year, mostly due to the absence of curative treatment. Finding a suitable treatment is therefore of great importance. One way to study different diseases is to use a gene editing method for knockdown or knockout of different genes. In this project CRISPR/Cas9 was used to knockout the two genes *BMPRI1A* and *BMPRI1B* in the three different myeloma cell lines KJON, INA-6 and IH-1. Six guide RNAs were designed and ligated into pLentiCRISPRv2. The amount of plasmid was amplified by transformation of *Escherichia coli*. To check the quality of the plasmids, PCR, gel electrophoresis and Sanger sequencing was performed. The results from the gel electrophoresis showed that nine of the twelve samples for *BMPRI1A* and seven of the thirteen samples for *BMPRI1B*, that were tested, were positive. The results from the Sanger sequencing showed that all guides that were tested (*BMPRI1A* 3.2.3, *BMPRI1A* 4.2.2, *BMPRI1B* 1.1.4 and *BMPRI1B* 2.1.2), were properly ligated into the plasmids. The main aim of this project, to design guide RNA for the CRISPR/Cas9 method, was met but due to limited time the project could not be completed to the extent that it was originally intended. Therefore no results or conclusions could be drawn regarding the functions of *BMPRI1A* and *BMPRI1B*.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Multipelt myelom eller myelom är en benmärgscancer som drabbar de vita blodkropparna. Myelom är en sjukdom som skördar många liv varje år, framför allt då det idag inte finns någon botande behandling. Därav är det av stort intresse att försöka utveckla nya potentiella behandlingar. Ett sätt att ta reda på mer om sjukdomar är att använda olika genmodifieringstekniker, så som gensaxen CRISPR/Cas9, för att studera funktionen av olika gener. Syftet med det här projektet var att ta reda på mer kring de två generna *BMPRI1A* och *BMPRI2* genom att försöka stänga av dessa med hjälp av CRISPR/Cas9 i tre olika myelomcellinjer. Korta sekvenser som kallas RNA-guider designades och sattes därefter in i plasmider (cirkulärt DNA). För att framställa mycket plasmid satts det in i bakterier, i en process som kallas transformering. För att kontrollera om RNA-guiderna var insatta korrekt i plasmiderna utfördes PCR och gelelektrofores, där produkterna från PCR:en separeras efter storlek på en gel. För att verifiera att plasmiderna var som de skulle sekvenserades dem, det vill säga ordningsföljden av kvävebaserna i DNA:t bestämdes. Resultatet av gelelektroforesen visade att sexton av de tjugofem prover som testades var positiva (nio/tolv för genen *BMPRI1A* och sju/tretton för genen *BMPRI2*). Det vill säga att dessa verkade ha rätt storlek. Sekvenseringen visade att RNA-guiderna var insatta korrekt i alla fyra prover som testades. Projektets syfte att designa RNA-guider till CRISPR/Cas9-metoden uppfylldes men på grund av begränsad tid kunde inga resultat fås eller slutsatser dras kring funktionerna av *BMPRI1A* och *BMPRI2*.

Nyckelord

BMPRI1A, *BMPRI2*, bone morphogenetic protein, gene knockout, multiple myeloma

Introduktion

Myelom

Multipelt myelom eller myelom är en cancerform som utgår från benmärgen och karaktäriseras av okontrollerad proliferation av muterade plasmaceller. Personer med myelom kan både vara asymtomatiska och symtomatiska, med typiska symtom så som bland annat skelettmärta, patologiska frakturer, anemi, hyperkalcemi, återkommande infektioner, njursvikt och onormala blödningar. Enligt The Global Cancer Observatory (GCO) diagnostiserades 176 404 människor med myelom 2020, och 117 077 avled av sjukdomen under samma år¹. Det är oklart varför dessa personer drabbas av myelom, men ålder, kön, etnicitet, familjehistoria, strålningsexponering och genmutationer verkar vara faktorer som spelar in. Studier har visat att kromosomdeletionen del(17p) och kromosomtranslokationen t(4;14) ökar risken för dålig prognos. Chretien et al. undersökte huruvida del(17p) och t(4;14), i kombination med onormalt antal kromosomer (trisomier och hyperdiploid), påverkade överlevnaden hos myelompatienter (1). Deras studie visade att trisomi 3 och/eller 5 gav patienter med samtidig del(17p) eller t(4;14) bättre prognos. Däremot visade sig trisomi 21 ge patienterna sämre överlevnadsprognos.

Som tidigare nämnts skördar myelom många liva varje år, framför allt för att det inte finns någon kurativ behandling. De palliativa behandlingsmöjligheterna idag är läkemedelsbehandling, med bland annat kortison, cytostatika, proteasomhämmare, immunmodulerare, bisfosfonater och Daratumumab, men även med autolog stamcellstransplantation, allogena stamcellstransplantation och strålbehandling.

CRISPR/Cas9

”Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”/”CRISPR associated protein 9” (CRISPR/Cas9) har fått stor uppmärksamhet de senaste åren, kanske främst efter att 2020 års nobelpris i kemi delades ut till Emmanuelle Charpentier och Jennifer Doudna för deras upptäckt av CRISPR/Cas9 - gensaxen. Men redan 1987 upptäcktes repeterande sekvenser i *Escherichia coli*, av Yoshizumi Ishino et al., som senare fick namnet CRISPR (2). CRISPR/Cas9 är en naturlig försvarsmekanism hos vissa bakterier och arkéer (3). Det fungerar som ett adaptivt immunsystem, där delar av främmande genom (ca 20–30 bp) sparas i en lång, dubbelsträngad sekvens, kallad ”CRISPR array”. Detta sker med hjälp av ett

¹ 35-Multiple-myeloma-fact-sheet.pdf [Internet]. [citerad 09 april 2023]. Tillgänglig vid: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/35-Multiple-myeloma-fact-sheet.pdf>

komplex av Cas1 och Cas2, och dessa främmande sekvenser som sparas kallas då för ”spacers” (4). Mellan dessa ”spacer”-sekvenser finns kortare, repeterande sekvenser. ”CRISPR array” transkriberas till RNA, som då kallas prekursor crRNA (pre-crRNA). Transaktiverande CRISPR-RNA (tracrRNA) är komplementärt till, och därmed binder till, de repeterande sekvenserna i RNA:t. RNase III klyver därefter RNA:t, till kortare sekvenser som kallas guide-RNA (gRNA), vilka binds till Cas9-enzymet (5). Det här nya ”komplexet”, bestående av gRNA och Cas9, gör det möjligt för organismen att känna igen och oskadliggöra genom från samma patogen vid ett framtida angrepp. De här nya kunskaperna har gett oss möjligheten för att själva kunna bestämma var i genomet vi vill att Cas9 ska klippa, genom att designa gRNA-sekvensen så att den är komplementär till målsekvensen. Detta ”nya” verktyg låter oss genmodifiera olika organismer och ta reda på mer om hur exempelvis olika sjukdomar uppkommer, och kanske även hur vi ska bota dem.

