

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Богомякова Маргарита Евгеньевна

**Иммуногенность дифференцированных производных
плюрипотентных стволовых клеток человека**

Специальность 3.2.7 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии ФГБУ Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России

Научный руководитель **Лагарькова Мария Андреевна**
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты **Томилин Алексей Николаевич**
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
директор ФГБУ Института цитологии Российской
академии наук

Судариков Андрей Борисович
доктор биологических наук, заведующий лабораторией
молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Коваленко Елена Ивановна
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий
ФГБУН Института биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится «26» мая 2023 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.1/2527>

Автореферат разослан 24 апреля 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Способность к неограниченной пролиферации, наряду со способностью к дифференцировке в любой тип соматических клеток, делают эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) крайне привлекательным и многообещающим инструментом для решения проблемы нехватки донорских органов и тканей (Liu *et al.*, 2020), лечения нейродегенеративных заболеваний, а также иммунотерапии солидных опухолей (Rami *et al.*, 2017). Согласно clinicaltrials.gov, в настоящее время более 50 клеточных продуктов на основе плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) проходят стадию клинической апробации. Ведутся исследования специализированных клеток, дифференцированных из ПСК для лечения дегенерации сетчатки глаза (Schwartz *et al.*, 2015; Mandai *et al.*, 2017), повреждений спинного мозга (Frantz, 2012), ишемической болезни сердца (Miller *et al.*, 2018), болезни Паркинсона (Schweitzer *et al.*, 2020).

Повсеместному внедрению технологии ИПСК в клиническую практику препятствует высокая стоимость этой технологии. Согласно недавним оценкам, получение одной линии ИПСК в условиях надлежащей производственной практики (*англ.*, good manufacturing practice, GMP) и согласно требуемым стандартам качества обходится примерно в 800 000 долларов США (Doss & Sachinidis, 2019). Еще одним тормозящим фактором является длительное время, необходимое для получения новой линии ИПСК, а также для ее последующей дифференцировки в желаемый тип клеток (Huang *et al.*, 2019). Кроме того, пока четко не определены параметры клинической стандартизации, которые должны применяться как к ПСК (Rehakova *et al.*, 2020), так и к их дифференцированным производным (Sullivan *et al.*, 2018). В связи с этим, только тщательно охарактеризованные линии ПСК рассматриваются в качестве источника клеток для заместительной клеточной терапии. Интересно отметить, что клеточные продукты, полученные из всего пяти линий ЭСК, были использованы почти в половине клинических исследований производных ПСК, тем не менее, число исследований клеток, полученных из ИПСК, значительно увеличилось за последние несколько лет (Kobold *et al.*, 2020). В нашей стране, согласно Федеральному закону №180, запрещено использование ЭСК для разработки, производства и применения биомедицинских клеточных продуктов, поэтому в клинической практике возможно применение только производных ИПСК.

Несмотря на очевидные экономические преимущества, связанные с производством клеточных продуктов на основе аллогенных производных ПСК, проблема гистосовместимости донора и реципиента, связанная с высоким полиморфизмом генов главного комплекса гистосовместимости (HLA), остается нерешенной. Для предотвращения иммунного отторжения при трансплантации аллогенных тканей и органов обязательно пожизненное применение иммуносупрессивной терапии, которая часто сопряжена с побочными эффектами (Bolton & Bradley, 2015). Альтернативным способом уменьшить отторжение аллотрансплантата могут стать модифицированные

ИПСК с пониженной иммуногенностью, производные которых будут подходить любому реципиенту (Zheng *et al.*, 2016; Богомякова с соавт., 2019). Хотя использование «универсальных» ИПСК выглядит крайне привлекательной стратегией, молекулы, опосредующие иммунное ускользание от трансплантационного иммунитета донора, в той же степени будут ослаблять защиту от возможной онкогенной трансформации клеток в трансплантате (González *et al.*, 2020).

В свою очередь, технология репрограммирования позволяет получать пациент-специфические ИПСК, что делает возможной персонализированную терапию. Однако, в дополнение к дороговизне и трудоёмкости получения, главное преимущество аутологичных ИПСК – иммунологическая толерантность – не изучена в достаточной степени, а результаты многих исследований противоречат друг другу. Так, например, некоторые группы исследователей сообщают, что aberrантная экспрессия генов, сопровождаемая изменениями протеома и образованием неоантигенов, может приводить к распознаванию производных ИПСК сингенными (Zhao *et al.*, 2011) и даже аутологичными Т-клетками (Zhao *et al.*, 2015). Между тем, возможность активации НК-клеток в ответ на дифференцированные производные ИПСК ранее не рассматривалась.

Данное исследование посвящено изучению иммунного ответа Т- и НК-клеток на дифференцированные производные ИПСК в аутологичной и аллогенной моделях.

Целью настоящей работы являлось исследование иммуногенности дифференцированных производных плюрипотентных стволовых клеток человека.

В работе были поставлены следующие экспериментальные **задачи**:

1) Методом геномного редактирования CRISPR/Cas9 получить коллекцию линий ИПСК с биаллельным нокаутом гена бета-2-микроглобулина (*B2M*) из ИПСК здоровых доноров.

2) На основе дифференцированных производных ИПСК создать изогенную клеточную модель для изучения иммуногенности ИПСК.

3) Оценить степень активации аллогенных эффекторных клеток (Т-клеток и НК-клеток) при их сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК дикого типа и с нокаутом гена *B2M*.

4) Сравнить иммуногенность исходных соматических клеток, использованных для репрограммирования, и дифференцированных производных ИПСК по отношению к аутологичным и аллогенным иммунным клеткам.

Объект исследования

Данное исследование проведено с использованием клеток человека, культивируемых *in vitro*. В работе были использованы клеточные культуры фибробластов кожи, линии ИПСК, дифференцированные производные ИПСК, а также клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров.

Научная новизна работы

В ходе работы впервые был проведен сравнительный анализ иммуногенности дифференцированных производных ИПСК и исходных соматических клеток,

использованных для репрограммирования, по отношению к аутологичным и аллогенным иммунным клеткам. Впервые было показано отсутствие полной иммунологической толерантности дифференцированных производных ИПСК к аутологичным НК-клеткам. В частности, было обнаружено, что ответ аутологичных НК-клеток на дифференцированные производные ИПСК в 2,5 раза превышает ответ на исходные соматические клетки, использованные для репрограммирования. С помощью анализа данных полногеномного секвенирования были определены причины восприимчивости дифференцированных производных ИПСК к действию НК-клеток. Впервые было показано, что в отличие от исходных соматических клеток, использованных для репрограммирования, в производных ИПСК наблюдается значительный дисбаланс лигандов основных рецепторов НК-клеток. Этот дисбаланс вызван одновременно тремя факторами: низкой экспрессией ингибирующих лигандов, высокой экспрессией активирующих лигандов и высокой экспрессией молекул адгезии. Далее в ходе работы были предложены способы модуляции экспрессии НК-клеточных лигандов. Впервые было показано, что длительное культивирование и пассирование фибробластоподобных клеток, дифференцированных из ИПСК, ведет к существенному увеличению молекул HLA класса I на их поверхности, однако не влияет на их восприимчивость к цитотоксическому действию НК-клеток. Равновесное состояние лигандов может быть достигнуто путем предварительной обработки клеточных культур провоспалительным цитокином IFN γ . Впервые было показано, что стимуляция IFN γ нормализует ответ аутологичных НК-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК. Таким образом, в ходе работы были получены сведения о неполной иммунологической толерантности клеток, дифференцированных из аутологичных ИПСК, а также установлены причины и предложены способы ее устранения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования показали, что клетки, полученные из ИПСК, чувствительны к цитотоксическим свойствам НК-клеток, в том числе и аутологичного происхождения. Полученные данные могут осложнить применение клеточных продуктов, дифференцированных из пациент-специфичных ИПСК, без использования иммуносупрессивных препаратов. Анализ данных РНК-секвенирования показал, что причиной обнаруженной восприимчивости фибробластоподобных производных ИПСК к действию НК-клеток является дисбаланс лигандов к основным ингибирующим и активирующим рецепторам НК-клеток. Нарушение баланса НК-клеточных лигандов в клетках, полученных из ИПСК, может быть свидетельством их недостаточной зрелости, поскольку их длительное культивирование и пассирование нормализует экспрессию основных ингибирующих НК-клеточных лигандов – молекул HLA класса I. В ходе работы было установлено, что предварительная стимуляция производных ИПСК провоспалительным цитокином IFN γ возвращает у них баланс лигандов в равновесное состояние и снижает в опытах с совместным культивированием дегрануляцию и

