

Dual-RMCE介导的T细胞受体基因置换系统的建立

龚英¹ 黄乙涓¹ 刘泽龙¹ 成凉¹ 彭晋¹ 刘建中¹ 李亮平^{1,2*}

(¹中山大学中山医学院, 广州 510080; ²暨南大学第一附属医院, 广州 510630)

摘要 抗肿瘤T细胞受体(T cell receptor, TCR)基因治疗在临床上已获得了巨大进展, 但仍然存在一些技术瓶颈。例如, 内外源性TCR链随机组合形成自身反应性TCR分子、外源基因随机插入导致抑癌基因灭活等。为解决这些问题, 作者提出建立低/单拷贝TCR基因置换技术: 即结合逆转录病毒和重组酶介导的盒式交换(recombinase mediated cassette exchange, RMCE)技术, 实现TCR基因定点置换以构建TCR稳定表达系统。首先, 通过逆转录病毒转导在16.113和Jurkat76细胞引入了含有loxP和FRT位点的EGFP(enhanced green fluorescent protein)基因; 然后, 利用RMCE方法将EGFP置换成MAGE-A1的TCR $\alpha\beta$ 基因, 置换效率高达5%。在Jurkat76细胞表面检测到了TCR和CD3分子, 并能与MAGE-A1特异性HLA-A2多聚体结合。预计利用这一TCR基因置换系统结合干细胞技术可快速产生抗原特异性的T细胞, 为TCR-T细胞治疗的安全应用提供一个新策略。

关键词 肿瘤T细胞治疗; TCR基因转移; TCR $\alpha\beta$ 基因; Dual-RMCE

Generation of Dual-RMCE Mediated TCR Gene Replacement System

Gong Ying¹, Huang Yijuan¹, Liu Zelong¹, Cheng Liang¹, Peng Jin¹, Liu Jianzhong¹, Li Liangping^{1,2*}

(¹Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

²First Affiliated Hospital of Ji'nan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract Adoptive immunotherapy with T cells modified by tumor antigen-specific T cell receptor (TCR) achieves a great progress in clinical trials, but it still existed some technical problem. For example, autoimmune side-effects induced by self-reactive TCRs from mismatched TCR chain dimers due to the transduced TCR paired with endogenous TCR chains and the inactivation of tumor suppressor genes causing by retroviral gene random integration. In order to overcome these drawbacks, we proposed to combine the two technologies of retroviral gene transfer and dual recombinase mediated cassette exchange (Dual-RMCE) to rapidly achieve site-specific TCR gene replacement in the mammalian cell lines. This technology was first successfully established in 16.113 and Jurkat76 cell lines. The single or low copy GFP cassette, which flanked by loxP and FRT sites, was introduced into cell genome through retroviral transduction, and then has been replaced by TCR cassette with the same direction of loxP and FRT sites. The efficiency of gene replacement was up to 5%, more effective than homologous recombination. The introduced TCR together with CD3 molecules were found to express on the surface of T cell line and could bound with the MAGE-A1 HLA-A2 multimer. We are using this technology to pluripotent stem cell system for T cell differentiation. The system we established would provide a new strategy to generate tumor antigen specific T cells for a safe retroviral TCR gene transfer in clinical cancer treatment.

Keywords cancer T cell therapy; TCR gene transfer; TCR $\alpha\beta$ gene; Dual-RMCE

收稿日期: 2015-07-20 接受日期: 2015-09-25

国家自然科学基金(批准号: 31270920)和广东省引进创新科研团队计划(批准号: 2011Y035)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-39943302, E-mail: lilping2@mail.sysu.edu.cn

Received: July 20, 2015 Accepted: September 25, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31270920) and Guangdong Innovative Research Team Program (Grant No.2011Y035)

*Corresponding author. Tel: +86-20-39943302, E-mail: lilping2@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2015-11-12 12:35:25 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1235.010.html>

目前,肿瘤免疫治疗的临床试验取得了令人瞩目的成绩,这种新兴肿瘤治疗方法的机制是通过增强机体抗肿瘤免疫力来治疗肿瘤的^[1]。早期T细胞的研究发现,肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocytes, TIL)具有抗肿瘤的作用。实验结果显示,仅在一些肿瘤如恶性黑色素瘤里存在比较多的TIL,并且发现在体外扩增后回输到患者体内后有明显的肿瘤排斥作用。由于免疫耐受^[2]和肿瘤微环境的免疫抑制作用^[3],其TIL的数量也有限,而且多数是耗竭的T细胞(exhausted T cell),回输后无明显的抗肿瘤作用。

为了克服TIL治疗的局限性,近年来发展了抗肿瘤T细胞受体(TCR T-cell therapy, TCR-T)基因治疗法,并已开始进入临床试验,获得了客观疗效^[4-6]。这一技术方法简称为TCR-T细胞疗法,其基本过程是:用针对特异靶抗原的TCR基因,通过基因转移的方法,改造原代T细胞,将普通的T淋巴细胞转变成成为特异识别肿瘤抗原的T淋巴细胞;然后在体外大量扩增后,回输至病人体内用于临床治疗^[7]。用这种TCR基因改造的T细胞开展过继免疫治疗,最大的好处在于可以增强T淋巴细胞的特异性和功能,在体外短期内可大量扩增得到足够的T细胞数量,以达到治疗晚期肿瘤的目的^[8]。这种疗法已在恶性黑色素瘤^[9]、滑膜肉瘤^[4]、B-慢性淋巴细胞白血病(B-chronic lymphoid leukemia, B-CLL)^[10-11]、肾癌和结直肠癌^[12]等恶性肿瘤治疗中获得良好的疗效,致使TCR-T细胞疗法获得了长足进展。

但TCR-T细胞疗法的安全性隐患仍然是一个急需解决的技术问题。抗肿瘤TCR基因治疗常通过逆转录病毒载体转导T细胞。由于病毒转导是一个多拷贝且随机整合的过程,有可能会灭活抑癌基因、活化原癌基因而诱发白血病^[13];同时,转入的TCR链与内源性TCR链随机配对,可形成自身反应性TCR分子^[14],诱发移植物抗宿主性疾病(graft versus host disease, GVHD)^[15]。

为了解决这些问题,我们提出在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)上采用逆转录病毒TCR基因转移技术,通过细胞单克隆的挑选,获取只在基因组某一位点插入了单一基因置换元件的ES细胞克隆;然后用重组酶介导的基因盒式交换(recombinase mediated cassette exchange, RMCE)技术将TCR基因定点置换入这一特定位点;在以后ES细胞发

