

Выбор системы сборки вирусоподобных частиц с рибонуклеопротеиновыми комплексами Cas9 и Cas12a для редактирования генов, релевантных для получения CAR T-клеток.

Научный руководитель – Круглова Наталья Андреевна

Сильченко Дарья Алексеевна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия

E-mail: dsilch.work@mail.ru

CAR-T клеточная терапия на сегодняшний день демонстрирует значительные успехи в лечении различных онкологических заболеваний, в особенности гематологических. Однако её эффективность ограничена недостаточной активностью CAR-T клеточного препарата, а также возникновением реакции трансплантата против хозяина и иммунного отторжения. Для повышения эффективности CAR-T клеточной терапии и снижения риска побочных эффектов используются различные подходы, один из которых основан на геномном редактировании. Наиболее перспективными мишенями являются гены, кодирующие T-клеточный рецептор, например ген *TRAC*, и ген *B2M*, нокаут которых может позволить получить универсальные CAR-T клетки. Также интерес представляют гены иммунных контрольных точек, *PDCD1* и *CTLA4*, нокаут которых может позволить снизить влияние супрессорного опухолевого окружения.

Технология CRISPR/Cas является наиболее распространенным методом направленного изменения генов. Однако важной задачей является поиск наиболее эффективных способов ее доставки. Для T-клеток сейчас таким способом является электропорация, которая обладает высокой токсичностью и неприменима *in vivo*. Альтернативным подходом может быть доставка рибонуклеопротеиновых комплексов нуклеазы и гидовой РНК (гРНК) при помощи вирусоподобных частиц (VLP) на основе структурных белков ВИЧ. Целью данной работы стало сравнение трёх систем сборки VLP, две из которых основаны на слиянии нуклеазы Cas и белка Gag (системы Cas-VLP и eVLP), а третья система NanoMEDIC – на формировании комплекса между FKBP12-Gag и FRB-Cas в присутствии аналога рапамицина AP21967. Все три типа VLP были протестированы с двумя типами нуклеаз – SpCas9 и AsCas12a. Ранее сравнения между собой данных систем не проводилось, как и VLP с нуклеазами различных типов. В качестве мишеней для редактирования были выбраны гены *TRAC*, *B2M*, *PDCD1* и *CTLA4*.

Сначала были подобраны несколько гРНК для каждой мишени. Все гРНК были протестированы в формате плазмид в условиях электропорации в T клеточной линии Jurkat, уровень редактирования для локусов *TRAC*, *B2M*, *PDCD1* оценивали методом проточной цитометрии (для *PDCD1* – в условиях активации клеток), а для локуса *CTLA4* – методом ICE. Были выбраны наиболее эффективные гРНК для каждой нуклеазы и каждого локуса. Далее с помощью продукции в клетках 293T были получены шесть типов VLP с гРНК против *B2M* и проведено их тестирование в клетках Jurkat. При сравнении трёх систем сборки и двух нуклеаз наиболее эффективной оказалась система eVLP с нуклеазой SpCas9, для которой максимальный уровень нокаута составил около 55%. Для VLP NanoMEDIC максимальный уровень нокаута был равен 50%, для системы Cas-VLP – 40%. Таким образом, было проведено сравнение трех типов VLP с двумя нуклеазами для редактирования локуса *B2M*, а также была выделена наиболее эффективная система доставки eVLP и нуклеаза SpCas9. В дальнейшем VLP будут использованы для нокаута

генов *TRAC*, *PDCD1* и *CTLA4*, после чего редактирование будет выполнено в первичных Т клетках.