цитотоксичность NK-клеток. Таким образом, полученные данные могут иметь существенную значимость для регенеративной медицины.

Методология и методы исследования

Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и была одобрена локальным этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Исследование иммуногенности производных ИПСК проводили на изогенной клеточной модели, состоящей из фибробластоподобных клеток, дифференцированных из ИПСК (iPS-fibro), iPS-fibro с нокаутом гена *B2M* (Δ iPS-fibro) и исходных соматических клеток, использованных для репрограммирования. Для получения контрольных Δ iPS-fibro, не экспрессирующих молекулы HLA класса I, был использован метод геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для получения из ИПСК фибробластоподобных клеток и, в отдельных экспериментах, кардиомиоцитов и пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) использовали методы направленной дифференцировки. Иммуногенность исследуемых линий анализировали при их сокультивировании с аутологичными или аллогенными лимфоцитами, выделенными из периферической крови доноров методом магнитной сепарации. Оценку Т-клеточной активности проводили по измерению экспрессии раннего маркера активации Т-клеток – молекулы CD69. Оценку NK-клеточной активности проводили по измерению цитотоксичности, а также по измерению экспрессии маркера дегрануляции NK-клеток – молекулы LAMP-1/CD107a. Для измерения профиля экспрессии генов в iPS-fibro и в исходных соматических клетках проводили полногеномное секвенирование РНК, данные которого подтверждали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Для модуляции паттерна экспрессии лигандов к ингибирующим рецепторам NK-клеток производные ИПСК длительно культивировали, вплоть до 12 пассажа, или обрабатывали клеточные культуры IFN γ в течение 48 часов. Изменения в экспрессии HLA-I оценивали методом проточной цитометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Фибробластоподобные клетки, дифференцированные из аутологичных ИПСК, не вызывают существенной активации Т-лимфоцитов в условиях *in vitro*.
- 2) Дифференцированные производные ИПСК чувствительны к цитотоксическим свойствам аутологичных и аллогенных NK-клеток, независимо от наличия или отсутствия HLA класса I.
- 3) Повышенный ответ NK-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК обусловлен дисбалансом лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам NK-клеток.
- 4) Баланс NK-клеточных лигандов в дифференцированных производных ИПСК может быть возвращен в нормальное состояние за счет предварительной обработки клеточных культур IFN γ .

Степень достоверности результатов

Приведенные в работе данные по иммуногенности производных ИПСК выполнены на двух изогенных моделях. Результаты иммунологических экспериментов,

количественной оценки экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени и проточной цитометрии были воспроизведены в трех и более независимых экспериментах и представлены в виде средних значений со стандартными ошибками среднего (SEM). Используемые в работе методы исследования, проведенные расчеты и статистическая обработка данных являются общепризнанными и корректными, что позволяет говорить о достоверности представленных научных результатов.

Личный вклад автора в исследование

Основные результаты работы были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании текста диссертации. Получение и характеристика линий ИПСК с нокаутом гена *B2M* выполнены совместно с Е.К. Секретовой. Иммунологические эксперименты выполнены совместно с Е.К. Секретовой и П.О. Хабаровой. Полногеномное секвенирование проведено совместно с Т.А. Григорьевой. Анализ данных полногеномного секвенирования выполнен совместно с К.С. Ануфриевой и А.Н. Казаковой.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях: V Национальном Конгрессе по регенеративной медицине, Москва, Россия, 23–25 ноября 2022 г.; The Biochemistry Global Summit, Лиссабон, Португалия, 9-14 июля 2022 г.; IUBMB–FEBS–PABMB Young Scientists' Forum, Вимейру, Португалия, 6-9 июля 2022 г.; Итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, Москва, Россия, 21-22 декабря 2021 г.; XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 12–23 апреля 2021 г.; 43rd FEBS Congress, Прага, Чехия, 7 - 12 июля 2018 г. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: проекты №20–315–90041 и №19–29–04113-мк, а также гранта 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 247 источников. Работа изложена на 120 страницах, содержит 37 рисунков, 5 таблиц и 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание изогенной клеточной модели для изучения иммуногенности ИПСК

На первом этапе работы с помощью метода геномного редактирования CRISPR/Cas9 были получены две линии ИПСК с нокаутом гена *B2M* (Δ iPSC-A и Δ iPSC-B). Полученные линии были охарактеризованы согласно общепринятым критериям. Δ iPSC обладали нормальным кариотипом, экспрессировали основные маркеры плюрипотентных клеток (как транскрипционные факторы OCT4, SOX2 и NANOG, так и поверхностные молекулы TRA-1–81 и SSEA-4), что было подтверждено методами иммуноцитохимии и ОТ-ПЦР, а также были способны к формированию эмбрионидных тел и к спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Детальная характеристика Δ iPSC-A опубликована ранее (Bogomiakova *et al.*, 2021). Отсутствие *B2M* и HLA-I на поверхности Δ iPSC было подтверждено методом проточной цитометрии. В качестве примера на рисунке 1 приведена характеристика линии Δ iPSC-B.

