

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

БОБРОВА
Надежда Михайловна

ПЕРЕНОС КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 В
КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Т.В.Романовская

Минск, 2020

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 82, рисунков – 21, таблиц – 8, приложений – 1, источников – 78.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГИБРИДНЫЙ ОНКОГЕН *RUNX1-RUNX1T1*, СИСТЕМА CRISPR/CAS9, ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ.

Объекты исследования: клетки острого миелоидного лейкоза человека Kasumi-1 и клетки эмбриональной почки человека HEK293T.

Цель: осуществление лентивирусной трансдукции клеток немодифицированной линии Kasumi-1 и линии HEK293T, предварительно модифицированной гидРНК к гену *RUNX1T1*, и последующей селекции трансдуктантов на предмет стабильной экспрессии гена Cas9.

Методы: котрансфекция векторами лентивирусной системы, проточная цитофлуориметрия, лентивирусная трансдукция.

Более чем у половины пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) обнаруживаются различные цитогенетические аномалии. Одна из таких аномалий – транслокация $t(8;21)$, следствием которой является образование гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, который играет ключевую роль в становлении лейкозного фенотипа. В связи с этим представляет интерес нокаут данного гибридного онкогена с использованием системы CRISPR/Cas9.

В ходе настоящего исследования была осуществлена котрансфекция клеток линии HEK293T векторами лентивирусной системы. В качестве основной плазмиды использовали плазмиду lenti-Cas9-blast, содержащую ген Cas9, а также ген бластицидиндезаминазы (BSD). Кроме того, была осуществлена оптимизация методики котрансфекции HEK293T. С использованием полученных вирусных частиц успешно проведена лентивирусная трансдукция немодифицированных клеток Kasumi-1 и клеток HEK293T, экспрессирующих гидРНК к гену *RUNX1T1*. Осуществлена селекция трансдуктантов с помощью бластицидина на предмет стабильной экспрессии введенной генетической конструкции. Также были разработаны гидРНК к генам, ассоциированным с лекарственной устойчивостью клеток ОМЛ, и проведена оценка экспрессии целевых генов для линии Kasumi-1 по данным RNA-Seq.

РЕФЕРАТ

Дыпломная праца ўключае: старонак – 82, малюнкаў – 21, табліц – 8, прыкладанняў – 1, крыніц – 78.

Ключавыя словы: ВОСТРЫ МІЯЛОІДНЫ ЛЕЙКОЗ, ГІБРЫДНЫ АНКАГЕН *RUNX1-RUNX1T1*, СІСТЭМА CRISPR/CAS9, ЛЕНТЫВІРУСНАЯ ТРАНСДУКЦЫЯ.

Аб'екты даследавання: клеткі вострага міялоіднага лейкозу чалавека Kasumi-1 і клеткі эмбрыянальнай ныркі чалавека HEK293T.

Мэта: ажыццяўленне лентывіруснай трансдукцыі клетак немадыфікаванай лініі Kasumi-1 і лініі HEK293T, напярэдне мадыфікаванай гідРНК да гену *RUNX1T1*, і селекцыя трансдуктантаў на прадмет стабільнай экспрэсіі гена Cas9.

Метады: катрансфекцыя вектарамі лентывіруснай сістэмы, праточная цытафлюарыметрыя, лентывірусная трансдукцыя.

Больш чым у паловы пацыентаў з вострым міялоідным лейкозам (ВМЛ) выяўляюцца розныя цытагенетычныя анамаліі. Адна з такіх анамалій – транслакацыя t(8;21), следствам якой з'яўляецца атрыманне гібрыднага анкагена *RUNX1-RUNX1T1*, які гуляе ключавую ролю ў станаўленні лейкознага фенатыпу. У сувязі з гэтым уяўляе цікавасць накаўт дадзенага гібрыднага онкагена з выкарыстаннем сістэмы CRISPR/Cas9.

У ходзе гэтага даследавання была ажыццяўлена катрансфекцыя клетак лініі HEK293T вектарамі лентывіруснай сістэмы. У якасці асноўнай плазміды выкарыстоўвалі плазміды lenti-Cas9-blast, якая змяшчае ген Cas9, а таксама ген бластыцыдзіндэзаміназы (BSD). Акрамя таго, была ажыццяўлена аптымізацыя метадыкі катрансфекцыі HEK293T. З выкарыстаннем атрыманых вірусных часцінак паспяхова праведзена лентывірусная трансдукцыя немадыфікаваных клетак Kasumi-1 і клетак HEK293T, якія атрымалі здольнасць да экспрэсіі гідРНК да гену *RUNX1T1*. Ажыццяўлена селекцыя трансдуктантаў з дапамогай бластыцыдзіна на прадмет стабільнай экспрэсіі ўведзенай генетычнай канструкцыі. Таксама былі распрацаваны гідРНК да генаў, звязаных з лекавай устойлівасцю клетак ВМЛ, і праведзена ацэнка экспрэсіі мэтавых генаў для лініі Kasumi-1 па дадзеных RNA-Seq.

ABSTRACT

The graduation project includes: pages – 82, figures – 21, tables – 8, applications – 1, sources – 78.

Key words: ACUTE MYELOID LEUKEMIA, FUSION ONCOGENE *RUNX1-RUNX1T1*, CRISPR/CAS9 SYSTEM, LENTIVIRAL TRANSDUCTION.

Objects of investigation: Kasumi-1 human acute myeloid leukemia cells and HEK293T human embryonic kidney cells.

The aim was a lentiviral transduction of unmodified Kasumi-1 cells and HEK293T cells carrying the guideRNA targeting *RUNX1T1* gene, and subsequent selection of transductants for stable expression of the Cas9 gene.

Methods: co-transfection with the use of lentiviral vector system, flow cytometry, lentiviral transduction.

More than half of patients with acute myeloid leukemia (AML) have various cytogenetic abnormalities. One of these anomalies is the translocation t(8;21). It results in formation of a hybrid oncogene *RUNX1-RUNX1T1*, which plays a key role in acquisition of leukemic phenotype. In this regard, the knockout of this hybrid oncogene using the CRISPR/Cas9 system is of interest.

In the course of this study, HEK293T cells were co-transfected using lentiviral vector system. The lenti-Cas9-blast plasmid containing the Cas9 gene as well as the blasticidin deaminase gene (BSD) was used as the main plasmid. In addition, the HEK293T co-transfection technique was optimized. Lentiviral transduction of unmodified Kasumi-1 cells and HEK293T cells expressing the *RUNX1T1* gene was successfully performed using the obtained viral particles. Transductants were selected using blasticidin for stable expression of the introduced genetic construction. The guideRNAs targeting genes associated with drug resistance of AML cells were also developed; the expression of target genes for the Kasumi-1 line was evaluated using RNA-Seq data.