

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии

ЛЕБЕДЕВА
Юлия Владиславовна

**ПОЛУЧЕНИЕ CAR-NK КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ IL-15 В
СЕКРЕТИРУЕМОЙ И МЕМБРАННОЙ ФОРМАХ**

Аннотация к магистерской диссертации

специальность 7-06-0511-05 Биоинформатика

Научный руководитель:
Белевцев Михаил Владимирович
кандидат биологических наук,
доцент

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Структура магистерской диссертации: работа изложена на 58 страницах, состоит из разделов «Введение», «Аннотация», трех глав, разделов «Заключение» и «Список использованных источников» из 62 наименований. Включает 16 рисунков и 3 таблицы.

Ключевые слова: NK-клетки, CAR-NK, секретируемый IL-15, мембранный IL-15.

Цель работы – разработать генетическую конструкцию, содержащую последовательность IL-15 в секретируемой форме и получить CAR-NK клеток против мишени CD19 (CARantiCD19), экспрессирующие IL-15 в секретируемой и мембранной формах.

Задачи работы:

1) Осуществить сборку векторной конструкции *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15*, содержащей в составе экспрессионной кассеты последовательность химерного антигенного рецептора (CAR) против мишени CD19, а также последовательность секреторного IL-15 (*sIL-15*);

2) произвести трансфекцию клеточной линии *HEK293T* плазмидой *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* и плазмидой *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*;

3) произвести котрансфекцию клеточной линии *HEK293T* трансферными плазмидами (*pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* и *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*) в сочетании с оболочечной (*pBaEV*) и пакующей (*psPAX2*) плазмидами для получения лентивирусных частиц псевдотипированных гликопротеином BaEVg;

4) произвести трансдукцию полученными лентивирусными частицами естественных киллерных клеток (NK-клетки), выделенных из периферической крови здорового донора и определить наличие рецептора CARantiCD19 в составе полученных CAR-NK клеток при помощи цитофлуориметрии;

5) определить наличие мРНК исследуемых цитокинов в составе полученных CAR-NK клеток при помощи ОТ-ПЦР.

Объект исследования – генетически модифицированные NK-клетки.

Предмет исследования – экспрессия секретируемого и мембранного цитокинов IL-15.

Полученные **результаты** и их **новизна**: в рамках данной работы была успешно создана генетическая конструкция, кодирующая химерный антигенный рецептор против CD19 (CARantiCD19) и секретируемую форму IL-15 (*sIL-15*). В сочетании с ранее разработанной конструкцией, экспрессирующей CARantiCD19 и мембраносвязанный IL-15 (*mIL-15*), были получены две уникальные популяции CAR-NK-клеток.

РЭФЕРАТ

Структура магістарскай дысертацыі: работа выкладзена на 58 старонках, складаецца з раздзелаў «Уводзіны», «Анатацыя», трох раздзелаў, раздзелаў «Заклучэнне» і «Спіс выкарыстаных крыніц» са 62 найменняў. Уключае 16 рысункаў і 3 табліцы.

Ключавыя словы: NK-клеткі, CAR-NK, секретируемый IL-15, мембранны IL-15.

Мэта працы - распрацаваць генетычную канструкцыю, якая змяшчае паслядоўнасць IL-15 у секретируемой форме і атрымаць CAR-NK клетак супраць мішэні CD19 (CARantiCD19), якія экспрэсуюць IL-15 у секретируемой і мембраннай формах.

Задачы працы:

1) Ажыццявіць зборку вектарнай канструкцыі *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15*, якая змяшчае ў складзе экспрэсійнай касеты паслядоўнасць хімернага антыгеннага рэцэптара (CAR) супраць мішэні CD19, а таксама паслядоўнасць сакраторнага IL-15 (*sIL-15*);

2) вырабіць трансфекцыю клеткавай лініі *HEK293T* плазмідай *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* і плазмідай *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*;

3) вырабіць котрансфекцыю клеткавай лініі *HEK293T* трансфернымі плазмідамі (*pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* і *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*) у спалучэнні з абалонкавай (*pBaEV*) і пакуючай (*psPAX2*) плазмід для атрымання ленцівірусных часціц, псеўдатыпаваных глікапратэінам BaEVg;

4) правесці трансдукцыю атрыманымі ленцівіруснымі часціцамі натуральных кілерных клетак (NK-клетак), выдзеленых з перыферынай крыві здоровага донара, і вызначыць наяўнасць рэцэптара CARantiCD19 у складзе атрыманых CAR-NK клетак з дапамогай цытафлуорыметрыі;

5) вызначыць наяўнасць мРНК даследуемых цытакінаў у складзе атрыманых CAR-NK клетак з дапамогай АТ-ПЛР.

Аб'ект даследавання – генетычна мадыфікаваныя NK-клеткі.

Прадмет даследавання – экспрэсія сакрэтуемага і мембраннага цытакіну IL-15.

Атрыманыя **вынікі** і іх **навізна**: у межах дадзенай работы была паспяхова створана генетычная канструкцыя, якая кадуе хімерны антыгенны рэцэптар супраць CD19 (CARantiCD19) і сакрэтуемую форму IL-15 (*sIL-15*). У спалучэнні з раней распрацаванай канструкцыяй, якая экспрэсуе CARantiCD19 і мембранозвязаны IL-15 (*mIL-15*), былі атрыманы дзве ўнікальныя папуляцыі CAR-NK-клетак.

ABSTRACT

Structure of the master's thesis: the work is set out on 58 pages, consists of sections «Introduction», «Abstract», three chapters, sections «Conclusion» and «List of used sources» of 62 titles. It includes 16 figures and 3 tables.

Keywords: NK-cells, CAR-NK, secreted IL-15, membrane IL-15.

The aim of the work is to develop a genetic construct containing the sequence of IL-15 in secreted form and to obtain CAR-NK cells against target CD19 (CARantiCD19) expressing IL-15 in secreted and membrane forms.

Objectives of the work:

1) To perform assembly of the vector construct *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* containing the sequence of chimeric antigenic receptor (CAR) against target CD19 as well as the sequence of secretory IL-15 (sIL-15) as part of the expression cassette;

2) transfect the *HEK293T* cell line with plasmid *pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* and plasmid *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*;

3) cotransfection of *HEK293T* cell line with transfer plasmids (*pWPXL_CARa.CD19.P2A.sIL15* and *pULTRA_CARa.CD19.T2A.mIL15*) combined with envelope (*pBaEV*) and packaging (*psPAX2*) plasmids to obtain lentiviral particles pseudotyped with BaEVg glycoprotein;

4) transduce natural killer cells (NK-cells) isolated from the peripheral blood of a healthy donor with the obtained lentiviral particles and determine the presence of CARantiCD19 receptor in the obtained CAR-NK cells by cytofluorimetry;

5) determine the presence of mRNA of the investigated cytokines in the CAR-NK cells using RT-PCR.

The object of the study is genetically modified NK-cells.

The subject of the study is the expression of secreted and membrane-bound cytokine IL-15.

Obtained **results** and their **novelty**: within the framework of this work a genetic construct encoding a chimeric antigenic receptor against CD19 (CARantiCD19) and a secreted form of IL-15 (sIL-15) was successfully created. In combination with a previously developed construct expressing CARantiCD19 and membrane-bound IL-15 (mIL-15), two unique CAR-NK cell populations were obtained.