Benmorfogenetiska proteiner (BMP) och BMP-receptorer (BMPR)

Benmorfogenetiska proteiner (BMP) är cytokiner som tillhör ”transforming growth factor beta” (TGF- β)-familjen och är involverade i ett flertal processer, så som embryogenes, hematopoes, neurogenes och osteogenes. Det har även visats att BMP både är tumörfrämjande och tillväxthämmande i olika typer av cancer. Detta åstadkoms genom att BMP binder till ett komplex av BMP-receptor typ I (ALK1, ALK2, BMPR1A eller BMPR1B) och BMP-receptor typ II (BMPR2, ACVR2A eller ACVR2B) på cellytan. Detta leder till en aktivering av SMAD-signaleringsvägen, vilket i sin tur kan reglera transkriptionen av olika gener och påverka tillväxt och överlevnad av cellen (6). Tidigare forskning tyder på att BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-9 och BMP-10 även hämmar växt och överlevnad av myelomceller, men mekanismen bakom detta är inte helt klarlagt (7–11).

Syfte

Syftet med denna delstudie var att designa och använda CRISPR/Cas9-teknik för att slå ut generna *BMPR1A* och *BMPR2* i myelomcellinjer. Detta för att kunna studera uttrycket och betydelsen av dessa. Ytterligare syfte med projektet var att behandla cellerna med olika ligander från TGF- β -familjen och se huruvida dessa kan aktivera SMAD-transkriptionsfaktorer, och därmed inducera apoptos. På grund av tidsbrist hanns detta dock inte med i denna studie. Det långsiktiga målet med huvudprojektet var att undersöka nya potentiella behandlingsmöjligheter för patienter med myelom.

Tidigare studie har visat att vid nedreglering av uttrycket av BMPR2, med kort hårnåls-RNA (shRNA), verkar BMP som binder typ I-receptorn ALK2 bättre. Detta tyder på att BMPR2 hämmar inbindning av BMP till BMP-receptor typ I (11). Den här studien ville verifiera detta genom att helt slå ut genen för BMPR2. Vidare ville det undersökas vilka BMP som binder BMPR1A och därigenom aktiverar SMAD1/5/8.

Material och metod

Material:

Studiematerial

I denna studie användes tre olika humana myelomcellinjer: KJON (12) och IH-1 (13) som upprättades i St. Olavs Universitetssjukhus, Trondheim, Norge, samt INA-6 (gåva från Dr Martin Gramatzki, universitetet i Erlangen-Nurnberg, Erlangen, Tyskland) (14). Cellinjen HEK-293T (Open Biosystems, Thermo Fisher Scientific) användes till den lentivirala transduktionen, för att amplifiera mängden virus.

Etik

Då inga patientprover användes i studien behövdes ingen etikprövning. Däremot kan det föras en diskussion huruvida det är etiskt rätt att använda CRISPR/Cas9-teknik för att modifiera olika cellers gener. Det kan anses vara oetiskt att använda sig av olika genmodifieringstekniker då man ”går emot naturen” eller ”försöker leka Gud”. Å andra sidan kan det tyckas etiskt rätt att försöka bota ärftliga sjukdomar, HIV eller cancer. Således måste riskerna ställas mot nyttan, och trots att det är omöjligt att veta hur denna nya teknik och dessa nya kunskaper kommer att användas i framtiden måste dagens problem ställas i fokus. För att kunna lösa frågor som till exempel ärftliga sjukdomar, HIV och cancer är CRISPR ett verktyg som har god potential för att göra det.

Hållbarhetsperspektiv

Projektet är av värde ur ett samhällsperspektiv då mer forskning krävs för att utreda eventuella nya behandlingsmöjligheter för patienter med myelom. Detta i sin tur skulle inte enbart minska antalet avlidna och de drabbades lidande, utan även underlätta för vården med avseende att potentiellt skära ner tiden patienter med myelom behöver vistas på sjukhus samt de resurser som krävs för de palliativa behandlingarna.

Under laborativt arbete är det mycket viktigt att arbeta sterilt, inte minst när man arbetar med nukleinsyror där eventuell kontamination kan ödelägga hela experimentet. Därav används oftast väldigt mycket engångsmaterial i plast under sådant arbete. Under projektet har detta hafts i åtanke och rena plast- och pappersförpackningar har källsorterats. Pipettspetsar är något som används i stora mängder på laboratorium och i och med det har St. Olavs universitetssjukhus i Trondheim, som detta projekt utfördes vid, beslutat att återanvända de flesta pipettaskar och själva utrusta dessa med pipettspetsar och sterilisera dem. I de fall där det var lämpligt kunde samma pipettspets användas, vilket även det reducerar mängden plast som slängs. Under projektet har även hänsyn tagits till att engångshandskar är väldigt dyra och därmed har noggrann planering utförts, för att undvika att slänga handskar i onödan.

Metoder:

Cellodling

KJON, IH-1 och INA-6 odlades i RPMI-1640 med tillsatt 10 % humant serum (HS), glutamin (2 mM) och interleukin (IL)-6 (1 ng/mL), i 37 °C i 5 % CO₂. HEK-293T cellinjen odlades i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) med tillsatt 10 % fetalt kalvserum (FCS) och glutamin (2 mM), i 37 °C i 5 % CO₂.

Design av oligonukleotider

För att kunna börja med studien behövde först oligonukleotider till RNA-guiderna beställas (både uppströmsoligo och nedströmsoligo). Dessa designades i det internetbaserade verktyget "Benchling"², genom att skriva in genen av intresse, det vill säga *BMPRI1A* respektive *BMPRI2*, och passande parametrar; för detta projekt valdes enkel guide med 20 baspar, genomat GRCh38 (hg38, Homo sapiens) och PAM-regionen NGG. Därefter valdes vilket exon guiden skulle fästas till. "Benchling" tog sedan fram olika passande guider utifrån de angivna parametrarna. Den guide med högst sammanlagd poäng monterades in i vektorn pLentiCRISPRv2 (gåva från Feng Zhang, Addgene plasmid #52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID:Addgene_52961) och "Benchling" designade sekvensernas ändrar för att passa (15). För att öka chansen att försöket skulle lyckas designades flera olika RNA-guider (fyra för *BMPRI1A*-genen och två för *BMPRI2*-genen), då det på förhand inte var känt vilka som skulle fungera, se Tabell 1. Bilaga 1 visar plasmiden med insatt guide för *BMPRI1A*.

² Cloud-based platform for biotech R&D | Benchling [Internet]. [citerad 20 maj 2023]. Tillgänglig vid: <https://www.benchling.com/>

Tabell 1. gRNA till *BMPRI1A* och *BMPR2*

Gen	Exon	Uppströmssekvens	Nedströmssekvens
BMPRI1A 3.1	3	CACCGCTGATGTAAATGTATAGCTG	aaacCAGCTATACATTTACATCAGC
BMPRI1A 3.2	3	CACCGTATTAAGGTGACAGTACAC	aaacGTGTACTGTACCTTTAATAC
BMPRI1A 4.1	4	CACCGATAGTATGCTTCATGGCACT	aaacAGTGCCATGAAGCATACTATC
BMPRI1A 4.2	4	CACCGATAGTATGCTTCATGGCAC	aaacGTGCCATGAAGCATACTATC
BMPR2 1.1	1	CACCGTTTGATATCGTGAAACTACG	aaacCGTAGTTTCACGATATCAAAC
BMPR2 2.1	2	CACCGGGACAATATTATGCTCGAA	aaacTTCGAGCATAATATTGTCCC

