

Получение НЕК293 с CRISPR-Cas9 опосредованным нокаутом молекул адгезии**Научный руководитель – Богомякова Маргарита Евгеньевна****Кузнецов Пётр Андреевич***Студент (бакалавр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия
E-mail: pkuznetsov@1553.ru

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) способны дифференцироваться в любые типы клеток, что делает их перспективным инструментом для применения в регенеративной медицине. Долгое время предполагалось, что клетки, полученные из пациент-специфичных, или аутологичных, ИПСК, не будут индуцировать иммунный ответ со стороны собственного организма; однако недавние исследования продемонстрировали обратное, что создает дополнительный барьер для клинического применения [1]. Известно, что для реализации цитотоксической программы эффекторных клетки образуют иммунологический синапс за счет специфических молекул адгезии, поэтому их удаление рассматривается как перспективный подход к снижению иммунной реакции. Данная работа посвящена получению CRISPR/Cas9-нокаутных линий с инактивацией молекул адгезии *CD58*, *ICAM-1* и *ICAM-3*. На первом этапе работы с использованием онлайн-сервиса CRISPOR были подобраны по три направляющие РНК (нРНК), специфичные к каждому из генов адгезии. Подобранные нРНК были вклинены в вектор рХ458, кодирующий Cas9 и GFP. Далее полученными конструктами трансфицировали клетки линии НЕК293 и через 48 часов проводили сортировку GFP+ популяции. Эффективность редактирования оценивали двумя методами. Для гена *CD58* эффективность нокаута определяли методом проточной цитометрии по доле клеток, утративших экспрессию целевого белка. Для генов *ICAM-1*, *ICAM-3* эффективность редактирования анализировали с помощью онлайн-ресурса TIDE. При сравнительном анализе трех вариантов нРНК для каждого из генов наибольшая эффективность редактирования составила 17% для *CD58*, 28% для *ICAM-1* и 25% для *ICAM-3*. Далее проводили клональный отбор для получения нокаутных линий. GFP-положительные клетки (для *ICAM-1* и *ICAM-3*) и клетки, негативные по экспрессии *CD58*, были подвергнуты клональному отбору. Однако при анализе 71 клона для *ICAM-1* и 60 клонов для *ICAM-3* в предполагаемой зоне редактирования был выявлен генотип дикого типа, что может указывать на сниженную жизнеспособность клеток с нокаутом данных генов. Для *CD58* были получены три клона с различными мутациями, вызывающими сдвиг рамки считывания. Таким образом, в ходе данной работы были созданы и определены наиболее эффективные генно-инженерные конструкты для CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов *CD58*, *ICAM-1* и *ICAM-3*. Были получены три клона НЕК293 с функциональным нокаутом гена *CD58*. Разработанные конструкции могут быть использованы в дальнейших функциональных исследованиях роли молекул адгезии в иммунном ответе, в частности активации NK-клеток против дифференцированных производных ИПСК.

Источники и литература

- 1) Bogomiakova, M.E. et al. (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(1),77.