育分化过程中产生表达肿瘤抗原特异性TCR的T细胞。RMCE技术是利用位点特异性重组酶能够识别短DNA重组序列(如: Cre酶识别loxP位点、Flp酶识别FRT位点)特性,进行定点DNA重组。在位点特异性重组酶的介导下,精确地介导位点间的DNA片段交换。由于只有一个整合位点,避免转基因大量随机插入不同位点带来的副作用。本实验中因同时应用了两种重组酶(Cre酶和Flp酶),故称为Dual-RMCE^[16]。

为了验证这一设想,我们在小鼠细胞系中开展了一系列实验,成功建立了Dual-RMCE介导的TCR基因置换技术系统。未来这一系统与人诱导多能干细胞技术结合,能够产生表达单一TCR基因的定制人T细胞,将成为肿瘤T细胞免疫治疗的新技术。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒 逆转录病毒TCR表达载体pMP71-TCR1367含有从TCR-HLA人源化小鼠(ABAbDII)分离得到的MAGE-A1特异性TCR基因^[17],从Thomas Blankenstein教授处获得。编码Cre和Flp重组酶的质粒pDIRE(#26745)以及RMCE系统置换质粒pDRAV-3(#26748)购自Addgene公司。逆转录病毒表达和包装载体(pMP71EGFP、pLAF-10A1、pCDNA3.1-gag/pol)^[18]从德国柏林洪堡大学细胞生物学系Uckert Wolfgang教授处获得。pSUPER.neo+gfp质粒(VEC-PBS-0006)购自Oligoengine公司。

1.1.2 试剂 LB培养基(胰蛋白胨、酵母粉)、琼脂粉、氯化钠、琼脂糖、PCR引物和质粒测序服务购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Not I、EcoR I、BamH I限制性内切酶购自Fermentas公司。T4连接酶(货号: M0202L)购自New England Biolabs公司。去内毒素质粒提取试剂盒购自Qiagen公司。电转试剂盒Lonza Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V购自Lonza公司。Primer Star Max(TaKaRa公司)购自广州瑞真生物公司。G418(货号: 11811023)和潮霉素(货号: 10687-010)均购自Gibco公司(Life Technologies)。抗体: 抗人CD3-PE(货号: 347347)和抗人TCR $\alpha\beta$ -FITC(货号: 561674)购自BD Bioscience公司, MAGE-A1₂₇₈(KVLEYVIKV)/HLA-A*02:01多聚体(MAGE-A1₂₇₈-HLA-A2-APC)购自MBL公司。无机盐、凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自鼎国生物技术有限公司。细胞培养试剂:

胎牛血清(货号: 10099-141)、青链霉素(货号: 15140-122)、DMEM(货号: C11995500BT)、RPMI1640(货号: C11875500BT)购自Life Technologies公司。细胞培养器皿(培养瓶、培养皿、离心管、移液管)购自Nunc公司(Thermo Scientific)。

1.1.3 设备 细胞培养箱购自Thermo Scientific公司。PCR仪、电泳仪、DNA电泳凝胶成像仪购自Bio-Rad公司。普通倒置显微镜(CKX41型号)购自Olympus公司, 荧光显微镜(Obsever Z1型号)购自Zeiss公司。

1.2 细胞系

小鼠胃肠肿瘤细胞系16.113从Thomas Blankenstein教授处获得^[19], TCR缺陷的人白血病细胞系Jurkat76细胞株从Uckert Wolfgang教授处获得。用RPMI 1640+10% FCS+100 U/mL青链霉素培养基培养这两种细胞系; 病毒包装细胞293T细胞(CRL-3216, ATCC细胞库)则在DMEM+10% FCS+100 U/mL青链霉素培养基中培养。所有细胞均在饱和湿度、37 °C、5% CO₂的恒温细胞培养箱中培养(Thermo Scientific公司)。

1.3 载体的构建

应用Primer 3.0软件进行PCR引物设计。为构建逆转录病毒整合载体pMP71-LGFPF(含有LoxP-EGFPneo-FRT基因置换组件, LGFPF由下划线的字母缩写而来), 用Not I-loxP-F引物: 5'-AAT GCG GCC GCA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT TCT ACC GGG TAG GGG AGG CG-3'和FRT-EcoR I-R引物: 5'-TGA ATT CGA AGT TCC TAT ACT TTC TAG AGA ATA GGA ACT TCT CAG AAG AAC TCG TCA AG-3'。通过聚合酶链式反应(PCR)法从pSUPER.neo+gfp质粒扩增2.0 Kb的Not I-loxP-EFGPneo-FRT-EcoR I片段。使用Primer Star Max PCR反应体系, 反应条件为: 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 5 min。PCR反应后, 用Not I和EcoR I酶切, 并采用胶回收PCR产物, 连接于pMP71载体上。对于TCR置换载体pDRAV-3-LTCRF, 通过Not I-TCR1367引物: 5'-TTA CAG GCG GCC GCC ACC-3'和BamH I-TCR1367引物: 5'-CGG ATC CGA ATT CAG CTG GAC CAC A-3', 扩增MAGEA1-TCR-1367基因; 应用Not I和BamH I对PCR产物酶切后, 用NEB T4连接酶16 °C过夜连接, 克隆至pDRAV-3置换载体上。

1.4 逆转录病毒包装、浓缩、滴度测定和转导

病毒包装如前所述^[18,20], 简言之, 293T细胞培

养至6孔板中, 待细胞铺满70%~80%培养板时, 应用Lipofactamine 2000将兼嗜性小鼠白血病逆转录病毒(Ampho MLV)表达和包装的总共3个载体(2 μg pMP71-LGFPF、2 μg pAFL-10A1-env、2 μg pcDNA3.1-gag/pol)转至293T细胞中进行病毒包装, 48 h后收集病毒上清, 并用0.45 μm的滤器(PALL公司)过滤。病毒滴度测定: 用6孔板培养293T细胞, 每孔细胞为4×10⁵细胞, 每孔加入2 mL的培养液; 准备5个0.6 mL的Eppendorf管, 每管加入45 μL的完全培养液, 取5 μL病毒液, 10倍稀释病毒液, 最后从每管中取5 μL加至培养板中, 并加入终浓度为4 μg/mL的硫酸鱼精蛋白(protamine sulfate, Sigma-Aldrich)。48 h后, 用胰蛋白酶将细胞消化下来, 用流式细胞仪检测GFP表达情况。最后病毒滴度TU/mL=[(初始细胞数)(稀释倍数)(GFP阳性率)]/(病毒原液体积mL)。按照病毒:细胞数=1:10, 转导16.113和Jurkat76细胞, 加入病毒上清液和加入终浓度为4 μg/mL的硫酸鱼精蛋白, 混匀后32 °C 2 000 r/min离心90 min, 转入T25培养瓶培养。