Tillverkning av plasmid

För att hybridisera de två komplementära, enkelsträngade oligonukleotiderna blandades 1 µL uppströmsoligo (100 µM), 1 µL nedströmsoligo (100 µM), 1 µL 10X T4-DNA-ligasbuffert (New England Biolabs (NEB), USA), 6,5 µL dubbelfiltrerat vatten (filtrerat Milli-Q-vatten) och 0,5 µL T4-polynukleotidkinas (NEB, USA, katalognummer: M0201S, 10 000 units/mL). Detta gjordes för samtliga guider. Lösningarna sattes i en termocykler i 37 °C i 30 min, därefter 95 °C i 5 min och till sist 25 °C genom att trappa ner temperaturen 5 °C/min. För att öppna pLentiCRISPRv2 blandades 2,2 µL plasmid (1000 ng), 5 µL NEBuffer, 1 µL BsmBI (NEB, USA, katalognummer: R0739L, 10 000 units/mL) och 41,8 µL filtrerat Milli-Q-vatten, varpå lösningen sattes i en termocykler i 55 °C i 15 min. Koncentrationen mättes därefter med NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) till 37,2 ng/µL. För att sedan ligera ihop de dubbelsträngade oligonukleotiderna (RNA-guiderna) och plasmiden blandades 1,3 µL öppnad pLentiCRISPRv2 (50 ng), 1,5 µL 10X T4-DNA-ligasbuffert (NEB, USA), 1 µL T4-DNA-ligas (NEB, USA, katalognummer: M0202L), 1 µL oligonukleotidlösning (0,05 µM) och 10,2 µL filtrerat Milli-Q-vatten. Detta gjordes för respektive RNA-guide. Lösningarna inkuberades i rumstemperatur i 2 tim och värmeinaktiverades därefter i 65 °C i 10 min, i en termocykler, för att inaktivera restriktionsenzymet BsmBI. Som negativ kontroll användes filtrerat Milli-Q-vatten i stället för oligonukleotidlösningen, och som positiv kontroll användes en tidigare fungerande uppströmsoligonukleotid för genen *hU6*.

Transformering av Escherichia coli

Först bereddades LB-medium (NaCl (10 g/L), trypton (10 g/L), jästextrakt (5 g/L) och destillerat vatten) och LB-agar (NaCl (10 g/L), trypton (10 g/L), jästextrakt (5 g/L), agar (20 g/L) och destillerat vatten). Dessa autoklaverades och ampicillin (100 µg/mL) tillsattes till

agarlösningen när den hade nått en temperatur där det gick att hålla i flaskan utan att bränna sig. Agarplattor gjöts och förvarades i 4 °C tills de skulle användas. Åtta rör med 50 µL fryst *Escherichia coli* DH5-α tinades på is och 5 µL av respektive ligerad plasmid (ca 100 ng) tillsattes i varsitt rör, inklusive positiv- och negativ kontroll. Lösningarna inkuberades på is i 30 min, därefter i värmeblock i 42 °C i 45 sek och sist på is i 2 min. Till lösningarna sattes 1 mL LB-medium varpå de sattes in i skakinkubator med 37 °C och 250 rpm i 1 tim. När detta var gjort centrifugerades lösningarna i 5000 g, i 2 min, i rumstemperatur. Ca 950 µL av supernatanterna pipetterades bort och pelletarna löstes upp i resterande lösning. Respektive bakterielösning pipetterades ut på varsin LB-agarplatta och inkuberades i 37 °C över natt. Eftersom agarplattorna innehöll antibiotika överlevde endast de bakterier som hade plasmiden, då plasmiden hade en gen för ampicillinresistens.

PCR

För att kontrollera om ligeringen fungerade utfördes en PCR, varpå PCR-produkterna kontrollerades med hjälp av gelelektrofores. Först märktes nya LB-agarplattor med antibiotika och nya rör, samt ritades rutnät med fyra rutor på agarplattorna. Fyra kolonier från varje platta plockades upp separat med en ren pipettspets och duttades en gång i respektive uppmärkt ruta. Vid de fall där plattorna hade färre kolonier än fyra, togs alla som fanns. Kvarvarande bakterier på pipettspetsen rördes sedan ner i 50 µL filtrerat Milli-Q-vatten i motsvarande uppmärkt rör. För att utföra själva PCR-reaktionen användes ”kit”-beskrivningen för ”DreamTAQ hot start PCR Master Mix” (Thermo Scientific, USA) (<http://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Reference-Materials/dreamtaq-dna-polymerases-labaid.pdf>), men där uppströmsoligo för hU6-F användes som uppströms”primer” och provets motsvarande nedströmsoligo som nedströms”primer”. Proverna och reagenserna vortexades och 0,5 µM hU6-F, 0,5 µM nedströmsoligo, 2,5 µL DNA (från röret med 50 µL vatten och bakteriekoloni), 25 µL DreamTaq PCR Master Mix (2X) samt nukleasfritt vatten till totalvolymen 50 µL bereddes för respektive prov. Proverna sattes i Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler och temperaturer och tid för PCR-reaktionen sattes till 95 °C 3 min, 25 cykler av 95 °C 30 sek, T_m (53,3 °C) 30 sek och 72 °C 1 min, följt av 72 °C 10 min och därefter 4 °C. För att kontrollera längden på PCR-produkterna gjöts en 2 % agarosgel med GelRed och brunnarna laddades med 12 µL av respektive prov och kontroller (10 µL prov och 2 µL 6X Gel Loading Dye) samt 5 µL storleksmarkör (1 kb Plus DNA Ladder for Safe Stains, NEB, USA, katalognummer: N0559S). Tris/Borat/EDTA-buffert (TBE-buffert) tillsattes och gelen utsattes för en spänning på 100 V i ca 1 tim och

fotograferades med hjälp av Gel Doc EZ Imaging System (Bio-Rad). På grund av tids- och resursbegränsning valdes endast fyra prover för vidare experiment: BMPR1A 3.2.3, BMPR1A 4.2.2, BMPR2 1.1.4 och BMPR2 2.1.2.

Isolering av plasmid - Miniprepp

En koloni från plattorna med positivt resultat från PCR:en togs och blandades i ca 5 mL LB-medium med ampicillin (100 µg/mL). Lösningarna fick stå i skakinkubator med 37 °C och 250 rpm över natt. Dagen efter användes ”kittet” och ”kit”-beskrivningen ”PureYield Plasmid Miniprep System” (Promega, katalognummer: A1222, USA) (https://se.promega.com/-/media/files/resources/protcards/pureyield-plasmid-miniprep-system-quick-protocol.pdf?rev=592591947f9c47efb5a576173f4f77f6&sc_lang=en) för att isolera plasmiderna från bakterierna. ”Kit”-beskrivningen av tillverkaren följdes förutom första steget, där 2 mL provmaterial sattes till ett 1,5 mL eppendorfrör, i stället för 600 µL, och centrifugerades därefter i 6800 g i 3 min och 4 °C. Hundra µL lyseringsbuffert tillsattes och rören blandades enligt tillverkarens beskrivning. Därpå tillsattes 350 µL neutraliseringslösning och rören blandades återigen. Rören centrifugerades i maxhastighet (16 110 g) i 3 min i rumstemperatur och supernatanten fördes över till en kolonn, i ett 1,5 mL eppendorfrör. Rören centrifugerades därefter i maxhastighet i 15 min i rumstemperatur och restlösningarna kasserades. Kolonnerna tvättades sedan i två steg (200 µL ”Endotoxin Removal Wash” (ERB) följt av centrifugering i maxhastighet i 15 sek samt 400 µL ”Column Wash Solution” (CWC) följt av centrifugering i maxhastighet i 30 sek) och DNA eluerades till ett rent 1,5 mL eppendorfrör genom att tillsätta 30 µL elueringsbuffert. Efter att rören fått stå i 1 min i rumstemperatur centrifugerades de i maxhastighet i 15 sek.