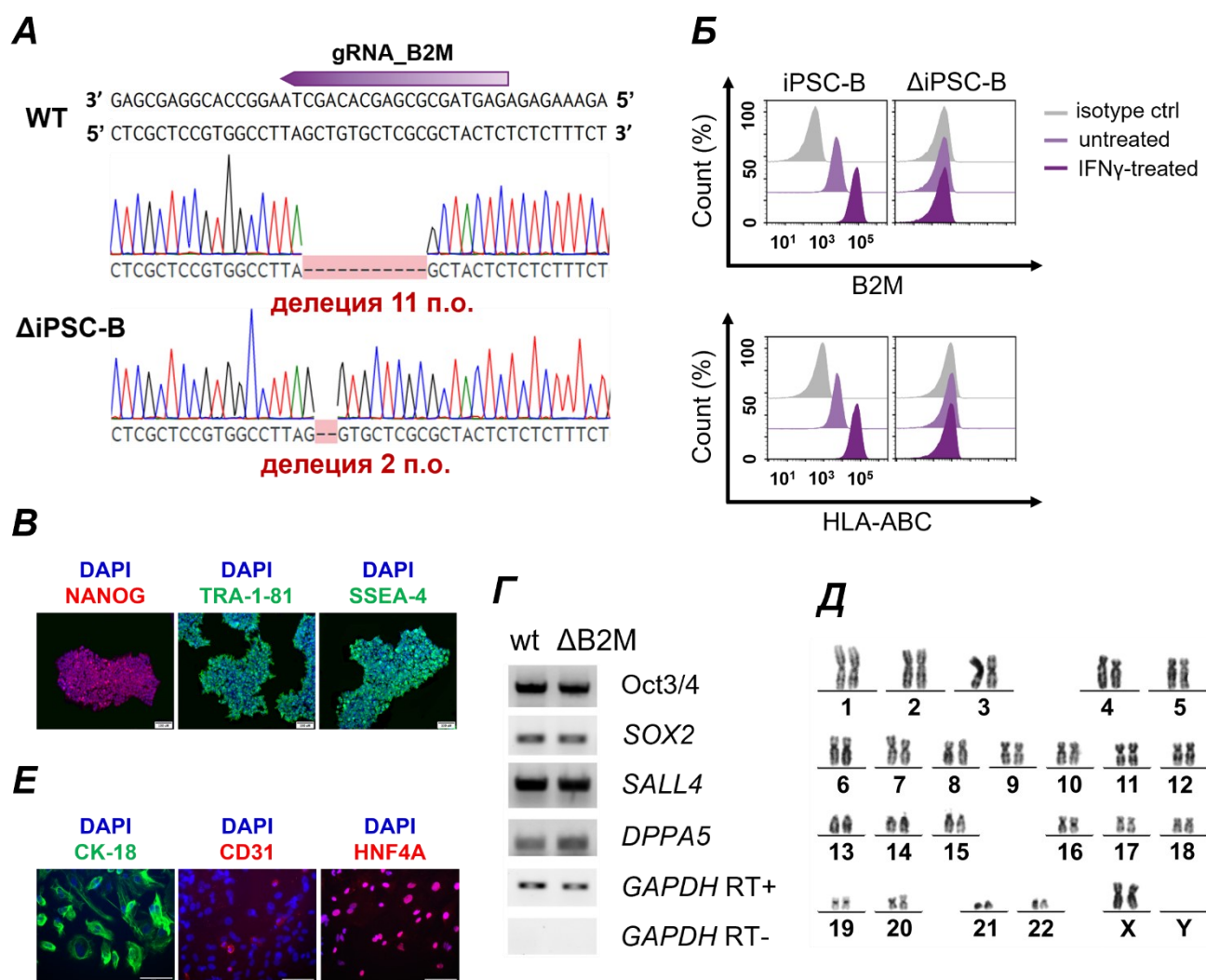
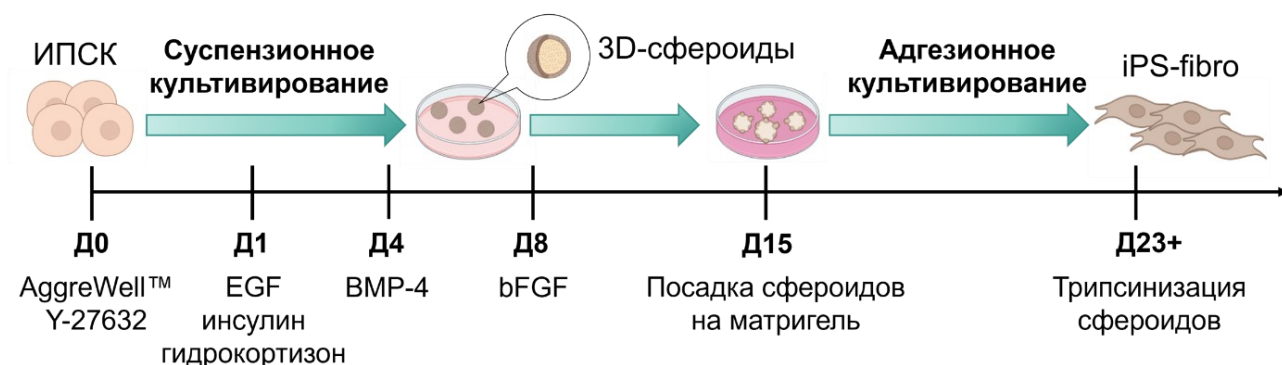


Рисунок 1. Характеристика линии ИПСК Δ iPSC-B. (А) Делеции, образовавшиеся в аллелях гена *B2M* в процессе геномного редактирования в районе отжига гайдовой РНК. (Б) Анализ экспрессии молекул *B2M* и HLA-ABC в клетках ИПСК дикого типа iPSC-B (слева) и Δ iPSC-B (справа). Образцы, предварительно обработанные IFN γ , отмечены

темным цветом. Изотипический контроль отмечен серым. (В) Микрофотографии иммуноцитохимического выявления маркеров плюрипотентности (NANOG, красный; TRA-1-81 и SSEA-4, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка – 100 мкм. (Г) Электрофореграмма амплифицированных фрагментов генов-маркеров плюрипотентности (OCT ³/₄, SOX2, SALL4, DPPA-5), полученных в ходе ОТ-ПЦР. GAPDH использован в качестве положительного контроля. (Д) Кариотип линии ΔiPSC-B. GTG-бэндинг. (Е) Микрофотографии иммуноцитохимического выявления маркеров трех зародышевых листков, цитокератин 18 (зеленый) – маркер эктодермы; CD31 (красный) – маркер мезодермы; HNF4A (красный) – маркер энтодермы. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка – 100 мкм.

Далее линии ИПСК с нокаутом гена *B2M* и их изогенные контроли дикого типа были дифференцированы в фибробластоподобные производные (ФП-ИПСК, или iPS-fibro) через стадию 3D-сфероидов. Схема дифференцировки изображена на рисунке 2А. Эффективность дифференцировки оценивали по морфологическому критерию (Рис. 2Б) и по уровню экспрессии следующих маркеров фибробластов: CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1), CD105 (эндоглин) методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 2В). Как и в случае с плюрипотентными клетками, экспрессия B2M и HLA-ABC не была детектирована после дифференцировки нокаутных линий ИПСК в iPS-fibro (Рис. 2В).

А



Б

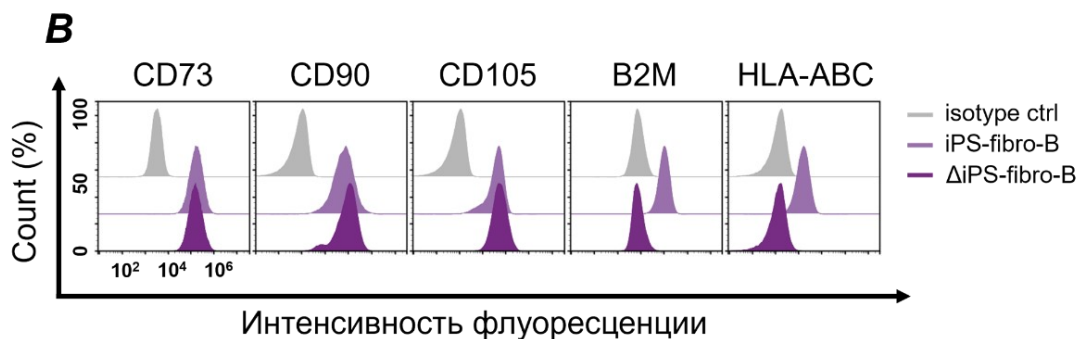
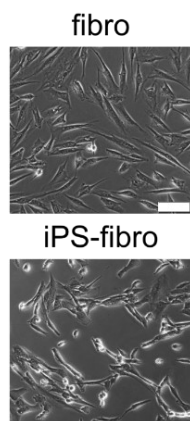


Рисунок 2. Получение и характеристика iPS-fibro. (А) Схема дифференцировки ИПСК в iPS-fibro. (Б) Сравнение морфологии iPS-fibro с исходными фибробластами, использованными для репрограммирования. Масштабная линейка 50 мкм. (В) Анализ

экспрессии основных поверхностных маркеров фибробластов CD73, CD90 и CD105, а также B2M и HLA-ABC на примере линии iPS-fibro-B и ΔiPS-fibro-B. Серым обозначен изотипический контроль.

