

**Нокаут генов, кодирующих основные активирующие НК-клеточные лиганды,
в фибробластоподобных производных ИПСК**

Научный руководитель – Богомякова Маргарита Евгеньевна

Шерман Дарья Константиновна

Студент (магистр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
фундаментальной медицины, Москва, Россия

E-mail: dar.sher.man@gmail.com

Персонализированная терапия на основе ИПСК должна позволить избежать применения иммуносупрессивной терапии. Однако остаются сомнения в толерантности иммунной системы в отношении пациент-специфичных производных ИПСК. Ранее в нашей лаборатории были получены сведения о чувствительности фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) к цитотоксическим свойствам аутологичных НК-клеток. Было показано, что ответ НК-клеток обусловлен нарушением баланса активирующих и ингибирующих лигандов на поверхности iPS-fibro [1]. Однако вклад отдельных лигандов в НК-клеточный ответ против iPS-fibro остается неизвестным. Данная работа посвящена созданию iPS-fibro с нокаутом генов активирующих лигандов *NECTIN2*, *PVR*, *MICA* для дальнейшего определения наиболее значимого из них.

Для каждого из генов интереса были получены по три генно-инженерных конструкта с различными gRNA и нуклеазой Cas9 на основе плазмиды PX458. Последовательность gRNA была предварительно подобрана с помощью онлайн-ресурса CRISPOR. Эффективность редактирования клеточной линии HEK293 для самой эффективной gRNA составила: 78% для *NECTIN2*, 83% для *PVR*, 90% для *MICA*. Полученные в ходе направленной дифференцировки iPS-fibro были охарактеризованы с помощью проточной цитометрии по уровню экспрессии маркеров фибробластов: CD44, CD73 и CD90. Было показано, что электропорация iPS-fibro более эффективна, чем трансфекция различными коммерческими липофектантами. Замена исходного буфера R из набора Neon™ Transfection System на среду Opti-MEM™ значительно увеличивала выживаемость клеток после электропорации. Через 8–10 дней после трансфекции путем сортировки негативной популяции при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ были получены iPS-fibro с нокаутом *NECTIN2*, *PVR* и *MICA*.

Таким образом, в ходе данной работы было создано по три генно-инженерных конструкта для нокаута генов *NECTIN2*, *PVR* и *MICA*, и выбраны наиболее эффективные из них. ИПСК двух здоровых доноров были дифференцированы в iPS-fibro, которые имели характерную морфологию и экспрессировали основные маркеры фибробластов. Были подобраны оптимальные условия для трансфекции iPS-fibro, и получены клетки, нокаутные по генам *NECTIN2*, *PVR*, *MICA*. Работа поддержана грантом РФФ №22–15–00250.

Источники и литература

- 1) Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., Khabarova P.O., Kazakova A.N., Bobrovsky P.A., Grigoryeva T.V., Ereemeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. (2023) iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors, Stem Cell Res Ther 14, 77