Sangersekvensering

Provernas nukleinsyrakoncentrationer mättes med NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) och skickades till Eurofins Genomics för Sangersekvensering. Innan proverna skickades iväg förbereddes de genom att 5 µL prov (50–100 ng/µL) och 5 µL ”primer” (5 pmol/µL) adderades till 1,5 mL eppendorfrör. För varje prov bereddes två rör: en med motsvarande nedströmsoligo som nedströms”primer” och en med hU6-F som uppströms”primer”. Sekvenseringen gjordes för att kunna kontrollera att RNA-guiderna var insatta korrekt i plasmiderna, vilket gjordes i ”Benchling”.

Isolering av plasmid - Maxiprepp

När sekvenserna hade jämförts i ”Benchling” och det hade bekräftats att RNA-guiderna var insatta korrekt i plasmiderna ville ett maxiprepp utföras för att få ut en större mängd plasmid, till kommande moment. En koloni från bakterieplattorna med positivt resultat från sekvenseringen (samma plattor som för minipreppen) togs och blandades i ca 200 mL LB-medium med ampicillin (100 µg/mL). Lösningarna fick stå i skakinkubator med 37 °C och 250 rpm över natt. Dagen efter användes ”kittet” och ”kit”-beskrivningen ”QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)” (QIAGEN, katalognummer: 12163, Tyskland) och ” Quick-Start Protocol, QIAGEN® Plasmid Mini, Midi and Maxi Kits” (<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=c164c4ce-3d6a-4d18-91c4-f5763b6d4283&lang=en>) för att rena fram plasmiderna. Proverna centrifugerades först i 6000 g i 15 min i 4 °C. Därefter resuspenderades pelleten i 10 mL av buffert P1 och 10 mL av buffert P2 adderades. Proverna blandades enligt tillverkarens beskrivning och fick sedan inkubera i 5 min i rumstemperatur. Tio mL av buffert P3 sattes till, proverna blandades och fick sedan inkubera i 20 min på is. Därefter centrifugerades proverna i 20 000 g i 30 min i 4 °C. Supernatanten recentrifugerades i 20 000 g i 15 min i 4 °C och sattes över till en kolonn. När vätskan runnit igenom tillsattes 2 x 30 mL av buffert QC för att tvätta kolonnen. Efter tvätt tillsattes 15 mL av buffert QF för att eluera DNA:t från kolonnerna. Sedan tillsattes 10,5 mL isopropanol till DNA:t och proverna centrifugerades i 15 000 g i 30 min i 4 °C. Supernatanten kasserades och pelleten tvättades med 5 mL 70 % etanol. Till sist centrifugerades proverna i 15 000 g i 10 min i 4 °C, supernatanten kasserades, pelleten fick lufttorka i 5 min och resuspenderades i 500 µL TE-buffert

Lentiviral transduktion

För att kunna föra in plasmiderna i myelomceller användes lentivirus. Mängden lentivirus behövde först amplifieras, vilket gjordes genom att transfektera HEK-293T-cellinjen med olika plasmider som behövdes för att cellerna skulle börja producera virus. Först odlades HEK-293T-celler ut i 15 små petriskålar (ca 200 000 celler per petriskål) tillsammans med 2 mL DMEM (innehållande 10 % FCS och glutamin). Dagen efter blandades 180 µL serumfritt DMEM och 9 µL GeneJuice (Merck Life Science AS, Norge) i totalt fem rör (BMPR1A 3.2.3, BMPR1A 4.2.2, BMPR2 1.1.4, BMPR2 2.1.2 och UNG (irrelevant gRNA, specifik för intron 2 på *UNG*, CGACCCGCGAGATGATATCA, gåva från Per Arne Aas, NTNU, Trondheim)). Rören vortexades och inkuberades i 5 min i rumstemperatur. Därefter tillsattes 2,25 µg psPAX2 och 0,75 µg pMD2.G, som är två plasmider som innehåller viktiga kodande gener för att cellerna ska kunna producera lentivirus, samt 3 µg av respektive

pLentiCRISPRv2 (BMPR1A 3.2.3, BMPR1A 4.2.2, BMPR2 1.1.4, BMPR2 2.1.2 och UNG). Lösningarna fick inkubera i 8 min i rumstemperatur innan 60 µL droppades över cellerna i varje petriskål. Nästa dag kontrollerades cellerna och de fick nytt medium. Efterföljande två dagar skördades virus genom att mediet sögs upp i en spruta som därefter försågs med ett 0,20 µm-filter. När viruslösningarna sedan droppades över myelomcellinjerna kunde eventuella HEK-293T-celler fastna i filtret.

Myelomcellinjerna KJON, IH-1 och INA-6 transducerades med virus genom att viruslösningarna droppades ovanpå dessa vid tre olika tillfällen. Nästa steg var att behandla cellerna med puromycin för att cellerna som inte hade lyckats bli transducerade skulle dö. För att veta hur mycket puromycin som skulle behövas till respektive cellinje gjordes ett titreringsexperiment med olika koncentrationer av puromycin (0,00; 0,05; 0,10; 0,17; 0,31; 0,56; 1,00 och 1,80 µg/mL) med de olika cellinjerna. Proverna mättes i duplikat och andelen levande celler mättes med annexin-V FITC och propidiumjodid (PI) med flödescytometri efter fyra dagar. Den koncentration puromycin där i princip alla celler var döda var den som användes, i det här fallet 0,50 µg/mL för KJON, 1 µg/mL för IH-1 och 0,30 µg/mL för INA-6.

På grund av den begränsande tiden samt vissa svårigheter kunde projektet inte omfatta hela arbetet och därmed kunde resterande steg inte utföras.

