

Получение и характеристика линий индуцированных плюрипотентных клеток с инактивацией гена бета-2-микроглобулина методом геномного редактирования CRISP/Cas9

Научный руководитель – Лагарькова Мария Андреевна

Богомякова М.Е.¹, Воловиков Е.А.², Бобровский П.А.³

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра генетики, Москва, Россия; 3 - НИИ физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Молекулярная биология, Москва, Россия

Основной причиной отторжения тканей при трансплантации является несовпадение гаплотипов HLA донора и реципиента. Открытие индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также разработка направленных протоколов дифференцировки в специализированные клетки, открывает широкие перспективы для развития клеточной терапии и регенеративной медицины. Технология репрограммирования позволяет получать аутологичные пациент-специфические ИПСК и их производные, что снимает вопрос иммунного отторжения. Тем не менее, получение индивидуальных ИПСК для каждого пациента пока нерентабельно из-за времени и средств, необходимых для характеристики и контроля качества репрограммированных клеток. Возможным решением является создание охарактеризованной универсально совместимой линии ИПСК, подходящей для трансплантации любому пациенту.

Белки главного комплекса гистосовместимости (HLA) I класса представляет собой гетеродимеры, состоящие из тяжелой альфа цепи с высокой степенью полиморфизма и легкой цепи бета-2-микроглобулина (*b2m*). Инактивация *b2m*, необходимого для поддержания конформации гетеродимера, приводит к нарушениям формирования функционального комплекса HLA I. Терминально дифференцированные производные ИПСК, лишённые экспрессии HLA I класса, должны обладать пониженной иммуногенностью по отношению к аллогенным CD8⁺ Т клеткам реципиента. Следует отметить, что клетки, не несущие на своей поверхности молекулы HLA I класса, могут стать мишенями для NK клеток.

В ходе работы методом геномного редактирования CRISP/Cas9 были получены нокаутные по *b2m* гену клоны ИПСК. Методом секвенирования соответствующего локуса было подтверждено редактирование обоих аллелей гена *b2m*, а также показано отсутствие «офф-таргет» эффектов. С помощью проточной цитометрии было показано, что на поверхности всех выбранных для анализа клонов, а также их производных, отсутствует экспрессия молекул *b2m* и HLA I класса. Генетические манипуляции и нарушение экспрессии HLA I класса не влияют на способность к самовоспроизведению, геномную стабильность и плюрипотентность полученных ИПСК: линии обладают нормальным кариотипом, экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток Oct4, Sox2 и Nanog, что было подтверждено методами иммуноцитохимии и ОТ-ПЦР, а также способны к формированию эмбрионидных телец и спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Иммуногенность полученных линий клеток будет проверена по стандартным иммунологическим протоколам, дифференцированные производные ИПСК будут культивированы в присутствии аллогенных CD8⁺ Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови человека с обработкой и без обработки проинфламаторными цитокинами, с последующей оценкой выживаемости. Предварительные тесты были проведены на клетках линии НЕК 293, нокаутных по гену *b2m*. Аналогичные цитотоксические тесты будут проведены при ко-культивировании с NK клетками.