



# הנדסה גנטית של תאי B

הנדסת תאי B בגן לייצור נוגדנים מנטרלי נגיף ה-HIV, ע"י שיטה חדשנית מבוססת תהליך ה-Class-Switch Recombination וע"י CRISPR/Cas9

## מסקנות

מהתוצאות ניתן להסיק כי ניתן להנדס את תאי ה-B לייצר ולהפריש נוגדנים מנטרלי HIV על ידי תזמון החדרת הגן המתאים עם תהליך ה-CSR (גרף 1). בנוסף גם ניתן להנדסם בעזרת CRISPR/Cas9. כמו כן ניתן לראות כי שיטת ה-CRISPR מהנדסת את התאים ביעילות יתרה אך גם פוגעת יותר בתאים וגורמת למוות מוגבר שלהם (כתוצאה מהחיתוך המלאכותי של הגנום התאי לשם החדרת הגן ופגיעה בממברנה שלהם לשם החדרת חלבון ה-Cas9) (גרף 2). נוסף על כן, בניגוד להיפותזה, באמצעות שיטת ה-CSR נראתה הצלחה בהנדסת התאים ללא שינוי אופי התמיינותם (גרף 3).

## חשיבות המחקר

במחקר התגלה מידע חשוב על יעילותה ועל השפעתה של ההנדסה בשיטה ה-CSR החדשנית ובשיטת ה-CRISPR/Cas9 על תאי ה-B. מידע אשר מהווה בסיס לשלבים מתקדמים יותר של חקירת התנהגות התאים בתוך גוף העכבר. מדרגה בדרך לפיתוחו של טיפול יעיל, חי, המתפתח ביחד עם הווירוס ואשר בניגוד לכל הטיפולים הנפוצים כיום, יכול להסתכם בזריקה אחת של תאים אשר הונדסו לייצר ולהפריש נוגדנים ספציפיים כנגד ה-HIV. חשוב להבין כי שיטת הנדסה זו לא אפקטיבית רק כנגד HIV. באותו האופן, ועל ידי שימוש במקטע גנטי שונה לייצור נוגדנים שונים, היא תוכל להציע טיפול כנגד כל פתוגן רצוי וכנגד גידולים סרטניים.

### מהלך המחקר

**איור 1: תיאור תהליך המחקר.** במחקר הופקו תאי B מעכברים. אל התאים הוחדר גן שגורם לייצור נוגדנים מנטרלי HIV, ולייצור חלבון GFP אשר משמש כסמן פלורסנטי. קבוצת תאים אחת הונדסה ע"י תזמון החדרת גן עם תהליך ה-CSR (ע"י שימוש ב-LPS וביצויטוקין IL-4 שמעודדים CSR), קבוצה נוספת ע"י CRISPR/Cas9 וקבוצת בקרה לא הונדסה כלל (הגן הוחדר ע"י וקטור ויראלי מבוסס AAV). התאים שהו במדיום גידול והתחלקו במשך תשעה ימים, אשר בסופם (וביום השלישי) נערכה אנליזה מקיפה של חלבונים על גבי התאים בעזרת Flow Cytometer, נבדקה שרידות התאים ונבדקה כמות הנוגדן מנטרל HIV במדיום שבו שהו התאים ע"י ELISA.

### תוצאות

לאחר הנדסת התאים וכ-9 ימים של שהייה במדיום, 11% ו-65% מהתאים ביטאו נוגדן מנטרל HIV ו-GFP בכמות גבוהה בקבוצת ה-CSR וקבוצת ה-CRISPR בהתאמה (גרף 1).

לאחר 3 ימים של שהייה במדיום, 71.95% מהתאים בקבוצת ה-CSR היו חיים, זאת לעומת רק 44.58% אחוזים בקבוצת ה-CRISPR (גרף 2).

על ידי מדידת הכמות של חלבונים ספציפיים בתא B, ניתן לדעת את סוגו של התא. ממדידת הכמויות של אותם חלבונים בקבוצות השונות נמצא כי ישנו הבדל בהתמיינות התאים בין קבוצת התאים שהונדסה באמצעות ה-CRISPR לעומת הקבוצה שהונדסה ע"י ה-CSR. תאי קבוצת ה-CSR התמיינו באופן דומה לתאי קבוצת הביקורת בעוד שההנדסה ב-CRISPR שינתה את אופן התמיינות התאים (גרף 3).