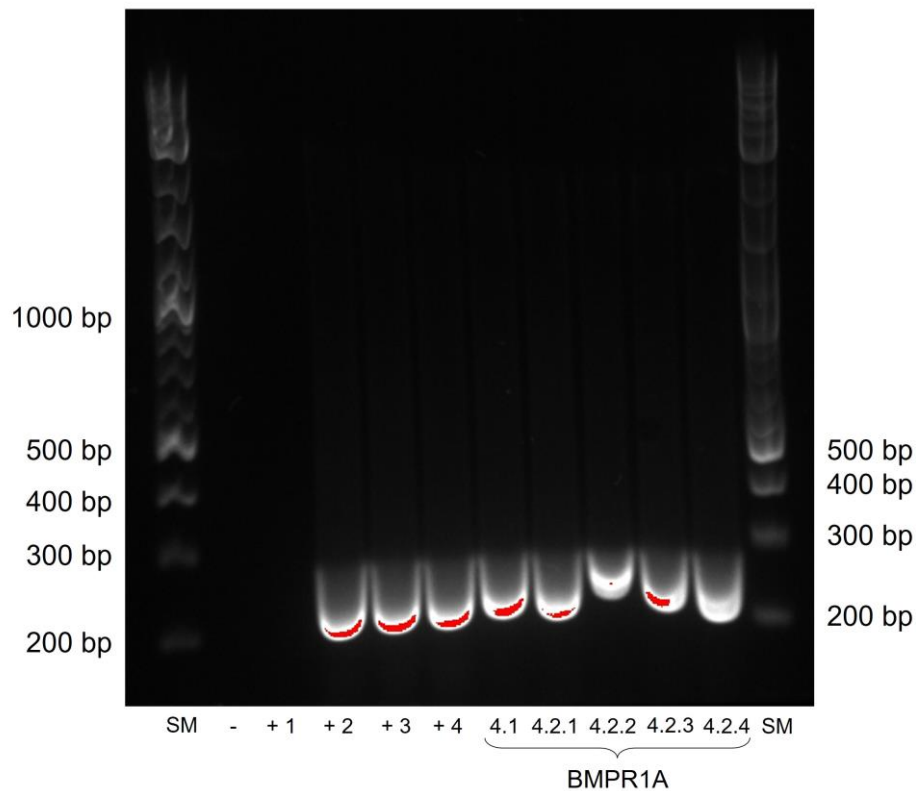
Statistik

På grund av att projekten inte kunde avslutas i den grad som det först var tänkt, erhöles inga resultat med avseende på funktionen av BMPR1A och BMPR2. Därmed utfördes inget statistiskt test. Om mer resultat hade fåtts hade multipel linjär regression kunnat användas. För de kvantitativa resultat som ändå erhöles beräknades medelvärde och standardavvikelse (SD).

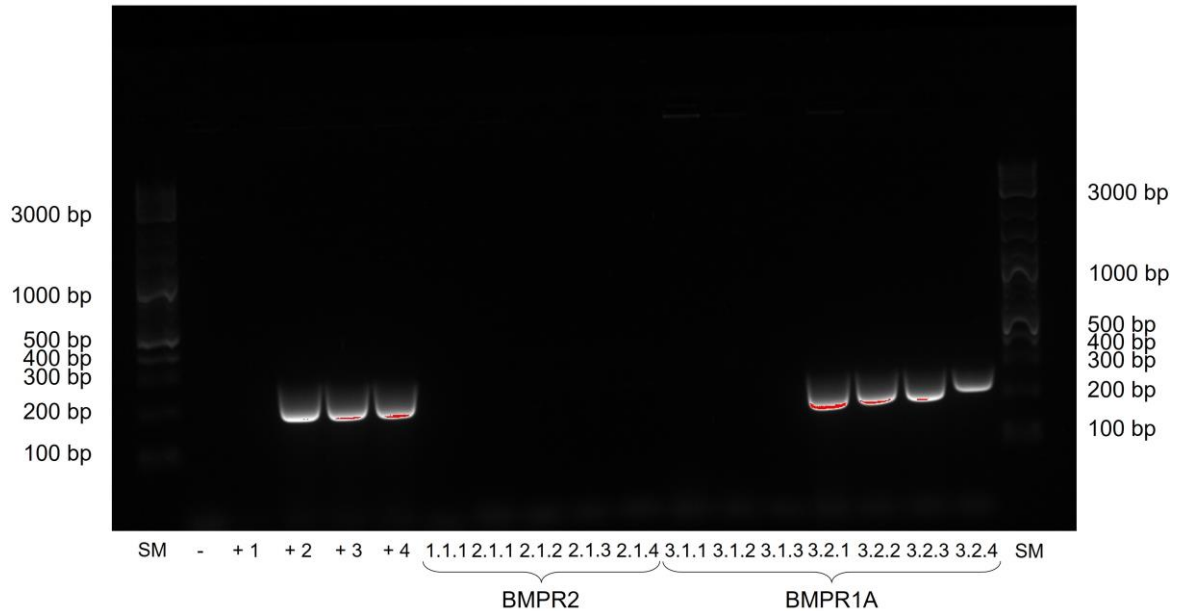
Resultat

Målet med denna studie var att undersöka betydelsen av BMP-receptorerna BMPR1A och BMPR2 för aktivering av SMAD-signaleringsvägen i myelomcellinjer. Detta genom att slå ut de kodande generna med CRISPR/Cas9 och studera överlevnaden av cellerna efter BMP-behandling. För att kunna göra det designades gRNA som ligerades in i pLentiCRISPRv2. Genom att använda PCR följt av gelelektrofores samt sekvensering kunde plasmiderna kontrolleras. Resultatet av gelelektroforesen visade att nio av de tolv proverna för genen

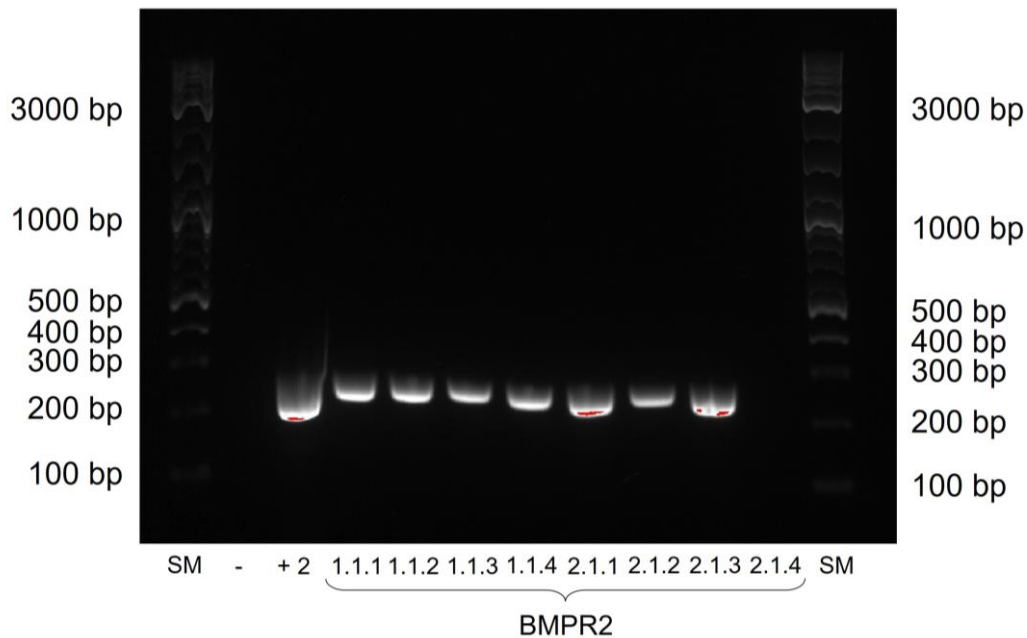
BMPRI1A (3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 4.1, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 och 4.2.4) som testades och att sju av de tretton proverna för genen *BMPRI2* (1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4, 2.1.1, 2.1.2 och 2.1.3 från försök 2) som testades var positiva. Den negativa kontrollen var negativ och tre av de fyra positiva kontrollerna var positiva (+2, +3 och +4). Visuellt såg PCR-produkterna ut att vara ca 250–200 bp, se Figur 1, 2 och 3.



Figur 1. Gelelektrofores försök 1, med en negativ kontroll (-), fyra positiva kontroller (+1, +2, +3 och +4), fem BMPRI1A-prover (4.1, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3 och 4.2.4) samt två storleksmarkörer (SM).