1.5 药物筛选及单细胞克隆的获取

病毒上清转导48 h后, 加入400 μg/mL G418药物筛选10 d后, 计数细胞, 将细胞密度调整到5/mL, 向96孔板中加入100 μL/孔稀释的细胞悬浮液(0.5/孔)。每4 d换液1次, 让细胞自然生长30 d, 获得细胞克隆。

1.6 TCR-RMCE置换实验

将1×10⁶ Jurkat76单克隆细胞1 200 r/min离心3 min后, 用预冷的PBS(pH7.4)清洗细胞2遍, 使用Lonza Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V电转试剂盒, 迅速加入5 μg置换载体pDRAV-3-LTCRF和15 μg pDIRE(编码iCre/FLPo质粒), 混匀细胞和质粒后, 加入2 mm电击杯(Lonza)中。选用Lonza Amaxa真核细胞电转仪, 程序为X1, 电击1次, 迅速转移至37 °C预热的完全培养基中, 转至培养箱培养。电击转化48 h后, 加入200 μg/mL的潮霉素筛选细胞。

1.7 基因组DNA提取和PCR

收集1×10⁶细胞, 加500 μL消化液(NaCl 100 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, EDTA 25 mmol/L, SDS 0.9%), 加5 μL 20 mg/mL蛋白酶K, 55 °C消化3 h后弹匀, 加500 μL酚氯仿, 上下颠倒20次, 13 000 r/min离心10 min; 取上清移入新管, 1:1加入异丙醇(约450 μL), 颠倒, 静置5 min(可看到白色絮状DNA)。13 000 r/min离心15 min, 弃上清, 并用移液器将液体吸取干净。加

500 μ L 75%乙醇, 13 000 r/min离心5 min; 弃上清, 并用移液器将液体吸取干净(注意别把白色沉淀倒掉或吸掉), 重复酒精洗1遍。干燥, 加100 μ L ddH₂O(或TE), 55 $^{\circ}$ C溶解20 min。选取逆转录病毒的LTR区域选取P1和P2以及TCR受体基因的P3作为鉴定引物, 序列分别为P1: 5'-GTT CCA CCG AGA TTT GGA GA-3'; P2: 5'-CAC ACA GCG TAA AAG GAG CA-3'; P3: 5'-CGG CCT TGC TAG GCT CG-3'(图1)。选用Primer Star Max作为PCR聚合酶。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 Kb/min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。用1%的琼脂糖胶进行电泳分析。

1.8 细胞染色及流式细胞仪检测

收集细胞, 用PBS(pH7.4)洗涤细胞2次, 加入表面染色抗体抗人CD3-PE、抗人TCR $\alpha\beta$ -FITC、MAGE-A1₂₇₈-HLA-A2多聚体, 室温避光孵育30 min, 再用PBS洗涤1次, 用100 μ L重悬细胞。用BD AccuriC6流式仪(BD Bioscience公司, San Jose, CA)检测, BD Accuri C6软件和FlowJo分析数据。

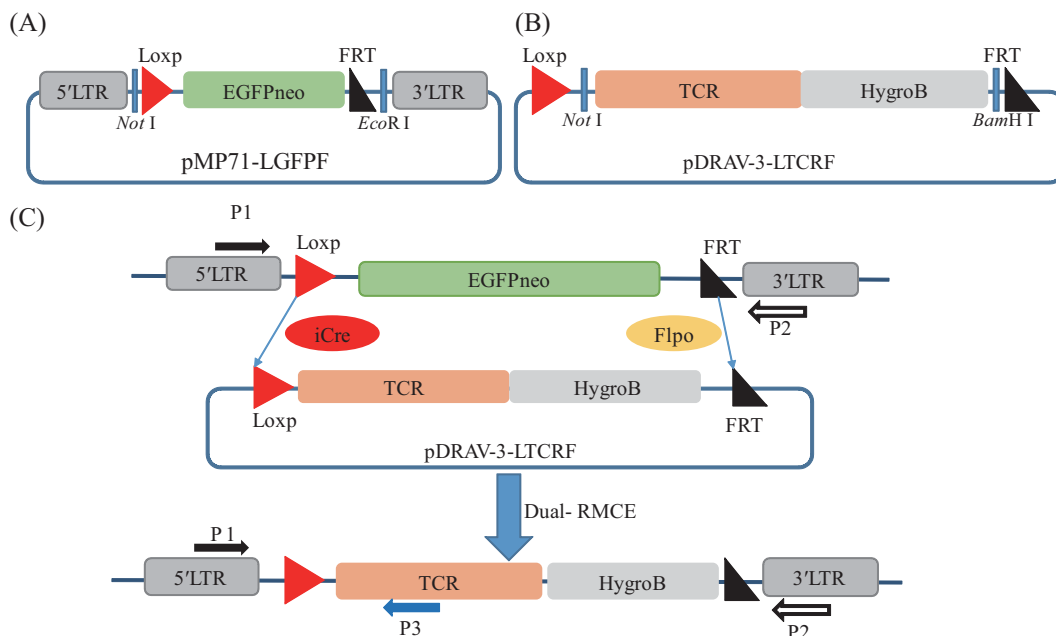
1.9 统计学与图像处理

所获数据用均数 \pm 标准差表示, 显著性检验采用*t*检验或单因素的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据与图像处理应用Microsoft Excel 2013和Prism 5.0软件。

2 结果

2.1 TCR基因置换载体系统的设计和构建

为了建立逆转录病毒TCR基因置换系统, 我们首先构建含有DNA重组组件loxP和FRT位点的逆转录病毒整合载体pMP71-LGFPF和RMCE-TCR置换载体pDRAV-3-LTCRF(图1A和图1B)。逆转录病毒整合载体通过病毒转导方式在靶细胞基因组导入低或单拷贝的置换组件loxP-GFP-FRT, 然后将TCR置换载体pDRAV-3-LTCRF和Cre/Flp酶载体pDIRE-iCre/Flp通过共转染法转入含有置换组件的细胞, 利用Cre/Flp酶识别分别位于整合载体和置换载体上的loxP和FRT位点, 在loxP和FRT位点间发生重组,