Таким образом, в ходе первого этапа работы были получены две изогенные модели, каждая из которых состоит из фибробластов кожи, использованных для репрограммирования, фибробластоподобных клеток, полученных из ИПСК (iPS-fibro), и iPS-fibro с нокаутом гена *B2M* (ΔiPS-fibro). Графическая иллюстрация изогенной модели представлена на рисунке 3. Используя такую модель, представляется возможным сравнить *in vitro* активацию аллогенных и аутологичных иммунных клеток, то есть оценить степень иммунотолератности ΔiPS-fibro, а также ответить на вопрос, могут ли аутологичные производные ИПСК быть распознаны иммунной системой реципиента.

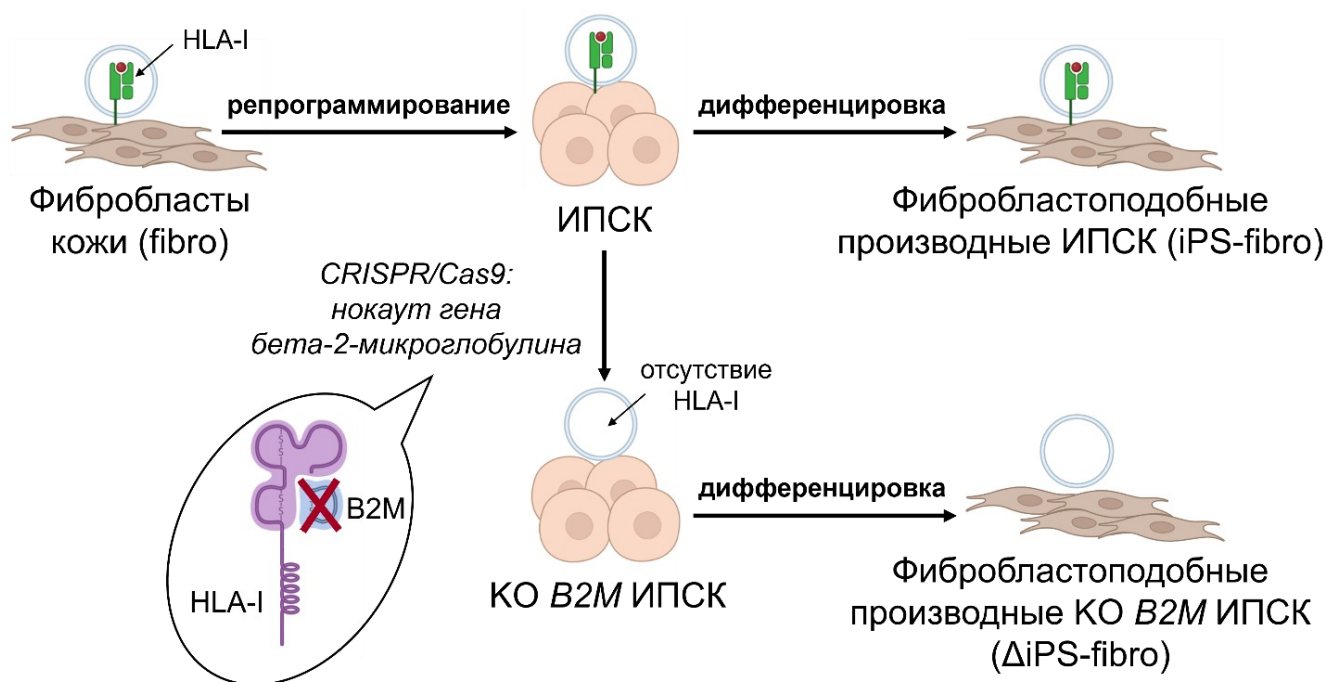


Рисунок 3. Схема изогенной клеточной модели, использованной в исследовании.

2. Анализ иммуногенности производных ИПСК по отношению к Т-лимфоцитам

Известно, что основная роль Т-клеток заключается в распознавании чужеродных молекул. Поэтому, как и ожидалось, процент аллогенных CD69⁺ Т-клеток, сокультивируемых с фибробластами и iPS-fibro, был значительно выше, чем в аутологичной модели (Рис. 4А). В среднем аллогенные Т-клетки активировались почти в 2,5 раза чаще, чем аутологичные Т-клетки. Между тем, мы не выявили различий в активации аллогенных или аутологичных Т-лимфоцитов против изогенных фибробластов кожи или iPS-fibro (Рис. 4А, 4Б). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что возможные различия иммунопептидома в iPS-fibro обоих доноров в сравнении с исходными фибробластами не влияют на ответ Т-клеток памяти как в аутологичной, так и в аллогенной моделях.