Figur 2. Gelelektrofores försök 1, med en negativ kontroll (-), fyra positiva kontroller (+1, +2, +3 och +4), fem BMPR2-prover (1.1.1, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 och 2.1.4), sju BMPR1A-prover (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3 och 3.2.4) samt två storleksmarkörer (SM).

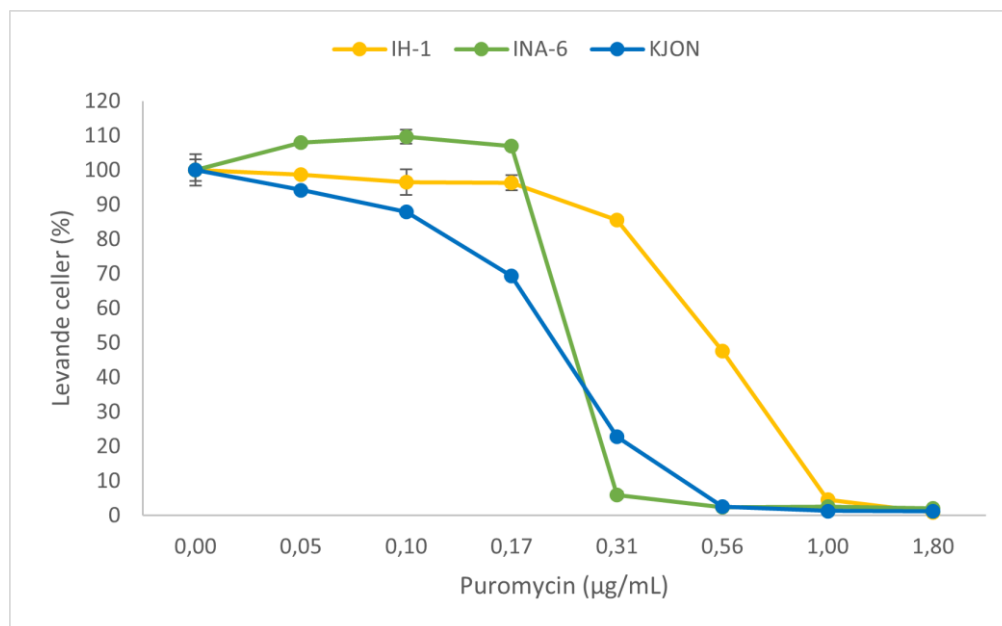


Figur 3. Gelelektrofores försök 2, med en negativ kontroll (-), en positiv kontroll (+2), åtta BMPR2-prover (1.1.1, 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 och 2.1.4) samt två storleksmarkörer (SM).

Med hjälp av sekvenseringen kunde det bekräftas om guiderna BMPR1A 3.2.3, BMPR1A 4.2.2, BMPR2 1.1.4 och BMPR2 2.1.2 var insatta korrekt och om de var intakta. Detta

gjordes genom att proverna först skickades till Eurofins Genomics som sekvenserade dessa, varpå de därefter kunde jämföras i "Benchling". Alla fyra guider visade sig vara insatta korrekt och de var intakta. Detta kunde endast ses med uppströms"primern" för hU6-F och inte med nedströms"primern" för respektive guide, se Bilaga 2 för exempel.

För att ta reda på hur höga puromycinkoncentrationer som skulle tillsättas till myelomcellinjerna IH-1, INA-6 och KJON efter transduktion av lentivirus utfördes ett titreringsexperiment. Koncentrationerna 0,00; 0,05; 0,10; 0,17; 0,31; 0,56; 1,00 och 1,80 $\mu\text{g/mL}$ puromycin tillsattes till cellinjerna i duplikat och efter fyra dagar mättes andelen levande celler med flödescytometri (annexin-V FITC och PI). Vid puromycinkoncentrationen 0,56 $\mu\text{g/mL}$ var andelen levande KJON-celler 1,95 % (2,59 % efter normalisering mot kontrollen), vid koncentrationen 1,00 $\mu\text{g/mL}$ var andelen levande IH-1-celler 2,65 % (4,60 % efter normalisering mot kontrollen) och vid koncentrationen 0,31 $\mu\text{g/mL}$ var andelen levande INA-6-celler 1,96 % (5,99 % efter normalisering mot kontrollen). Dessa koncentrationer var de som senare användes. Det eftersträvades en tillräckligt hög puromycinkoncentration som dödade majoriteten av de icke-transducerade cellerna, men som var tillräckligt låg för att inte döda de infekterade cellerna. Värdena normaliserades mot respektive kontroll och resultatet kan ses i Figur 4.



Figur 4. Puromycintitrering med cellinjerna IH-1, INA-6 och KJON. Andel levande celler (%) på y-axeln och puromycinkoncentration ($\mu\text{g/mL}$) på x-axeln. Proverna mättes i duplikat och medelvärdena illustreras i figuren. Värdena är normaliserade mot respektive kontroll och felstaplarna indikerar $\pm 1\text{SD}$.

Diskussion

För att kunna studera uttrycket och betydelsen av generna *BMPRI1A* och *BMPRI2* hos myelomceller ville dessa slås ut i med hjälp av CRISPR/Cas9. Cellerna skulle därefter behandlades med olika BMP för att se huruvida dessa kan aktivera SMAD-transkriptionsfaktorer, och därmed inducera apoptos.

Resultatet av PCR:en och gelelektroforesen visade att totalt nio *BMPRI1A*-prover och sju *BMPRI2*-prover blev positiva. Produkterna såg ut att vara ca 250–200 bp, vilket är rimligt då produkterna borde ha varit ca 250 bp om allt var korrekt. Att en av de positiva kontrollerna blev negativ (+1) är inget förvånande då det är fullt rimligt att alla bakterier inte tog upp plasmiden som sattes till. Därav var det snarare slumpen som avgjorde att tre av de fyra kolonierna som togs till positiva kontroller hade tagit upp plasmiden och att en inte hade det. I realiteten hade endast en positiv kontroll med positivt resultat räckt för att visa att tillverkningen av plasmid, transformeringen och PCR:en hade fungerat.

Varför endast uppströms”primern” hU6-F fungerade för proverna vid sangersekvenseringen och inte nedströms”primern” för respektive guide berodde troligtvis på att nedströms”primern” var själva guiden, det vill säga att ”primern” satt direkt på sekvensen av intresse. Optimalt ska ”primern” binda vid mellan 50 och 300 nukleotider uppströms från sekvensen av intresse³.

Varför just CRISPR/Cas9 valdes för genredigering i det här projektet var framför allt på grund av intresset av att slå ut gener helt. Med andra metoder, så som litet interfererande RNA (siRNA), mikro-RNA (miRNA) och kort hårnåls-RNA (shRNA), slås generna endast delvis ner, det vill säga uttrycket nedregleras men kommer aldrig helt att elimineras (16). Dessa nedregleringar av genuttryck är också temporära och reversibla då de inte ändrar något i genomet. Metoder som zinkfingernukleaser (ZFN), transkriptionsaktivatorliknande effektorer med nukleasdomän (TALEN) och CRISPR/Cas är andra exempel på genmodifieringsmetoder, men som faktiskt manipulerar i genomet genom att orsaka dubbelsträngsbrott, vilket kan leda till att gener helt slås ut (17). En fördel med CRISPR/Cas-metoden jämfört med ZFN och TALEN är att den är mycket lättare att använda. Då CRISPR/Cas9 använder RNA-DNA interaktion behöver endast den 20 bp-långa sekvensen för gRNA:t designas, medan ZFN och

³ Addgene: Protocol - How to Perform Sequence Analysis [Internet]. [citerad 25 maj 2023]. Tillgänglig vid: <https://www.addgene.org/protocols/sequence-analysis/>

TALEN använder protein-DNA interaktion är designen av dessa ner komplex och tidskrävande. Ding et al. undersökte 2013 effektiviteten av TALEN jämfört med CRISPR/Cas i humana pluripotenta stamceller (hPSC) (18). I studien ville de ta reda på vilken av metoderna som effektivast orsakar mutationer. De såg att CRISPR/Cas presterade konstant bättre, med effektivitet på 51–79 % mot TALEN:s 0–34 %.