A: 逆转录病毒载体pMP71-LGFPF示意图; B: TCR基因置换载体pDRAV-3-LTCRF示意图; C: TCR基因置换流程, 首先用低滴度的逆转录病毒将loxP和FRT置换组件和筛选基因引入基因组中, 通过单细胞克隆的筛选, 获得EGFPneo⁺单细胞克隆, 选用P1和P2作为引物, PCR扩增片段为2.2 Kb。将TCR基因置换载体pDRAV-3-LTCRF和重组酶编码载体pDIRE(iCre和Flp)共同转染到细胞内, 在重组酶介导下, 将EGFPneo置换成TCR-Hygro, 用P1、P2作为引物PCR扩增片段大小为4.2 Kb。选用P1和TCR内部的序列为引物P3, 扩增的片段大小为0.7 Kb。

A: the structure map of retrovirus vector pMP71-LGFPF; B: the map of TCR replacement vector pDRAV-3-LTCRF; C: schematic procedure of the Dual-RMCE mediated TCR replacement. The loxP- and FRT-flanked EGFPneo cassette is first introduced into the mammalian cells via retroviral transduction. The GFPneo⁺ single cell clones are obtained by using the limiting dilution method. Chosen the P1 and P2 as the PCR primers, the band would be 2.2 Kb. To carry out Dual-RMCE mediated TCR gene replacement, the clones are co-transferred with the replacement vector pDRAV-3-LTCRF and Cre/Flp enzyme expression plasmid pDIRE. TCR gene would be exchanged into the genome and GFP would be deleted. Chosen the P1 and P2 as the PCR primers, the band would be 4.2 Kb, while 0.7 Kb band would be in the PCR of chose the P1 and P3 as primers.

图1 逆转录病毒基因置换载体系统的构建和实验流程

Fig.1 Construction of Dual-RMCE mediated TCR gene replacement system and experimental procedure

将EGFP基因置换成TCR基因(图1C)。

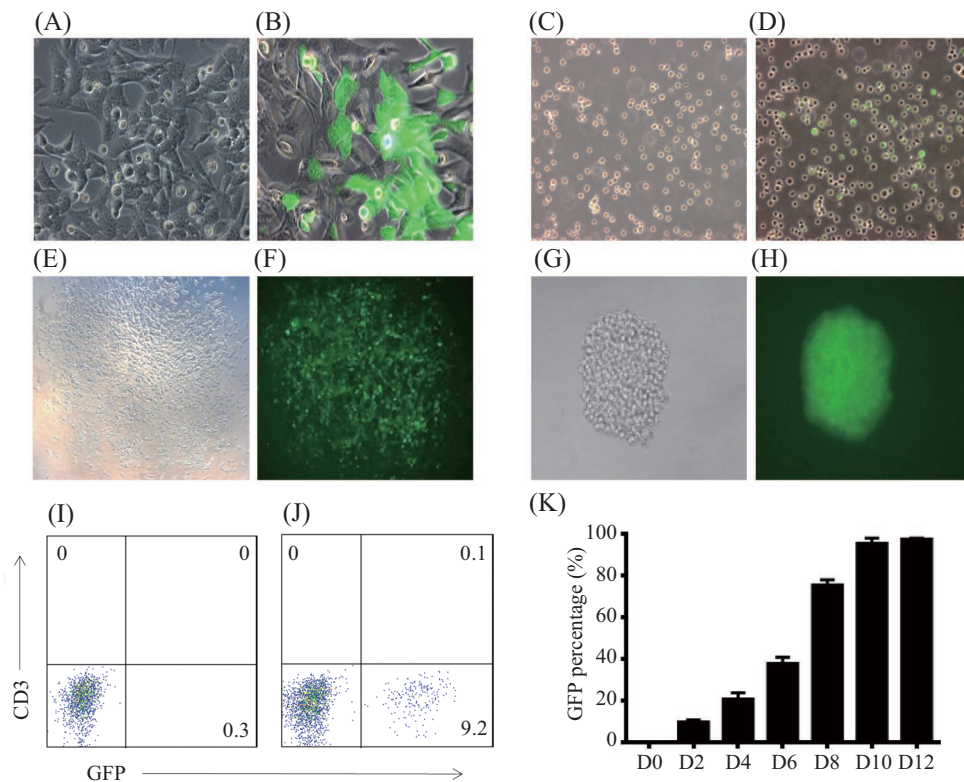
2.2 逆转录病毒置换组件细胞系的建立

为了验证这一基因置换载体系统, 我们选择16.113细胞和Jurkat76细胞株为模型, 开展TCR基因置换实验。首先, 制备pMP71-LGFPF逆转录病毒, 以低浓度的逆转录病毒上清(MOI=1:10病毒/细胞)转导16.113细胞(图2A和图2B)和Jurkat76细胞株(图2C和图2D)。48 h后, 用FACS仪检测EGFP的表达情况, EGFP⁺的细胞比例代表病毒转导率, 大约为10%(图2I和图2J)。第2 d开始G418筛选, 10 d后得到G418抗性和绿色荧光蛋白阳性的细胞, EGFP的表达接近100%阳性(图2K)。

2.3 TCR基因的置换

在TCR置换载体中, TCR基因前无启动子, 随机整合难以表达TCR基因。如果发生了RMCE介导的基因置换, TCR基因置于逆转录病毒载体LTR启

动子的控制下, 能够表达成TCR蛋白分子。表达的TCR分子与细胞内CD3分子结合形成复合物, 然后被转运到细胞表面, 从而能被特异性的MAGE-A1多聚体染色。多拷贝的置换底物可能会降低置换效率, 为得到低/单拷贝逆转录病毒细胞系, 以提高Dual-RMCE的效率, 我们先将neo抗性和绿色荧光蛋白阳性的细胞经过有限稀释法得到单克隆细胞株, 挑取7个16.113克隆(图2E和图2F)和48个Jurkat76克隆(图2G和图2H), 进行TCR基因置换实验。利用电转法将pDRAV-3-LTCRF质粒和pDIRE-iCre/Flp重组酶双质粒共转染到EGFP⁺G418^R Jurkat76细胞克隆(图3A)内, 用流式细胞术检测RMCE介导的TCR基因置换结果。Jurkat76单克隆在RMCE基因置换反应5 d后经过潮霉素的筛选(图3B), 可以见到约5%的细胞表达CD3分子, GFP表达减少至大约82%左右, 还未见明显筛选效果。筛选6~10 d后, EGFP⁺的细胞逐步