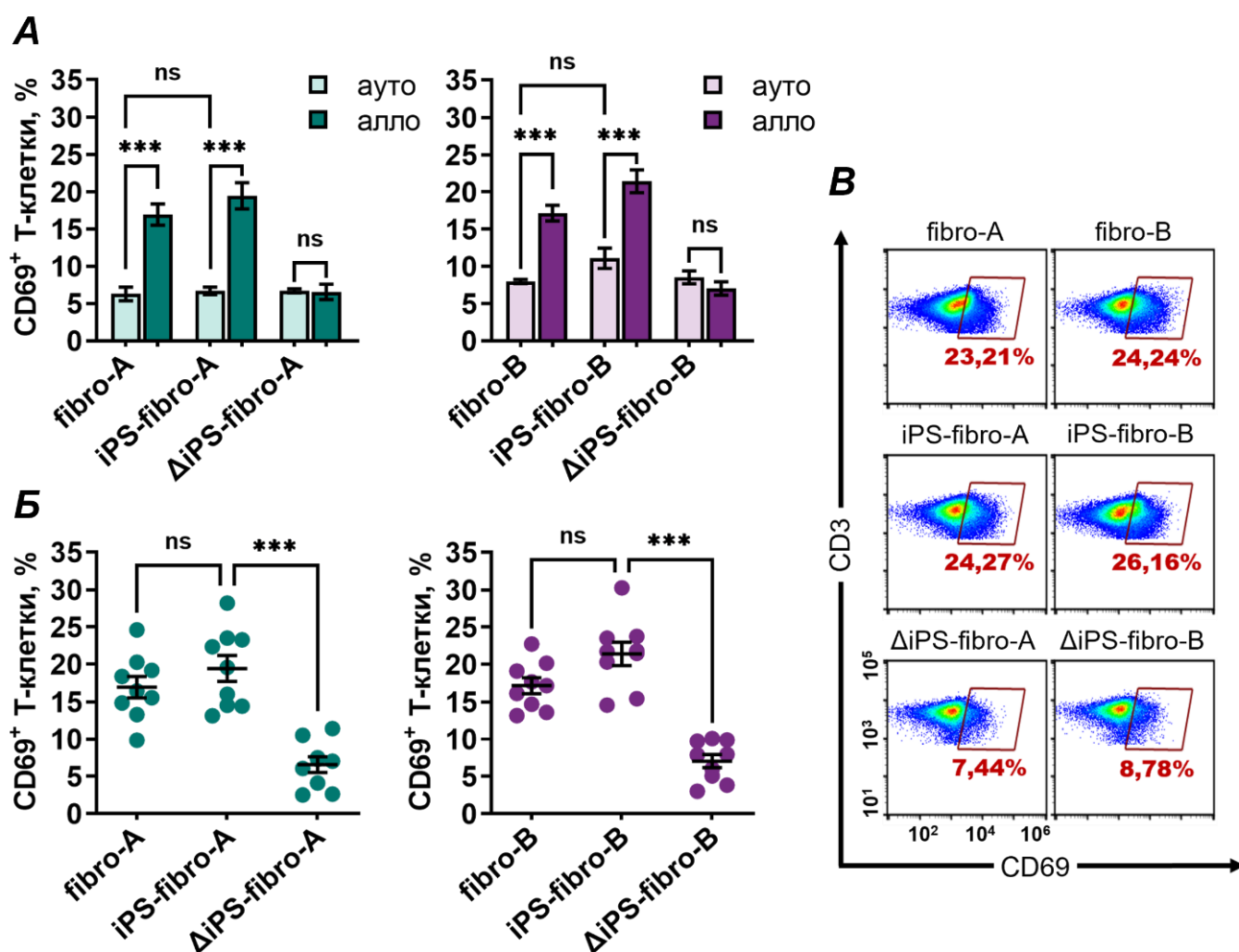


Рисунок 4. Иммуногенность производных ИПСК по отношению к Т-лимфоцитам. (А) Сравнение степени активации аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (выделено темным) Т-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и ΔiPS-fibro. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$, ns – not significant, не обладающие статистической значимостью. (Б) Степень активации аллогенных Т-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и ΔiPS-fibro. Точки представляют собой независимые эксперименты с Т-клетками аллогенных доноров (N=9), выполненные в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$, ns – not significant, не обладающие статистической значимостью. (В) Репрезентативные графики проточной цитометрии, иллюстрирующие экспрессию CD69 Т-лимфоцитами аллогенного донора.

Также мы показали, что отсутствие “собственных” молекул HLA класса I не влияет на иммунный ответ аутологичных Т-лимфоцитов (Рис. 4А). В то же время отсутствие чужеродных молекул HLA-I достоверно снижало активацию аллогенных Т-клеток против ΔiPS-fibro, несмотря на некоторую вариабельность среди разных доноров (Рис. 4Б). Более того, для ΔiPS-fibro мы не наблюдали разницы в активации аутологичных или аллогенных эффекторных клеток (Рис. 4А). Эти данные доказывают, что манипулирование экспрессией HLA-I в ИПСК действительно приводит к иммунологической толерантности производных модифицированных ИПСК по отношению к аллогенным Т-клеткам.

3. Анализ иммуногенности производных ИПСК по отношению к NK-клеткам

Согласно гипотезе «отсутствие своего» клетки с нокаутом гена *B2M* должны быть чувствительны к цитотоксическим свойствам NK-клеткам. Поэтому, как и ожидалось, и в аутологичной, и в аллогенной моделях активация NK-клеток против Δ iPS-fibro, лишенных молекул HLA-I, была высокой (Рис. 5А). Неожиданно мы обнаружили, что производные ИПСК дикого типа вызывали столь же высокую активацию аутологичных (Рис. 5А) и аллогенных (Рис. 5Б) NK-клеток. Между тем, мы наблюдали более низкую активность NK-клеток против исходных фибробластов по сравнению с iPS-fibro (Рис. 5А, 5Б). Так, индекс дегрануляции аллогенных NK-клеток против iPS-fibro был в среднем в 1,7 раза выше по сравнению с изогенными фибробластами кожи. Эта разница была еще выше для аутологичных NK-клеток. Ответ аутологичных NK-клеток на iPS-fibro был в среднем 2,7 раза выше, чем ответ на изогенные фибробласты кожи.

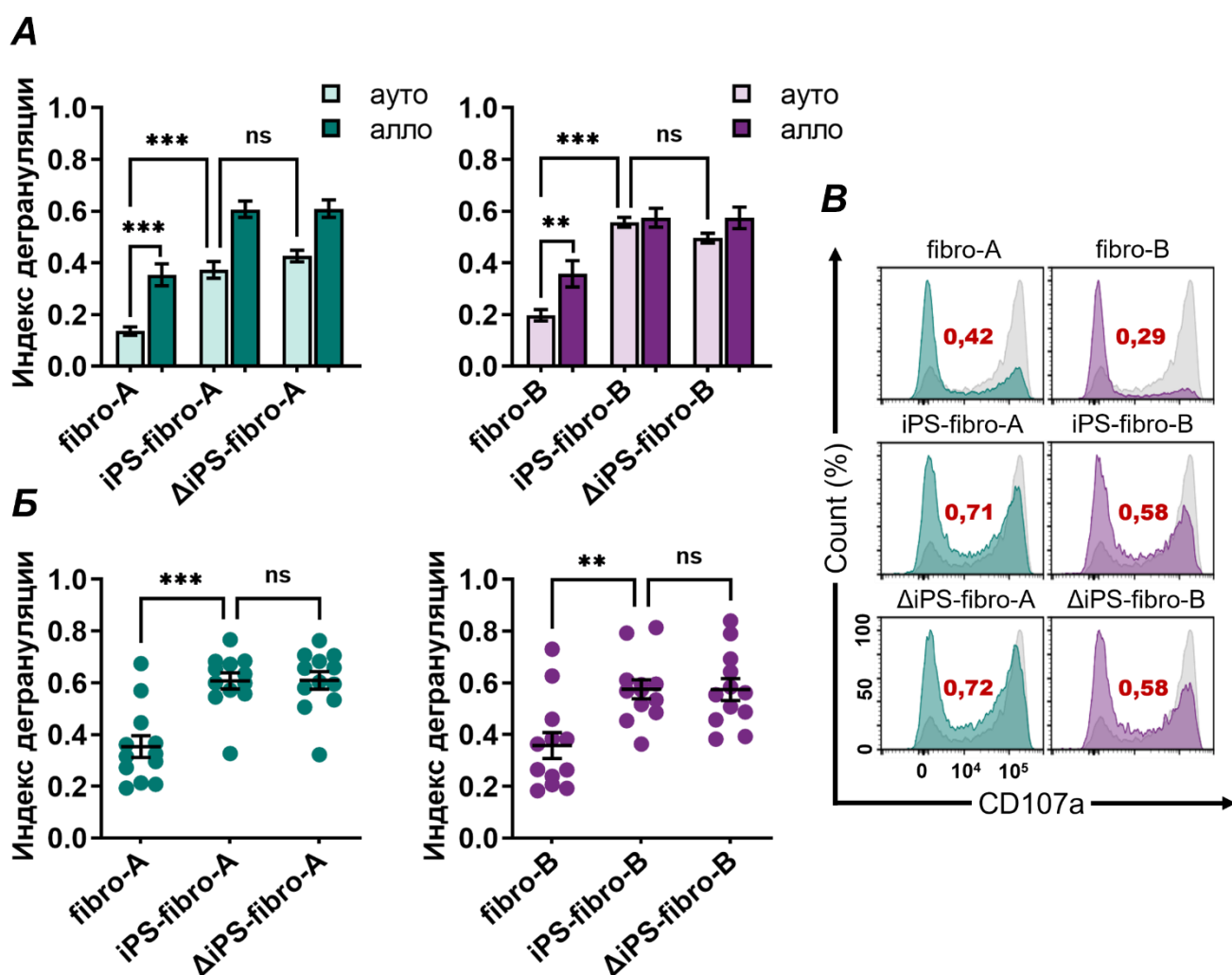


Рисунок 5. Иммуногенность производных ИПСК по отношению к NK-клеткам. (А) Сравнение степени дегрануляции аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (выделено темным) NK-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и Δ iPS-fibro. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью. (Б) Индекс дегрануляции аллогенных NK-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и

Δ iPS-fibro. Точки представляют собой независимые эксперименты с НК-клетками аллогенных доноров (N=12), выполненные в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. **P <0.01; ***P <0.001, ns – not significant, не обладающие статистической значимостью. (В) Репрезентативные графики проточной цитометрии, иллюстрирующие экспрессию CD107a НК-клетками аллогенного донора. Дегрануляция НК-клеток против линии K562, используемой в качестве положительного контроля, обозначена серым цветом. Рассчитанный индекс дегрануляции выделен красным.