Den kanske främsta nackdelen med CRISPR/Cas9, men även andra genredigeringstekniker, är risken för så kallade ”off target”-effekter. Hsu et al. undersökte 2013 hur specifikt cas9-enzymet kan binda till DNA (19). Cas9 visade sig ha generellt hög specificitet och kunde tolerera vissa typer av missanpassning mellan gRNA och DNA. Detta gällde framför allt när missanpassningarna var längre ifrån PAM-regionen, vilket är rimligt med tanke på att PAM-sekvensen är viktig för att cas9 ska kunna hitta och binda in till DNA:t. I studien undersökte de även ”off target”-effekter, det vill säga enzymets förmåga att oavsiktligt klyva i sekvensen. De såg att ”off target”-klyvningar förekom, men när gRNA:t var likt andra sekvenser än målsekvensen. Skulle detta ske i kroppen, kan det leda till skadliga effekter, så som att en viktig gen slås ut, till exempel en tumörsuppressorgen, eller att en annan gen sätts på. Som en lösning på detta uppmanade Hsu et al. att man noggrant ska designa sina gRNA för att försöka undvika liknande sekvenser andra än målsekvenserna.

Trots att CRISPR/Cas9 är ett relativt nyupptäckt verktyg finns flera tusen publikationer på internet om metoden och olika experiment. Även om det kan vara svårt och ta lång tid att sätta upp ett optimerat protokoll för en sådan här metod på sitt laboratorium, kan man få mycket information och vägledning från hur andra har gjort. Dessutom har laboratoriet, där detta projekt utfördes, utfört liknande experiment med CRISPR/Cas9, vilket innebar att ett helt nytt protokoll inte behövde sättas upp.

På grund av svårigheter och problem under projektets gång kunde inte arbetet fortsätta. Detta innefattas att tillverkningen av plasmid till *BMP2* behövde utföras tre gånger innan tillräckligt många bakterier tillhandahölls samtidigt som gelelektroforesen visade positiva resultat. Vid ett tillfälle registrerade inte inkubatorn som de virustransducerade cellerna stod i att dörren var stängd, vilket ledde till att varken temperaturen eller CO₂-nivån gick upp som det skulle. Då detta inträffade på en helg samt att ingen blev underrättad om detta, resulterade det i att alla celler dog. Vid det andra lentivirala transduktionsförsöket odlades HEK-293T-cellerna för tätt till en början, vilket cellerna inte trivdes med. När cellerna odlades ut tunnare

sågs det i mikroskop att de inte var optimala. Många av dessa dog ganska snabbt efteråt. På grund av detta felsteg kunde troligtvis inte cellerna producera tillräckligt med lentivirus och efterföljande steg kunde därav inte genomföras optimalt.

Det återstående arbetet av projektet omfattas av kloning, BMP-behandling, viabilitetsanalys och sekvensering. Kloningen kommer utföras genom att cellerna odlas ut med en cell/brunn i en 96-brunnarsplatta. Detta resulterar i att det i varje brunn produceras kloner av respektive cell, då alla cellerna förväntas vara lika. Det görs på grund av att cellerna kommer försöka laga dubbelsträngsbrotten, orsakade av Cas9, olika; hos vissa kommer brotten kunna lagas helt, hos vissa kommer det skapas insertioner och deletioner och hos vissa kommer det leda till en läsramsförskjutning som kan leda till att genen slås ut. Sedan kommer cellerna behandlas med olika ligander (BMP), för att därefter studera huruvida dessa kan aktivera SMAD-transkriptionsfaktorer och inducera apoptos. Detta kommer kunna mätas med CellTiter Glo (CTG). Det avslutande steget blir att sekvensera cellerna för att se vad som faktiskt har skett på DNA-nivå.

Sammandraget var projektet lyckat då huvudsyftet med att designa och tillverka gRNA för generna *BMPRI1A* och *BMPRI2* uppfylldes. Beklagligt kunde inte projektet fortsättas i den utsträckning som det var tänkt, på grund av oförutsedda händelser. För att kunna studera funktionerna av *BMPRI1A* och *BMPRI2*, och uppnå projektets andra syften behövs de efterföljande stegen slutföras. Därmed kan inga vidare uttalanden göras kring varken CRISPR/Cas9 som metod eller huruvida detta projekt bidrar till förståelsen av myelom.

Tillkännagivanden

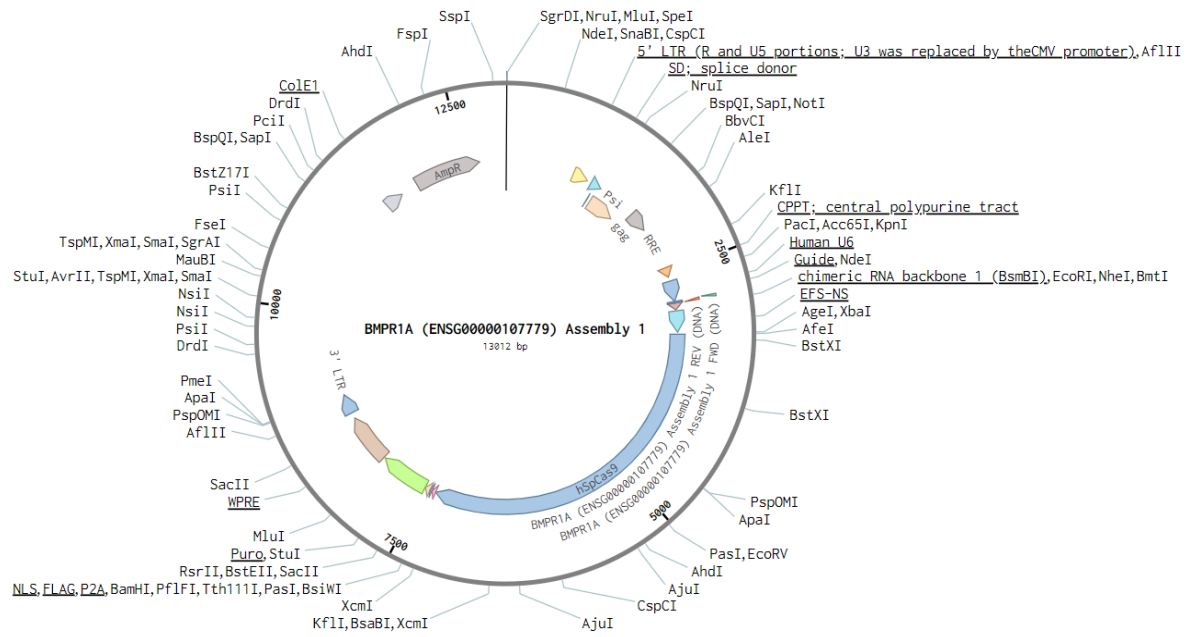
Jag vill tacka mina två praktiska handledare Toril Holien och Ingrid Quist-Løkken, som har varit till stor hjälp och stöd under hela arbetets gång. Jag vill även tacka Clara Andersson-Rusch, framför allt för hjälpen med design och beställning av plasmid samt sekvensbearbetning. Till sist vill jag tacka institutionen för biomedicinsk laboratorievetenskap samt institutionen för klinisk- och molekylärmedicin vid St. Olavs universitetssjukhus i Trondheim, där detta projekt är utfört.