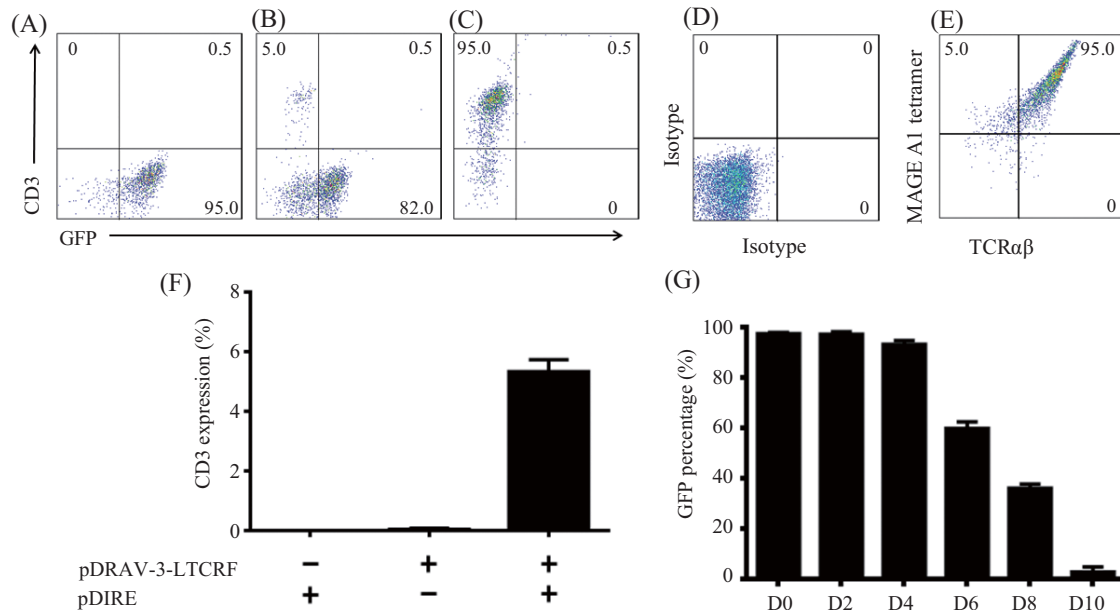


A: 未转导的16.113细胞(Day 0, D0); B: 转导48 h后的16.113细胞(Day 2, D2); C: 未转导的Jurkat76细胞(D0); D: 转导48 h后的Jurkat76细胞(D2); E、F: 16.113细胞经过有限稀释得到的单个细胞克隆; G、H: Jurkat76细胞单个细胞克隆。A、C、E和G为可见光照片; B、D、F和H为荧光照片。A、B、E~H放大倍数为100×, C和D为200×。I: Jurkat76细胞转导前; J: Jurkat76细胞转导后; K: Jurkat76细胞转导后, G418药物筛选, 用流式细胞术记录从第0 d到第12 d GFP表达的情况, 每2 d检测1次。

A: the untransduced 16.113 cells (Day 0, D0); B: the 16.113 cells after transduced 48 h (Day 2, D2); C: the untransduced Jurkat76 cells (D0); D: the Jurkat76 cells transduced after 48 h (D2); E,F: the monoclonal cells of 16.113; G,H: the monoclonal Jurkat76 cells. The magnification was 100× for A,B and E-H, while 200× for C and D; I: Jurkat76 cells before transduced; J: Jurkat76 cells after transduced; K: after retroviral transduction, G418 was added into the Jurkat76 cells culture medium, from the day 2 (D2) to day 12 (D12), the expression of GFP was traced by FACS every two days.

图2 获取低或单拷贝 $loxP$ -EGFPneo-FRT的单克隆细胞

Fig.2 Obtaining the single cell clones with one copy or low copy of retroviral integration



A: G418^R Jurkat76细胞克隆流式细胞检测结果, 95%以上的细胞为GFP阳性; B: Jurkat76单克隆在Dual-RMCE介导的TCR基因置换5 d后, 可见约5%的细胞表达CD3分子; C: 潮霉素药物筛选10 d后, Jurkat76细胞完全表达CD3, 不表达GFP; D: 同型抗体对照; E: MAGE-A1₂₇₈-HLA-A2多聚体染色; F: 检测RMCE的特异性, 加入不同的质粒载体, 对6个Jurkat76克隆分别进行电转实验; G: 监测Jurkat76单克隆GFP的表达。

A: G418^R Jurkat76 monoclonal cells were measured with flow cytometry, all cells expressed GFP; B: after 5 days Dual-RMCE mediated TCR replacement in the GFPneo monoclonal cells by transfected with the replacement vector pDRAV-3-LTCRF and recombinase-expressing plasmid pDIRE, 5% Jurkat76 cells expressed the CD3-TCR complex on the cell surface, and delete GFP; C: adding hygromycin 10 days later, all the Jurkat76 cells were expressed the CD3 molecule; D: isotype control; E: MAGE-A1₂₇₈-HLA-A2 multimer staining; F: the identification of the specificity of Dual-RMCE. The electroporation experiments were carried out using different plasmids on the six Jurkat76 monoclonal cells. G: monitoring the GFP expression of the Jurkat76 cells.

图3 TCR置换实验

Fig.3 TCR replacement experiments

减少; 潮霉素药物筛选10 d后, Jurkat76细胞完全表达CD3, 不表达EGFP(图3C), 这表明存活的细胞EGFP基因完全被TCR基因置换。为检测Jurkat76细胞株TCR的表达情况, 用TCR抗体染色细胞, 表达CD3的Jurkat76细胞完全表达目的基因TCR, 图3D为抗体同型对照。为检测TCR分子的特异性, 用MAGE-A1多聚体染色细胞, 发现TCR阳性的细胞均为MAGE-A1阳性的细胞(图3E)。为了检测RMCE介导的基因置换特异性, 我们设计了三组电转实验, 分别为只加置换载体(pDRAV-3-LTCRF)组、只加重组酶(pDIRE)组和置换载体+重组酶组。通过多次验证, 只有在两者同时存在时才发生RMCE置换事件(图3F), 置换效率约为5%。Jurkat76单克隆细胞置换实验用流式细胞术动态监测GFP消失情况(图3G)。