**גרף 1: ריכוז נוגדן ל-HIV בתאי ה-B.** שמאל - קבוצת ה-CSR, ימין - קבוצת ה-CRISPR. המספרים במשבצת השמאלית העליונה מייצגים את אחוז התאים שהונדסו בהצלחה באותה קבוצה.

Group	3BNC117 - HIV antibody	GFP - Marker Protein
CSR	11,00%	23,0...
CRISPR	65,02%	22,1...

**גרף 2: אחוזי השרידות בכל קבוצה.** שמאל - קבוצת ה-CSR, ימין - קבוצת ה-CRISPR. מייצגים את אחוזי תאי ה-B החיים שלושה ימים לאחר ההנדסה. בבדיקה נמדדו גודל ומבנה התאים שעל פיהם ניתן להבדיל בין תאי B חיים למתים.

Group	Lymphocytes (%)
CSR	71,95%
CRISPR	44,58%

**גרף 3: אפיון התמיינות התאים.** ירוק כהה - קבוצת ה-CSR, ירוק בהיר - קבוצת ה-CRISPR, אפור - קבוצת בקרה. בציר X חלבונים שונים שמהווים אינדיקציה לאופן התמיינות תאי ה-B. GL7 - אינדיקטור לתאי Germinal center, CD80 - אינדיקטור לתאי פלזמה, CD38 גבוה ו-CD138 נמוך - אינדיקטורים לתאי זיכרון.

Marker	CSR (%)	CRISPR (%)	Control (%)
CD38	~10	~15	~5
CD138	~60	~25	~60
CD80	~80	~85	~80
GL7	~60	~65	~60

## HIV

נגיף ה-HIV גרם למותם של 40 מיליון בני אדם בעשרות השנים האחרונות, ולטיפול המוצע אליו כיום חסרונות מהותיים כדוגמת תופעות לוואי, היותו כרוני, מחיר יקר, ונטייה לפיתוח חסינות של הנגיף בפניו.

## תהליך ה-CSR בתאי B

**תאי B** הם תאי דם לבנים אשר מייצרים נוגדנים בגופינו. כל תא B בוגר מייצר נוגדנים שיכולים לזהות ולנטרל פתוגן ספציפי. תאי B בוגרים מתחלקים לשלושה סוגים עיקריים: **תאי פלסמה** אשר אחראיים על הפרשת נוגדנים, **תאי זיכרון** אשר אחראיים על איתור הפתוגן בגוף, ו**תאי Germinal center** שהם תאי B שעוברים תהליכי שיפור והתאמה של הנוגדן.

תהליך ה-CSR (Class-switch recombination), הוא תהליך אשר מתרחש באופן טבעי בתאי B, ובו הם משנים את מבנה הנוגדן כדי שיתקשר עם מערכת החיסון ויבצע את מטרתו באופן יעיל יותר. במהלך ה-CSR התאים חותכים ומחברים לעצמם את הגנום באזור בו נמצאים הגנים ליצירת הנוגדנים.

במעבדתו של ד"ר עדי ברזל הושגה הצלחה מסוימת בניצול החתך שנוצר באופן טבעי בתהליך ה-CSR, להכנסת גן לייצור נוגדנים מנטרלי HIV לתאי ה-B, ועל ידי כך להנדס אותם ללא צורך בחיתוך מלאכותי של הגנום.

להנדסה הגנטית ע"י CSR פוטנציאל רב להביא לפיתוח של טיפול יעיל יותר לנגיף ה-HIV, אשר יהיה מבוסס על הנדסה גנטית של תאי B, ויפתור את הבעיות בטיפול המוצע כיום.

## מטרת המחקר

- אפיון התנהגותם של תאי B לאחר שהוחדר אליהם גן שגורם לייצור נוגדנים מנטרלי HIV.
- השוואת שיטת ה-CSR החדשה לשיטה מוכרת ונפוצה כיום לעריכת הגנום - CRISPR/Cas9.