Referenser

1. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleynen A, Yon E, m.fl. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 17 december 2015;126(25):2713–9.
2. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. december 1987;169(12):5429–33.
3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, m.fl. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 23 mars 2007;315(5819):1709–12.
4. Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, Wright AV, Davies CW, Doudna JA. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol*. juni 2014;21(6):528–34.
5. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, m.fl. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 31 mars 2011;471(7340):602–7.
6. Holien T, Sundan A. The role of bone morphogenetic proteins in myeloma cell survival. *Cytokine Growth Factor Rev*. juni 2014;25(3):343–50.
7. Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, m.fl. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood*. 15 september 2000;96(6):2005–11.
8. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Børset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood*. 15 januari 2001;97(2):516–22.
9. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, m.fl. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene*. 15 april 2004;23(17):3024–32.

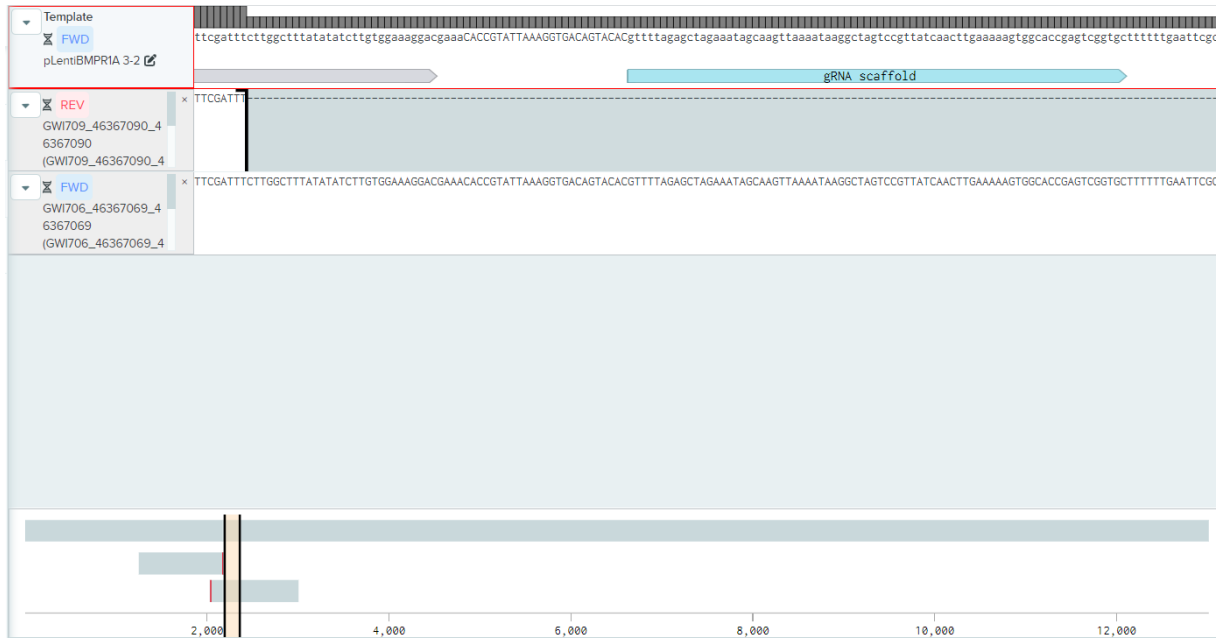
10. Olsen OE, Wader KF, Misund K, Våtsveen TK, Rø TB, Mylin AK, m.fl. Bone morphogenetic protein-9 suppresses growth of myeloma cells by signaling through ALK2 but is inhibited by endoglin. *Blood Cancer J.* 21 mars 2014;4(3):e196.
11. Olsen OE, Sankar M, Elsaadi S, Hella H, Buene G, Darvekar SR, m.fl. BMPR2 inhibits activin and BMP signaling via wild-type ALK2. *J Cell Sci.* 11 juni 2018;131(11):jcs213512.
12. Våtsveen TK, Børset M, Dikic A, Tian E, Micci F, Lid AHB, m.fl. VOLIN and KJON—Two novel hyperdiploid myeloma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2016;55(11):890–901.
13. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Børset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood.* 15 januari 2001;97(2):516–22.
14. Burger R, Guenther A, Bakker F, Schmalzing M, Bernand S, Baum W, m.fl. Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *Hematol J Off J Eur Haematol Assoc.* 2001;2(1):42–53.
15. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* augusti 2014;11(8):783–4.
16. Mocellin S, Provenzano M. RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology. *J Transl Med.* 22 november 2004;2:39.
17. Asmamaw M, Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biol Targets Ther.* 2021;15:353–61.
18. Ding Q, Regan SN, Xia Y, Oostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 04 april 2013;12(4):393–4.
19. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, m.fl. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* september 2013;31(9):827–32.

Bilaga 1.

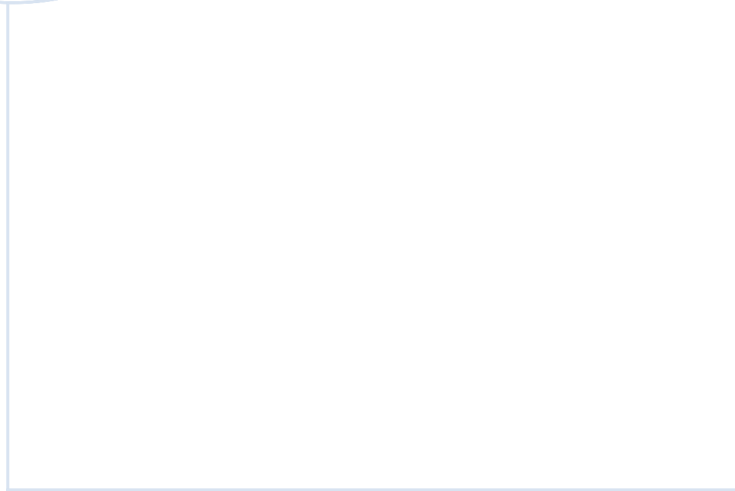


Figur 5. pLentiCRISPRv2 med RNA-guide för BMPR1A

Bilaga 2.



Figur 6. Jämförelse av plasmidsekvensering för BMPR1A 3.2.3. Överst ses referenssekvensen som teoretiskt sett är den korrekta sekvensen efter lyckad inligering av gRNA i pLentiCRISPRv2. I mitten ses BMPR1A 3.2.3 som sekvenserats med BMPR1A 3.2.3 nedströmssekvens som nedströms”primer” och nederst ses BMPR1A 3.2.3 som sekvenserats med hU6-F som uppströms”primer”.



 **NTNU**

Norwegian University of
Science and Technology