

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики**

ПОКЛАДОК
Екатерина Сергеевна

**ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ С
НОКАУТОМ ГЕНОВ TRAC И B2M**

Аннотация к дипломной работе

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

Минск, 2024

РЕФЕРАТ

Дипломная работа содержит 43 страницы, 11 рисунков, 4 таблицы, 36 использованных источников.

Ключевые слова: АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ, РТПХ, ОТТОРЖЕНИЕ ТРАНСПЛАНТАТА, CRISPR/CAS9, Т-КЛЕТОЧНЫЙ РЕЦЕПТОР, МНСI.

Объект исследования: Линия Т-лимфоцитов Jurkat, плазмидный вектор LentiCrispr, ген Cas9.

Цель работы: Получить культуру Т-лимфоцитов с нокаутом генов TRAC и B2M.

Методы исследования: ПЦР-скрининг, выделение плазмидной ДНК, рестрикция, лигирование, электрофорез в агарозном геле, синтез мРНК *in vitro*, работа с проточным цитометром, трансфекция, трансдукция, электропорация.

Полученные результаты: Реакция трансплантат против хозяина и отторжения трансплантата являются лимитирующими при использовании аллогенной трансплантации факторами. Поверхностные рецепторы, отвечающие за развитие данных реакций – Т-клеточный рецептор и МНС I класса. Используя систему геномного редактирования CRISPR/Cas9 мы хотим элиминировать данные рецепторы с поверхности мембраны Т-лимфоцитов.

Нами методом селекции была получена культура на 96% состоящая из клеток Т-лимфоцитов, несущих в себе sgRNA к генам B2M и TRAC, продукты которых являются структурными элементами TCR и МНСI. Методом транскрипции *in vitro* была получена mRNA гена Cas9. С помощью электропорации данная mRNA доставлялась в клетки Т-лимфоцитов. Уровень нокаута по гену B2M составил более 50%.

Данные этапы работы являются подготовительными для разработки аллогенной CAR-T клеточной терапии.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца ўтрымлівае 43 старонкі, 11 малюнкаў, 4 табліцы, 36 выкарыстаных крыніц.

Ключавыя словы: АЛЛАГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦЫЯ, РТСГ, АДРЫНЬВАННЕ ТРАНСПЛАНТАНТА, CRISPR/CAS9, Т-КЛЕТКАВЫ РЭЦЭПТАР, МНСІ.

Аб'ект даследавання: лінія Т-лімфацытаў Jurkat, плазмідны вектар

Мэта працы: атрымаць культуру Т-лімфацытаў з накаўтам генаў TRAC і B2M.

Метады даследавання: ПЦР-скрынінг, вылучэнне плазмідной ДНК, рэстрыкцыя, лігирование, электрофарэз ў агарозном гелі, сінтэз мРНК in vitro, праца з праточным цытометром, трансфекцыя, трансдукцыя, электропорацыя.

Атрыманыя вынікі: рэакцыя трансплантаты супраць гаспадара і адрыньвання трансплантанта з'яўляюцца лімітуюцца пры выкарыстанні аллогенных трансплантаты фактарамі. Поверхностныя рэцэптары, якія адказваюць за развіццё дадзеных рэакцый – Т-клеткавы рэцэптар і МНС 1 класа. Выкарыстоўваючы сістэму геномнага рэдагавання CRISPR / Cas9 мы хочам элімінаваць дадзеныя рэцэптары з паверхні мембраны Т-лімфацытаў.

Намі метадам селекцыі была атрымана культура на 96% якая складаецца з клетак Т-лімфацытаў, апорных у сабе sgRNA да генаў B2M і TRAC, прадукты якіх з'яўляюцца структурнымі элементамі TCR і МНСІ. Метадам транскрыпцыі in vitro была атрымана mRNA гена Cas9. З дапамогай электропорацыі дадзеная mRNA дастаўлялася ў клеткі Т-лімфацытаў. Узровень накаўту па гену B2M склаў больш за 50%.

Дадзеныя этапы працы з'яўляюцца падрыхтоўчымі для распрацоўкі аллогенных CAR-T клеткавай тэрапіі.

4

3 *Key words:* ALLOGENEIC TRANSPLANTATION, GVHD, GRAFT
REJECTION, CRISPR/CAS9, T-CELL RECEPTOR, MHCI.

1 *Object of study:* Jurkat T-lymphocyte line, LentiCrispr plasmid vector, Cas9
4gene.

3 *Objective:* To obtain a culture of T lymphocytes with knockout of the TRAC
6nd B2M genes.

Research methods: PCR screening, plasmid DNA isolation, restriction,
ligation, agarose gel electrophoresis, in vitro mRNA synthesis, work with a flow
cytometer, transfection, transduction, electroporation.

Results: The graft-versus-host reaction and graft rejection are limiting factors
when using allogeneic transplantation. The surface receptors responsible for the
development of these reactions are the T-cell receptor and class 1 MHC. Using the
CRISPR/Cas9 genomic editing system, we want to eliminate these receptors from
the surface of the T-lymphocyte membrane.

 By selection, we obtained a 96% culture consisting of T-lymphocyte cells
carrying sgRNA to the B2M and TRAC genes, the products of which are structural
elements of TCR and MHCI. mRNA of the Cas9 gene was obtained by in vitro
transcription. By electroporation, this mRNA was delivered to T-lymphocyte cells.
The B2M gene knockout rate was over 50%.

 These stages of work are preparatory for the development of allogeneic CAR-
T cell therapy.