Также с помощью LDH теста было показано, что на всех соотношениях эффекторных/таргетных клеток уровень цитотоксичности НК-клеток был выше в отношении производных ИПСК, но не в отношении фибробластов кожи (Рис. 6). Помимо iPS-fibro, мы также проанализировали ответ НК-клеток на другие типы дифференцированных производных ИПСК. Мы показали, что клетки ПЭС (iPS-RPE) и кардиомиоциты (iPS-CM), дифференцированные из ИПСК, активируют аллогенные НК-клетки в той же степени, что и iPS-fibro (Рис. 7). Таким образом, производные ИПСК оказались чувствительны к цитотоксическим свойствам НК-клеток независимо от наличия экспрессии HLA класса I.

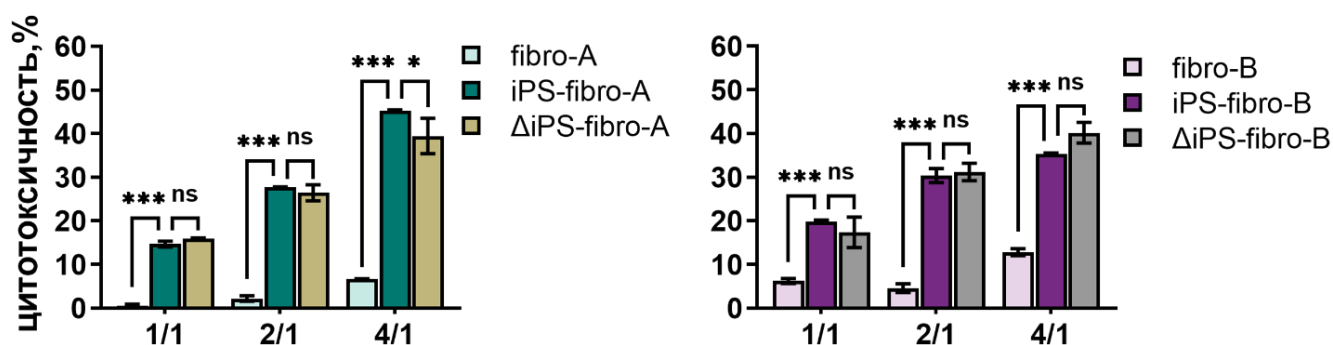


Рисунок 6. Цитотоксичность НК-клеток аллогенного донора, измеренная на разных соотношениях эффекторных/таргетных клеток, против исходных фибробластов, iPS-fibro и Δ iPS-fibro. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *P <0.05; ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

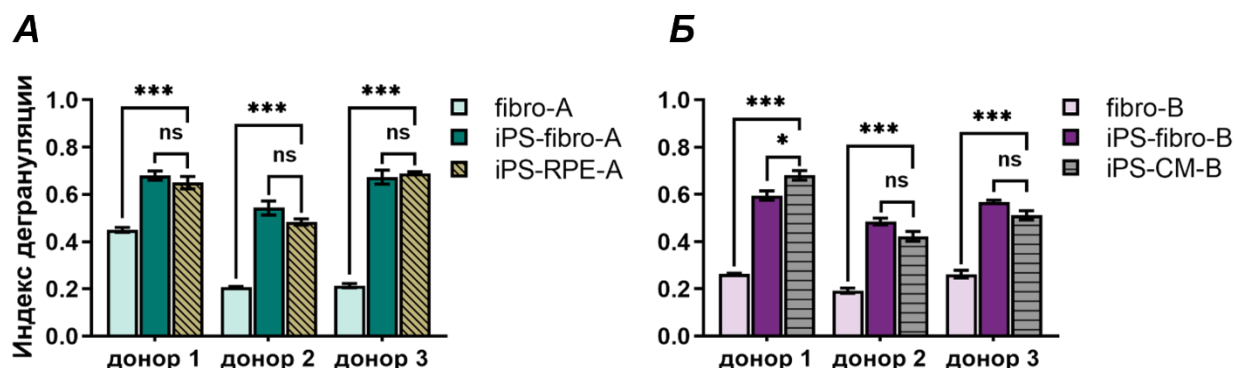


Рисунок 7. НК-клеточный ответ на исходные фибробласты и различные типы дифференцированных производных ИПСК. (А) Сравнение степени дегрануляции НК-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и iPS-RPE. Для каждого донора был проведен независимый эксперимент, выполненный в трипликатах.

Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью. (В) Сравнение степени дегрануляции NK-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и iPS-СМ. Для каждого донора был проведен независимый эксперимент, выполненный в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *P <0.05; ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

4. Профилирование экспрессии генов NK-клеточных лигандов в производных ИПСК

Известно, что NK-клеточный ответ регулируется балансом сигналов, поступающих от активирующих и ингибирующих рецепторов (Lanier, 2005). Правильный баланс между ингибирующими и активирующими лигандами может сделать клетку-мишень невидимой для NK-клеток (Pegram *et al.*, 2011), тогда как нарушенный баланс лигандов NK-клеток в iPS-fibro может быть причиной чрезмерной активации NK-клеток. В этой связи на следующем этапе работы мы провели профилирование экспрессии генов в изогенных фибробластах кожи, iPS-fibro и Δ iPS-fibro доноров А и В. Для повышения достоверности транскриптомного анализа были включены аналогичные образцы от донора С (кровь этого донора не была доступна для исследования). Основной нашей целью было идентифицировать дифференциально экспрессируемые гены, участвующие в регуляции NK-клеточного ответа.

Вначале мы хотели убедиться, что дифференцированные из ИПСК iPS-fibro действительно похожи на первичные фибробласты человека. Так как некое нарушение баланса лигандов теоретически могло произойти в процессе дифференцировки, было решено сравнить iPS-fibro с фибробластоподобными клетками, полученными из ИПСК другими исследовательскими группами. Для этого были подобраны три общедоступных набора данных (GSE61390, GSE62772, GSE73211), которые состоят из транскриптомных данных изогенных фибробластов, использованных для репрограммирования, ИПСК и фибробластоподобных производных, полученных из ИПСК. Анализ данных РНК-секвенирования показал, что iPS-fibro и Δ iPS-fibro по транскрипционному профилю были схожи с первичными фибробластами кожи человека (Рис. 8А). Коэффициент корреляции между производными ИПСК, полученными в нашей лаборатории, и фибробластами человека был выше 0,9. Между тем, самый высокий коэффициент корреляции (~0,95) наблюдался между iPS-fibro, полученными в нашей лаборатории, и независимо дифференцированными из ИПСК фибробластоподобными клетками. Данные результаты свидетельствуют о том, что «транскриптомная сигнатура» фибробластоподобных производных ИПСК воспроизводится в разных лабораториях независимо от различий в протоколах репрограммирования, культивирования и дифференцировки в желаемый клеточный тип.