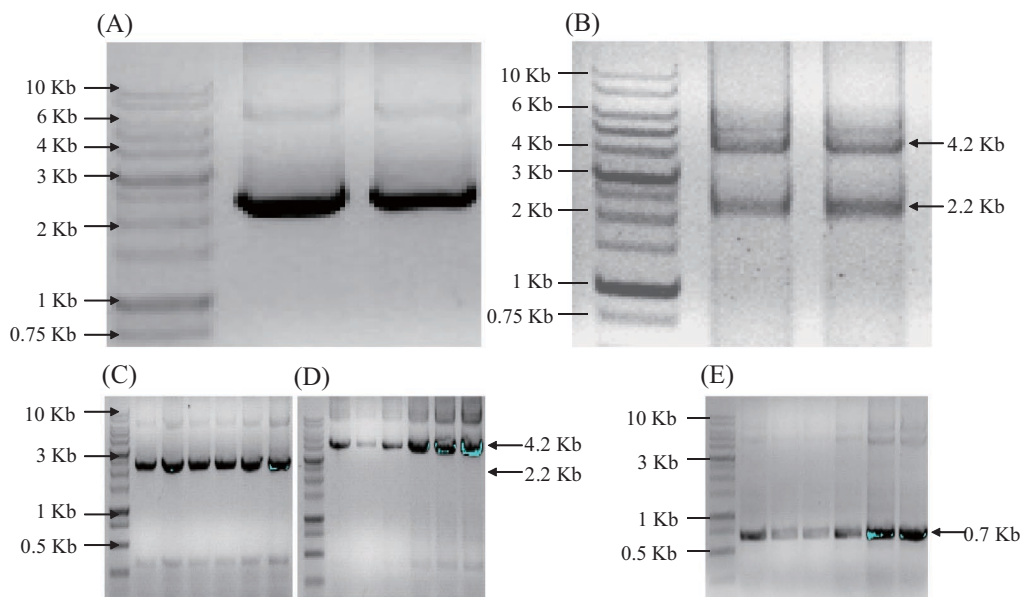
2.4 TCR基因置换的验证和特异性检测

为验证是否能在16.113和Jurkat76细胞中进行RMCE反应, 我们用PCR方法检测DNA片段的置换。在不挑选克隆的情况下, 直接加入G418对感染后的细胞株进行筛选, 得到多克隆的GFP⁺G418^R Jurkat76

细胞(图4A)。因为含有多拷贝的逆转录病毒基因整合, 在基因置换时, 可能只发生部分拷贝基因置换, 因此, PCR检测得到置换和未置换的两条带(图4B)。为得到单拷贝置换组件的单克隆细胞系, 经过有限稀释法分离得到48个单克隆细胞株。这48个Jurkat76克隆株中, 有6个细胞株经过GFP检测, 能完全发生RMCE导致的EGFP表达消失(结果未显示), 这6株Jurkat76细胞把TCR-HygroB基因整合到基因组上, PCR检测发现只有一条4.2 Kb大小的置换DNA带(图4D), 而7个16.113细胞克隆株中, 只见到1个克隆有完全基因置换的事件发生(结果未显示)。在成功置换的克隆株中, 应用P1和P3(置换基因内部引物)作为引物进行扩增。PCR结果表明, 有发生RMCE才会出现0.7 Kb条带, 而且随机整合的TCR片段不会出现这一特异性条带, 进一步证明了RMCE的准确性和特异性(图4E)。

3 讨论

TCR基因治疗的抗肿瘤基础是肿瘤细胞表达各



A: 未进行单细胞克隆挑取的GFP⁺G418^R细胞(泳道分布为: 左边为DNA分子量标准, 中间为GFP⁺G418^R Jurkat76, 右边为GFP⁺G418^R 16.113); B: 未进行单细胞克隆挑取的Dual-RMCE/TCR细胞(泳道分布为: 左边为DNA分子量标准, 中间为Dual-RMCE/TCR Jurkat76, 右边为Dual-RMCE/TCR 16.113); C: 6个GFP⁺G418^R Jurkat76单克隆细胞系; D: 6个TCR基因置换后的Dual-RMCE/TCR Jurkat76单克隆细胞系。A~D: 选用P1和P2作为引物, 2.2 Kb为GFPneo条带, 4.2 Kb为TCR-Hygro条带; E: 6个TCR基因置换后的Dual-RMCE/TCR Jurkat76单克隆细胞系, 用P1和P3作为引物, TCR基因完全置换后的扩增条带为0.7 Kb。

A: the genomic DNA PCR result of GFP⁺G418^R cells, which were polyclonal (Left lane: DNA ladder; middle lane: Jurkat76 cells; right lane: 16.113 cells). PCR amplicon with the P1 and P2 primers is 2.2 Kb band). B: the genomic DNA PCR result of cells after Dual-RMCE; TCR-Hygro^R Jurkat76 cells and 16.113 cells was polyclonal (Left lane: DNA Ladder; Middle lane: Jurkat76 cells; Right lane: 16.113 cells). Amplified with the P1 and P2 primers, the band is 4.2 Kb. C: six Jurkat76 monoclones before the RMCE; D: six Jurkat76 monoclones after the RMCE; A~D: chose the P1 and P2 as PCR primers, 2.2 Kb band was GFPneo, the 4.2 Kb band was TCR-Hygro; E: to test the specificity of the RMCE, the P1 and P3 as the primers were used, after RMCE a 0.7 Kb band saw in the PCR bands in all the six clones.

