ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОКАУТА Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И МНСІ В КЛЕТКАХ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПРЕССИОННЫХ КАССЕТ

Е. С. Покладок, А. Н. Мелешко, Е. В. Кушнерова

*РНПЦ Детской онкологии гематологии и иммунологии, д.Боровляны,
Республика Беларусь*

Адаптивная клеточная терапия Т-лимфоцитами ограничена аутологичным получением клеток, поскольку аллогенные Т-лимфоциты провоцируют развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и сопровождающий любого рода трансплантацию синдром отторжения трансплантата [1, 2]. Эффект РТПХ опосредован наличием на мембране клеток донора Т-лимфоцитов Т-клеточного рецептора, который способен связываться с чужеродным для него антигеном, присутствующим на клетках реципиента [3]. Отторжение трансплантата связано с презентацией антигенов донора в составе МНСІ и распознавание их Т-лимфоцитами реципиента.

Элиминация данных рецепторов способна решить вопрос с аллогенной трансплантацией Т-лимфоцитов, в частности в разработке аллогенных CAR-T. Получение CAR-T с использованием здоровых клеток донора решает многие проблемы аутологичной CAR-T-терапии: высокая стоимость, длительность производства и, собственно, невозможность производства CAR-T из собственных клеток пациента [4]. Белковый продукт гена TRAC является константным доменом α цепи Т-клеточного рецептора. Продукт гена B2M – компонент легкой цепи МНСІ. Нокаут данных генов приведет к потере экспрессии Т-клеточного рецептора и МНСІ.

Целью работы является оценка эффективности редактирования генов TRAC и B2M CRISPR/Cas9 системой с использованием собранных нами экспрессионных кассет.

Материалы и методы: в качестве модельной культуры была использована клеточная линия Т-лимфоцитов Jurkat. Выбор наилучших sgRNA B2M3 и TRAC2 проведен на предыдущем этапе работы [5]. Нами были собраны 4 варианта экспрессионных кассет: PTG2g–sgRNA B2M3 и TRAC2 находятся под одним человеческим промотором U6 и разделены tRNA; 2hU6 – обе sgRNA находятся под человеческими промоторами U6 и на одной цепи; mhU6_MM – sgRNA B2M под мышинным промотором U6, sgRNA TRAC под человеческим промотором U6, на одной цепи; mhU6_PM – sgRNA TRAC под промотором человека U6 на минус цепи, sgRNA B2M под мышинным промотором U6 на плюс цепи. Вектором доставки выступал LentiCRISPR-EGFP-Cas9, клонирование описанных фрагментов в который осуществлялось по сайтам рестрикции KpnI и EcoRI. Собранные векторные конструкции использовались для получения вирусных частиц, трансфекция проводилась на культуре HEK293T. Полученные вирусные частицы использовались для доставки sgRNA и Cas9 в Т-лимфоциты методом трансдукции. Эффективность нокаута оценивалась на проточном цитометре на 3 сут. после трансдукции после окрашивания модифицированных культур антителами anti-CD3-PacificOrange и anti-B2M-PerCP-Cy5.5.

Результаты: эффективность нокаута PTG2g – для B2M 0%, для TRAC 23,1%; 2hU6 – для B2M 1%, для TRAC 56%; mhU6_MM – для B2M 11,6%, для TRAC 63,9%;

mhU6_PM – для B2M 4,6%, для TRAC 42,7%. Наиболее успешным вариантом сочетания промоторов и sgRNA стала конструкция с человеческим и мышиным промотором, лежащим на одной цепи ДНК – mhU6_MM.

Библиографические ссылки

1. Donor regulatory T cells rapidly adapt to recipient tissues to control murine acute graft-versus-host disease / D. J. Dittmar [et al.] // *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, iss. 1. P. 3224.
2. Graft-versus-host disease modulation by innate T cells / Y. Fang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, iss. 4. P. 4084.
3. Potential of TCR sequencing in graft-versus-host disease / M. Goel [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* 2023. Vol. 58, iss. 3. P. 239–246.
4. Universal CARs, universal T cells, and universal CAR T cells / J. Zhao [et al.] // *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11. P. 1–11.
5. Нокаут генов Т-клеточного рецептора и HLA класса I в клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9 / Е. В. Кушнерова [и др.] // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2022. № 2. С.19–26.