

Получение double-нокаутной клеточной линии 293T ASCT1-/ASCT2- для получения лентивекторов, псевдотипированных белком ВаЕV

Научный руководитель – Шман Татьяна Викторовна

Горбач Е.И.¹, Клыч А.В.²

1 - Международный государственный экологический университет им. А. Д. Сахарова, Факультет экологической медицины, Кафедра иммунологии, Минск, Беларусь, *E-mail: katringorbach.biology@yandex.by*; 2 - Белорусский государственный университет, Биологический факультет, Кафедра молекулярной биологии, Минск, Беларусь, *E-mail: hannaklych@gmail.com*

Введение. В настоящее время лентивирусные векторы (LV), используемые для генетической модификации иммунных клеток с целью адоптивной иммунотерапии, набирают популярность. Однако естественные киллерные (ЕК) клетки не эффективно трансдуцируются LV, псевдотипированным гликопротеином G вируса везикулярного стоматита G (VSV-G). Альтернативным вариантом являются вирусные векторы, псевдотипированные эндогенным ретровирусом бабуина (ВаЕV). Рецептором ВаЕV является натрий-зависимый транспортер нейтральных аминокислот - ASCT1 и ASCT2, которые высоко экспрессируются на активированных ЕК-клетках, тем самым обеспечивая проникновение ВаЕV_LV. Для получения ВаЕV_LV используют пакующую клеточную линию 293T. Три плазмидных вектора, содержащих в себе генетическую конструкцию, сигнал упаковки, а также ген ВаЕV, одновременно котрансфецируются в клетки пакующей линии 293T. Низкий титр ВаЕV-LV создает барьер для получения ЕК-клеточного продукта. Клетки 293T высоко экспрессируют рецепторы ASCT1 и ASCT2, поэтому при получении вирусных частиц, происходят потери лентивекторов из-за аутоотрансдукции вируса. Поэтому нами была получена клеточная линия, генетически-модифицированная технологией CRISPR/Cas9, со сниженной экспрессией рецептора ASCT1/ASCT2 для увеличения физического титра ВаЕV_LV.

Цель. Получить double-нокаутную клеточную линию 293T ASCT1-/ASCT2-, которая в дальнейшем будет использоваться для продукции ВаЕV_LV.

Материалы и методы. В нашем исследовании мы сделали нокаут генов *ASCT1* и *ASCT2* с помощью невирусной доставки системы CRISPR/Cas9. Нами были подобраны пары гайдРНК (гРНК) для экзонов 1,5 для *ASCT1* и экзонов 1,2 для *ASCT2*. Подобранные гРНК были клонированы в плазмиду рХ333 (addgene #64073) с помощью одноэтапного протокола клонирования. Олигонуклеотиды, кодирующие гРНК, отжигали, фосфорилировали и лигировали по рестрикционным сайтам BbsI и BsaI. Результаты клонирования оценивали с помощью секвенирования по Сенгеру. Для получения double-нокаутной линии три варианта по 400 тыс. 293T клеток котрансфецировались двумя плазмидными векторами рХ333, содержащими нужные гРНК, с добавлением разных количеств плазмидных ДНК (1, 1.5, 2 мкг/каждой плазмиды). Через 10 суток оценивали эффективность нокаута генов *ASCT1* и *ASCT2* методом проточной цитометрии по показателю коэффициента, рассчитанного как соотношение уровня флуоресценции клеток, окрашенных антителами к уровню флуоресценции клеток без окраски антителами.

Результаты. Коэффициент экспрессии транспортера *ASCT1* в контрольных клетках составил 2,7, тогда как при его нокаутировании при использовании 1, 1.5 и 2 мкг плазмиды – 2,56, 1,7 и 2,7 соответственно. Коэффициент экспрессии транспортера *ASCT2* в контрольных клетках составил 1,65, тогда как при его нокаутировании при использовании 1, 1.5 и 2 мкг плазмиды – 1,04, 0,85 и 1,64 соответственно. Таким образом, наблюдали снижение уровня экспрессии нокаутлируемых белков при использовании 2 мкг плазмиды.

Заключение. При нокаутировании генов *ASCT1* и *ASCT2* в клетках линии *293T* наблюдали снижение экспрессии соответствующих транспортеров при использовании 1,5 мкг плазмиды, содержащей гРНК. Далее планируется оценить уровень продукции ВаEV-псевдотивированных вирусных частиц контрольными и полученными нокаутированными клетками.