图4 TCR基因置换的PCR验证

Fig.4 Identifying the specificity of Dual-RMCE by PCR

种HLA提呈的肿瘤抗原和存在能够识别相应抗原的TCR基因。在胸腺发育成熟后的T细胞对自身抗原不产生免疫应答, 这种行为称为中央耐受^[21]。在中央耐受机制的作用下, T细胞经历阴性筛选, 一些对间质细胞表达和呈递的自身抗原具有高亲和力的T细胞克隆被清除, 留下的正常T细胞库不会对自身组织产生免疫反应。为了克服免疫耐受和得到高亲和力的抗肿瘤TCR基因, 李亮平等^[22]在德国分子医学中心(Max Delbrueck Center for Molecular Medicine, MDC)构建了TCR-HLA人源化小鼠(ABAbDII)。利用该小鼠模型分离到了一系列高亲和力肿瘤抗原特异性的TCR^[17]。将这些肿瘤抗原特异性TCR基因通过逆转录病毒载体技术转入原代T细胞, 然后将这些T细胞在体外活化和扩增后, 回输到肿瘤患者体内, 以开展TCR-T细胞免疫治疗。这一免疫治疗策略能够导致肿瘤明显消退^[23]。但是, TCR-T细胞疗法仍然存在一些问题。

第一, 这些转入的TCR分子会与内源性的TCR链

($\alpha\beta$)形成异源二聚体, 可能形成自身反应性TCR分子。这些自身反应性TCR会表达在T细胞表面上, 可能会与自身的抗原分子结合, 产生自身免疫反应。在小鼠体内证实了会诱发致死性的GVHD等疾病^[15]。为了克服异源二聚体带来的副作用, Bunse等^[24]尝试应用RNAi干扰技术, 将T细胞内源性的TCR链沉默, 形成了只表达外源性抗原特异性的TCR的原代T细胞, 以避免GVHD的形成, 但RNAi技术并不能完全抑制内源性TCR的表达。更好的解决办法是进行干细胞TCR基因修饰^[25-27]。干细胞在体内外有比较大的增殖潜能, 可以分化为成熟的T细胞。由造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)分化的淋巴祖细胞在胸腺发育分化到T细胞过程中, 存在等位基因的排斥效应(allelic exclusion)^[28], 即已重排的TCR $\alpha\beta$ 基因可以抑制未重排的TCR $\alpha\beta$ 链基因的重排。外源性已重排的TCR基因可以抑制内源性TCR基因重排, 导致大部分的T细胞只表达转入的外源性TCR。利用这一现象在干细胞转入TCR基因就能够得到大量单一

抗原特异性的T细胞,有可能排除TCR错配带来的副作用。Starck等^[29]利用TCR修饰的HSC细胞,再结合分化技术生产出抗原特异性的T细胞。第二,TCR-T多拷贝逆转录病毒随机插入会引起基因灭活。一些临床试验研究表明,干细胞基因治疗需要大量输入逆转录病毒基因修饰的干细胞(大约需要 $10^8\sim 10^9$ 个HSC)。将这些干细胞回输到患者体内,其中有极少数细胞在一些重要的基因上发生了基因插入突变,如:活化原癌基因Lmo2启动子诱发白血病^[30]、灭活抑癌基因p53诱发白血病^[31-32]、改变转录因子的活性(Ebfl)导致B细胞和巨噬细胞发育障碍^[33]、诱发染色体易位(NUP98-TOP1)^[34],在经过体内大量增殖,有些细胞克隆能诱发白血病。

根据这些观察我们提出,明显减少TCR基因插入的数量就可以解决TCR基因治疗存在的插入突变问题。为此,我们成功建立了Dual-RMCE介导TCR基因置换系统,该系统能够快速实现TCR基因定点置换,得到肿瘤抗原特异性的TCR表达细胞系,可以解决TCR错配和逆转录病毒多拷贝随机整合带来的副作用。当采用单/低拷贝的逆转录病毒随机整合,结合挑出单细胞克隆进行大量扩增,得到的细胞只含有一个插入位点,转基因插入灭活抑癌基因几率非常低,大约为 $1/10^9$,这样既能够满足单一表达肿瘤抗原特异性的TCR,又不会引起白血病和GVHD。Dual-RMCE是重组酶介导的基因组定点高效基因置换技术,利用目的基因片段两侧DNA交换组件(loxP、FRT等)能够特异性地被重组酶(Cre、Flp酶等)识别,并导致交换组件间整个DNA片段的置换^[35]。交换组件在自然界只存在于噬菌体中,在原核生物和真核生物基因组中不存在。所以在真核生物中进行RMCE时,首先需要引入交换组件,传统方式是通过同源重组载体DNA转染,在细胞同源重组的机制作用下在基因原位引入单一拷贝的交换组件,但同源重组的效率太低,约 $10^{-7}\sim 10^{-4}$ 。本研究通过逆转录病毒转基因的途径,高效地将基因交换组件(loxP和FRT位点)随机插入基因组中。挑出单细胞克隆后再将重组酶编码的质粒载体和含有交换组件的感兴趣基因供体质粒,在重组酶识别特异性位点(如: Cre酶识别loxP序列, Flp酶识别FRT序列等),基因组和供体质粒中含有相同方向交换组件的片段会发生交换(图1)。为了实现TCR基因交换,我们结合逆转录病毒转导TCR基因技术和Dual-RMCE技术^[36], Engels

等^[20]建立了成熟的TCR逆转录病毒转导系统。

为得到低/单拷贝交换组件,再挑取了48个Jurkat76单克隆细胞之后,发现只有6个细胞克隆能进行完全地Dual-RMCE介导的TCR基因置换。这个结果表明,这6个克隆与剩下的42个克隆可能存在着差异。因为在引入loxP和FRT置换组件时,采用低滴度逆转录病毒介导的整合,其引入的位置是随机的。但是,重组酶的比较容易结合常染色质部位,在识别loxP和FRT位点后,介导位点间基因片段进行交换。本次实验中, Dual-RMCE的效率为5%,这与Anderson等^[37]在CHO细胞系中,同样应用pDIRE这一重组酶系统的结果比较一致。在这种基因置换效率的情况下,这6个能成功置换的克隆,可能是单拷贝的整合,而不是多拷贝的。本实验中Dual-RMCE系统是Osterwalder等^[16]优化后的,比同源重组基因打靶的最高效率要高出10~50倍,足以高效置换表达TCR基因。与Anderson等^[37]的研究成果对比,我们的置换效率还可以进一步提高。他们的实验结果提示, Cre/Flp酶可以用P2A序列连接在一起,同在一个强启动子(如: CMV启动子)下表达,如同时采用突变型loxP置换元件(如: loxP66/71)^[38], Dual-RMCE的效率可以达到25%左右。

综上所述,本研究结果显示,结合逆转录病毒和Dual-RMCE技术,在Jurkat76细胞实验模型中能够快速表达抗原特异性的TCR分子。未来这一系统可用于修饰人ES/iPS细胞系,产生TCR-ES/iPS细胞,利用体外或者体内分化技术产生大量的肿瘤抗原特异性的T细胞,可以克服在传统的TIL细胞治疗方法体外活化加细胞因子扩增得到的细胞数量少的问题;同时,可降低逆转录病毒随机整合带来的副作用,也可以避免内外源性TCR随机组合形成的自身反应性TCR分子。这个系统可实现逆转录病毒TCR基因治疗的安全应用,为临床抗肿瘤T细胞免疫治疗提供一个可靠的新技术。

