

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ПОКЛАДОК
Екатерина Сергеевна

РЕДАКТИРОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА И МНСІ В
КУЛЬТУРЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ХИМЕРНЫЙ
АНТИГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР

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 56 страницах, состоит из разделов «Введение», «Аннотация», трех глав, разделов «Заключение» и «Список использованных источников» из 45 наименований. Включает 18 рисунков и 4 таблиц.

Ключевые слова: CAR-T терапия, аллогенная терапия, редактирование генома CRISPR/Cas9, Т-клеточный рецептор, главный комплекс гистосовместимости I класса (MHC I).

Цель работы – получение CAR-T antiCD19, с нокаутом генов TRAC и B2M.

Задачи работы:

- 1) Получить векторную конструкцию с sgRNA TRAC и B2M, химерным антигенным рецептором против CD19 - LentiCRISPR22;
- 2) Получить вирусные частицы и доставить их в культуру первичных Т-лимфоцитов;
- 3) Оценить уровень трансдукции первичных Т-лимфоцитов с помощью проточной цитометрии;
- 4) Доставить источник нуклеазы Cas⁹ (мРНК, плазмидный вектор, белок) методом электропорации;
- 5) Оценить уровень нокаута TCR и MHC I методом проточной цитометрии.

Объект исследования – CAR-T antiCD19 клетки, содержащие экспрессионную кассету с sgRNA TRAC и B2M.

Предмет исследования – наличие Т-клеточного рецептора и главного комплекса гистосовместимости I класса у объекта исследования.

Полученные **результаты** и их **новизна:** в рамках данной работы был получен плазмидный вектор для доставки sgRNA и CAR в клетки Т-лимфоцитов, оптимизирован протокол доставки Cas9, получены аллогенные CAR-T-лимфоциты. При получении положительных результатов тестов на иммунногенность, аллореактивность и функциональную активность данные клетки в дальнейшем могут быть использованы в клинических исследованиях.

РЭФЕРАТ

Структура магістарскай дысертацыі: работа выкладзена на 56 старонках, складаецца з раздзелаў "Уводзіны", "Анатацыя", трох раздзелаў, раздзелаў "Заклучэнне" і "Спіс выкарыстаных крыніц" са 45 найменняў. Уключае 18 рысункаў і 4 табліц.

Ключавыя словы: CAR-T тэрапія, алагенная тэрапія, рэдагаванне геному CRISPR/Cas9, Т-клеткавы рэцэптар (TCR), галоўны камплекс гістасумяшчальнасці I класа (MHC I).

Мэта працы - атрыманне CAR-T antiCD19 з нокаўтам TRAC і B2M.

Задачы працы:

- 1) Атрымаць вектарную канструкцыю з sgRNA TRAC і B2M, хімерным антыгенным рэцэптарам супраць CD19 - LentiCRISPR22;
- 2) Атрымаць вірусныя часціцы і даставіць іх у культуру першасных Т-лімфацытаў;
- 3) Ацаніць узровень трансдукцыі першасных Т-лімфацытаў з дапамогай цытаметрыі;
- 4) Даставіць крыніцу нуклеазы Cas9 (мРНК, плазмідны вектар, бялок) метадам электрапарацыі;
- 5) Ацаніць узровень нокаўту TCR і MHC I метадам цытаметрыі.

Аб'ект даследавання – anti-CD19 CAR-T клеткі з экспрэсійнай касетай sgRNA TRAC і B2M.

Прадмет даследавання – наяўнасць Т-клеткавага рэцэптара і галоўнага комплексу гістасумяшчальнасці I класа у аб'екта даследавання.

Атрыманыя **вынікі** і іх **навізна**: у межах дадзенай работы быў атрыманы плазмідны вектар для дастаўкі sgRNA і CAR у Т-лімфацыты, аптымізаваны пратакол дастаўкі Cas9, сінтэзаваны алагенныя CAR-T-лімфацыты. Пры наяўнасці станоўчых вынікаў тэстаў на імунагеннасць, аларэактыўнасць і функцыянальную актыўнасць, дадзеныя клеткі ў далейшым могуць быць выкарыстаны ў клінічных даследаваннях.

ABSTRACT

Structure of the master's thesis the work is set out on 56 pages, consists of sections "Introduction", "Abstract", three chapters, sections "Conclusion" and "List of used sources" of 45 titles. It includes 18 figures and 4 tables.

Keywords: CAR-T therapy, allogeneic therapy, CRISPR/Cas9 genome editing, T-cell receptor (TCR), major histocompatibility complex class I (MHC I).

The aim of the work is generation of anti-CD19 CAR-T cells with TRAC and B2M knockout.

Objectives of the work:

- 1) Obtain a vector construct containing TRAC and B2M sgRNAs and an anti-CD19 chimeric antigen receptor - LentiCRISPR22;
- 2) Produce viral particles and deliver them into primary T lymphocyte culture;
- 3) Evaluate transduction efficiency of primary T lymphocytes using flow cytometry;
- 4) Deliver Cas9 nuclease source (mRNA, plasmid vector, protein) via electroporation;
- 5) Assess TCR and MHCI knockout levels by flow cytometry.

The object of the study is anti-CD19 CAR-T cells containing the expression cassette with TRAC and B2M sgRNAs.

The subject of the study is presence of T-cell receptor and major histocompatibility complex class I in the study object.

Obtained **results** and their **novelty**: within this study, we successfully developed a plasmid vector for simultaneous delivery of sgRNA and CAR constructs into T-lymphocytes, optimized the Cas9 delivery protocol, and generated allogeneic CAR-T lymphocytes. Upon confirmation of positive results in immunogenicity, alloreactivity and functional activity testing, these engineered cells may subsequently advance to clinical trials.