Далее мы определили паттерн экспрессии NK-клеточных лигандов. Поскольку в иммунологических тестах исходные фибробласты не нарушали анергию аутологических NK-клеток, их паттерн экспрессии был принят за «золотой стандарт». Многие гены, кодирующие лиганды ингибирующих и активирующих рецепторов NK-клеток, оказались

дифференциально экспрессированными в производных ИПСК по сравнению с исходными фибробластами (Рис. 8Б). В iPS-fibro была повышена экспрессия лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D и снижена экспрессия молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов NK-клеточных рецепторов. Тем самым, в iPS-fibro наблюдалась одновременно низкая интенсивность ингибирующих сигналов и повышенная интенсивность активирующих сигналов.

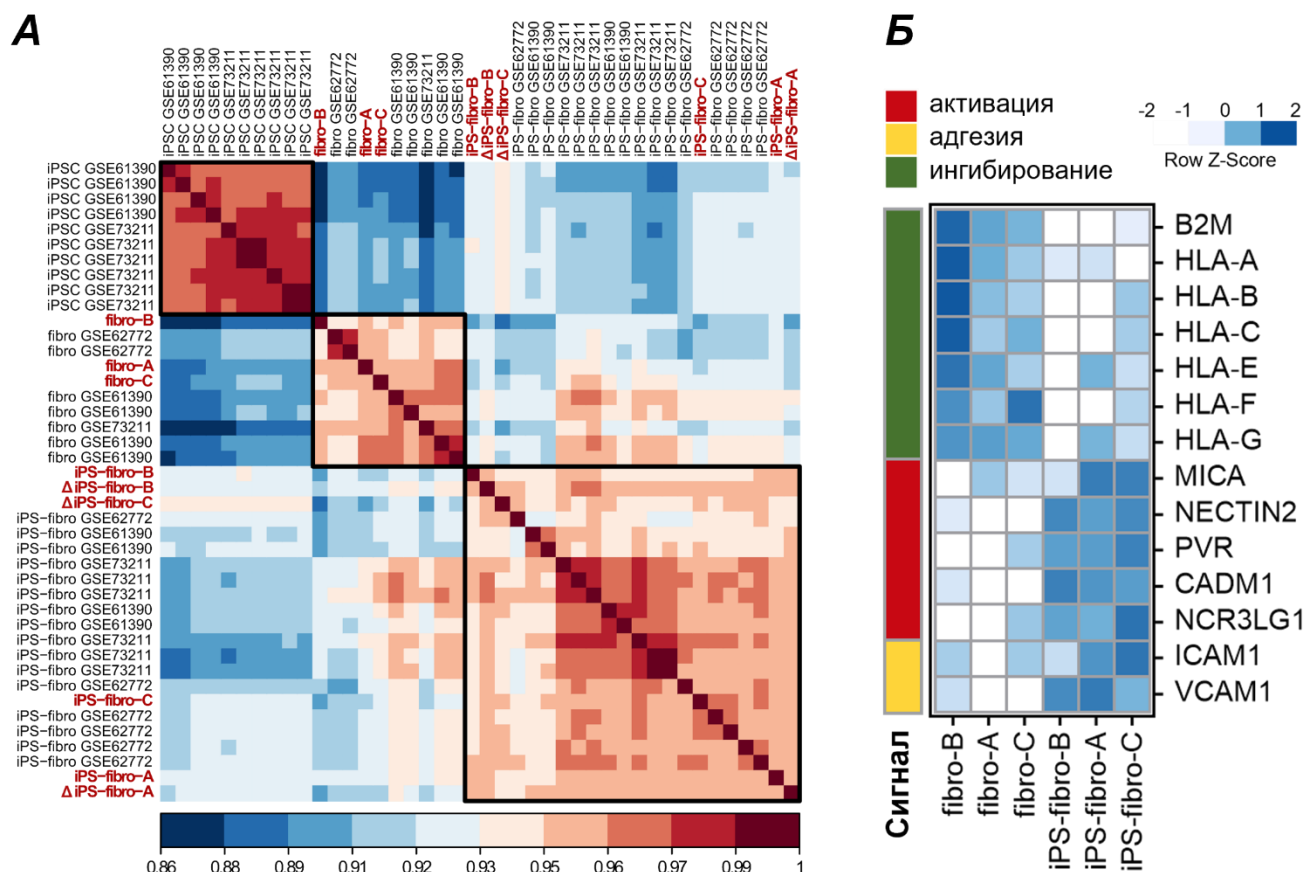


Рисунок 8. Анализ экспрессии основных NK-клеточных лигандов в фибробластах кожи и iPS-fibro. (А) Корреляционный анализ (метод корреляции по Пирсону), определяющий степень сходства между фибробластами человека, ИПСК и фибробластоподобными производными ИПСК. Образцы, полученные в нашей лаборатории, отмечены красным. (Б) Тепловая карта, демонстрирующая профиль экспрессии основных лигандов к ингибирующим и активирующим NK-клеточным рецепторам, а также некоторых молекул адгезии в исходных фибробластах и iPS-fibro. Уровень экспрессии (в числе транскриптов на миллион картированных прочтений (TPM, с *англ.* transcripts per million)) для каждого гена был нормализован с помощью row Z-score.

5. Возможная причина дисбаланса NK-клеточных лигандов в iPS-fibro

Возможной причиной нарушения баланса лигандов NK-клеток в iPS-fibro может быть недостаточная зрелость клеток. В целом, низкая экспрессия молекул HLA I класса является характерным признаком ПСК (Drukker *et al.*, 2002), поэтому низкая экспрессия HLA-I в iPS-fibro потенциально может быть ассоциирована с их незрелостью. iPS-fibro на ранних пассажах сохраняли относительно низкую экспрессию молекул HLA класса I, что типично для недифференцированных клеток (Рис. 9А). При этом наиболее значительная

разница в экспрессии HLA-ABC и B2M наблюдалась между исходными фибробластами и iPS-fibro пассажа 3, т.е. самыми «молодыми» клетками, полученными из ИПСК. Далее, в процессе культивирования и пассирования экспрессия молекул HLA-I и B2M значительно увеличивалась в iPS-fibro обоих доноров (Рис. 9А). Тем не менее, значительный рост экспрессии HLA-I, наблюдаемый в ходе длительного культивирования производных ИПСК, никак не влиял на уровень NK-клеточного ответа. Мы не детектировали каких-либо изменений в индексе дегрануляции как аутологичных, так и аллогенных NK-клеток в зависимости от числа пассажей, пройденных производными ИПСК (Рис. 9Б). И «молодые», и более «зрелые» iPS-fibro активировали сходный процент NK-клеток.