参考文献 (References)

- 1 Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348(6230): 62-8.
- 2 Nurieva R, Wang J, Sahoo A. T-cell tolerance in cancer. *Immunotherapy* 2013; 5(5): 513-31.
- 3 Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015; 348(6230): 74-80.
- 4 Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;

- 8(10): 577-85.
- 5 Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol* 2011; 29(11): 550-7.
- 6 Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, *et al.* Gene transfer into humans—immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 323(9): 570-8.
- 7 Tran E, Rosenberg SA. T-cell therapy against cancer mutations. *Oncotarget* 2014; 5(13): 4579-80.
- 8 Linnemann C, Schumacher TN, Bendle GM. T-cell receptor gene therapy: Critical parameters for clinical success. *J Invest Dermatol* 2011; 131(9): 1806-16.
- 9 Phan GQ, Rosenberg SA. Adoptive cell transfer for patients with metastatic melanoma: the potential and promise of cancer immunotherapy. *Cancer Control* 2013; 20(4): 289-97.
- 10 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365(8): 725-33.
- 11 Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Chimeric antigen receptor-modified T cells in CLL. *N Engl J Med* 2011; 365(20): 1937-8.
- 12 Turcotte S, Gros A, Tran E, Lee CC, Wunderlich JR, Robbins PF, *et al.* Tumor-reactive CD8⁺ T cells in metastatic gastrointestinal cancer refractory to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2014; 20(2): 331-43.
- 13 Ailles LE, Humphries RK, Thomas TE, Hogge DE. Retroviral marking of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate long-term culture and growth in immunodeficient mice. *Exp Hematol* 1999; 27(11): 1609-20.
- 14 van Loenen MM, de Boer R, Amir AL, Hagedoorn RS, Volbeda GL, Willemze R, *et al.* Mixed T cell receptor dimers harbor potentially harmful neoactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(24): 10972-7.
- 15 Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, *et al.* Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med* 2010; 16(5): 565-70.
- 16 Osterwalder M, Galli A, Rosen B, Skarnes WC, Zeller R, Lopez-Rios J. Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles. *Nat Methods* 2010; 7(11): 893-5.
- 17 Obenaus M, Leitao C, Leisegang M, Chen X, Gavvovidis I, van der Bruggen P, *et al.* Identification of human T-cell receptors with optimal affinity to cancer antigens using antigen-negative humanized mice. *Nat Biotech* 2015; 33(4): 402-7.
- 18 Sommermeyer D, Neudorfer J, Weinhold M, Leisegang M, Engels B, Noessner E, *et al.* Designer T cells by T cell receptor replacement. *Eur J Immunol* 2006; 36(11): 3052-9.
- 19 Willmsky G, Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005; 437(7055): 141-6.
- 20 Engels B, Cam H, Schuler T, Indraccolo S, Gladow M, Baum C, *et al.* Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 2003; 14(12): 1155-68.
- 21 Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 571-606.
- 22 Li LP, Lampert JC, Chen X, Leitao C, Popovic J, Muller W, *et al.* Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire. *Nat Med* 2010; 16(9): 1029-34.
- 23 Rosenberg SA, Dudley ME, Restifo NP. Cancer immunotherapy. *N Engl J Med* 2008; 359(10): 1072.
- 24 Bunse M, Bendle GM, Linnemann C, Bies L, Schulz S, Schumacher TN, *et al.* RNAi-mediated TCR knockdown prevents autoimmunity in mice caused by mixed TCR dimers following TCR gene transfer. *Mol Ther* 2014; 22(11): 1983-91.
- 25 Awong G, La Motte-Mohs RN, Zuniga-Pflucker JC. *In vitro* human T cell development directed by notch-ligand interactions. *Methods Mol Biol* 2008; 430: 135-42.
- 26 Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, Palmer DC, Kaiser A, Yu Z, *et al.* Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J Clin Invest* 2007; 117(2): 492-501.
- 27 de Pooter RF, Zuniga-Pflucker JC. Generation of immunocompetent T cells from embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 2007; 380: 73-81.
- 28 Mostoslavsky R, Alt FW, Rajewsky K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 2004; 118(5): 539-44.
- 29 Starck L, Popp K, Pircher H, Uckert W. Immunotherapy with TCR-redirected T cells: Comparison of TCR-transduced and TCR-engineered hematopoietic stem cell-derived T cells. *J Immunol* 2014; 192(1): 206-13.
- 30 Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302(5644): 415-9.
- 31 Ben-David Y, Lavigne A, Cheong G, Bernstein A. Insertional inactivation of the p53 gene during friend leukemia: A new strategy for identifying tumor suppressor genes. *New Biol* 1990; 2(11): 1015-23.
- 32 Wong KS, Li YJ, Howard J, Ben-David Y. Loss of p53 in F-MuLV induced-erythroleukemias accelerates the acquisition of mutational events that confers immortality and growth factor independence. *Oncogene* 1999; 18(40): 5525-34.
- 33 Heckl D, Schwarzer A, Haemmerle R, Steinemann D, Rudolph C, Skawran B, *et al.* Lentiviral vector induced insertional haploinsufficiency of Ebf1 causes murine leukemia. *Mol Ther* 2012; 20(6): 1187-95.
- 34 Gurevich RM, Rosten PM, Schwieger M, Stocking C, Humphries RK. Retroviral integration site analysis identifies ICSBP as a collaborating tumor suppressor gene in NUP98-TOP1-induced leukemia. *Exp Hematol* 2006; 34(9): 1191-1200.
- 35 Turan S, Zehe C, Kuehle J, Qiao J, Bode J. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE)—a rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene* 2013; 515(1): 1-27.
- 36 Turan S, Qiao J, Madden S, Benham C, Kotz M, Schambach A, *et al.* Expanding Flp-RMCE options: the potential of Recombinase Mediated Twin-Site Targeting (RMTT). *Gene* 2014; 546(2): 135-44.
- 37 Anderson RP, Voziyanova E, Voziyanov Y. Flp and Cre expressed from Flp-2A-Cre and Flp-IRES-Cre transcription units mediate the highest level of dual recombinase-mediated cassette exchange. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(8): e62.
- 38 Zhang Z, Lutz B. Cre recombinase-mediated inversion using lox66 and lox71: Method to introduce conditional point mutations into the CREB-binding protein. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(17): e90.