

## **Нокаут гена бета-микροглобулина в линии клеток НЕК 293.**

**Научный руководитель – Бобровский Павел Александрович**

*Дмитриев В.К.<sup>1</sup>, Богомякова М.Е.<sup>2</sup>*

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия

Отторжение тканей является актуальной проблемой современной трансплантологии. Одной из причин отторжения является реакция иммунной системы хозяина на чужеродные молекулы главного комплекса гистосовместимости клеток донора, у человека называемого HLA (Human Leucocyte Antigen). Для решения проблемы отторжения тканей можно использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), что позволит получить ткань-донор, обладающую молекулами HLA, идентичными молекулам реципиента, но это требует персонального подхода, а потому дорого и времязатратно. Получение же универсальных клеток, пригодных для пересадки любому пациенту, интересно с точки зрения массовой медицины.

Система HLA I класса представлена на поверхности всех ядродержащих клеток и содержит в качестве субъединицы консервативный белок бета-микροглобулин (B2m), играющий важную роль в формировании и функционировании комплекса HLA. Весьма вероятно, что нокаут гена b2m приведёт к нарушению экспонирования молекул HLA I класса на поверхности клеток.

Целью работы являлся нокаут гена b2m в клетках линии НЕК 293. Для её достижения были поставлены следующие задачи: подобрать gRNA (РНК, связывающаяся с двадцатинуклеотидным фрагментом ДНК (мишенью) и с нуклеазой Cas9) для внесения двухцепочечных разрывов в экзоны гена b2m с помощью системы CRISPR-Cas9; собрать плазмиды, кодирующие подобранные gRNA, белки Cas9 и GFP; трансфицировать клетки линии НЕК 293 полученными конструкциями; провести анализ эффективности редактирования генома и получить линию клеток, на поверхности которых отсутствуют молекулы HLA класса I.

В результате с помощью биоинформатических сервисов были подобраны 6 gRNA с минимальным количеством возможных нецелевых двухцепочечных разрывов, которые были клонированы в вектор, кодирующий также белки Cas9 и GFP. Полученными плазмидами мы трансфицировали клетки линии НЕК 293 и выбрали наиболее эффективную gRNA для дальнейшей работы. Далее мы трансфицировали клетки плазмидой с выбранной gRNA и отобрали клетки, содержащие GFP, с помощью клеточного сортера. Из 32 проанализированных клонов в 25 отредактированной оказалась как минимум одна цепь, из них в 6 клонов - обе цепи ДНК (гомозиготы). Методом проточной цитофлуорометрии мы показали, что на поверхности всех 6 гомозиготных клонов отсутствуют молекулы HLA I класса. На следующем этапе работы мы планируем проверку как минимум одного из полученных клонов на наличие нецелевых мутаций.