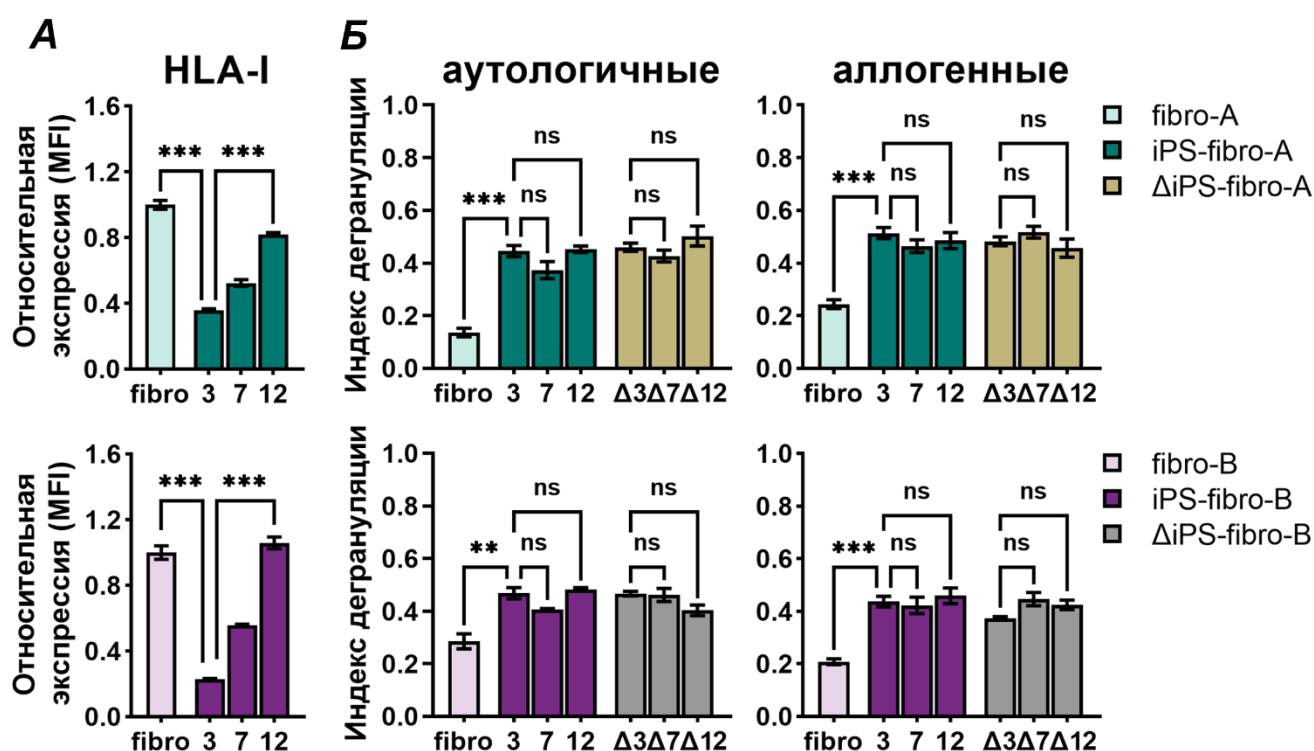


Рисунок 9. Длительное культивирование iPS-fibro способствует усилению экспрессии HLA-I, но не ингибирует цитотоксическую активность NK-клеток. (А) Анализ экспрессии молекул B2M и HLA-I в исходных фибробластах и iPS-fibro на разных пассажах. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *** $P < 0.001$. Экспрессия нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов. (Б) Дегрануляция аутологичных и аллогенных ($N=9$) NK-клеток при сокультивировании с iPS-fibro на разных пассажах. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

Далее мы проанализировали, влияет ли длительное культивирование дифференцированных производных ИПСК на паттерн экспрессии NK-клеточных лигандов к основным активирующим рецепторам NK-клеток - NKG2D и DNAM-1. В целом, наблюдалась повышенная экспрессия практически всех проанализированных генов в «молодых» iPS-fibro по сравнению с исходными фибробластами (Рис. 10). В более

«зрелых» производных ИПСК также сохранялась повышенная экспрессия лигандов к NKG2D и DNAM-1 (Рис. 10). рецепторам. Таким образом, несмотря на компенсацию дефицита ингибирующих сигналов, в клетках iPS-fibro 12 пассажа наблюдался избыток активирующих сигналов, что делало их восприимчивыми к НК-клеточной цитотоксичности в той же степени, что и более молодые клетки, полученные из ИПСК. Полученные данные означают, что баланс НК-клеточных лигандов не может быть восстановлен путем длительного пассирования производных ИПСК, и требует более мощных стимулов.

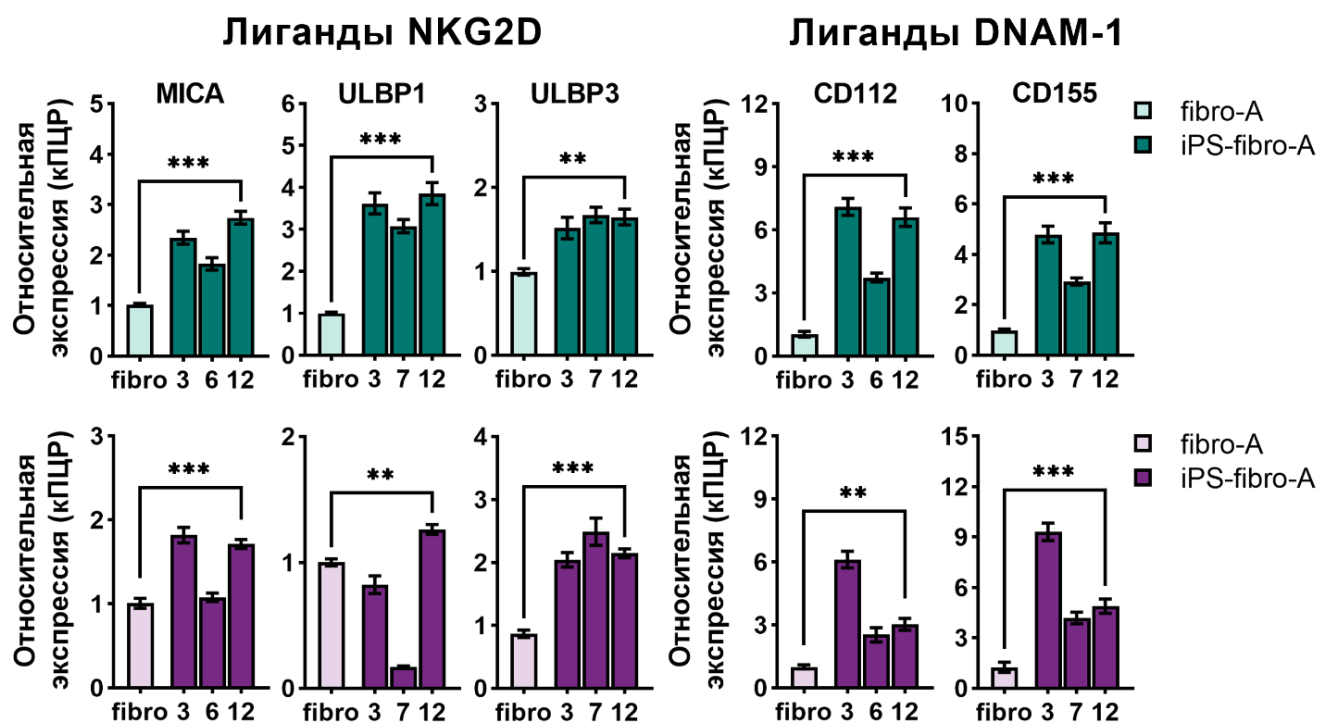


Рисунок 10. Анализ экспрессии лигандов к основным активирующим рецепторам НК-клеток в исходных фибробластах и iPS-fibro на разных пассажах. Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов. Каждый независимый эксперимент (N=3) выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. **P < 0.01, ***P < 0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

6. Изучение возможности корректировки баланса НК-клеточных лигандов

Повышенная экспрессия лигандов к основным НК-клеточным рецепторам в iPS-fibro всех пассажей смещает баланс сигналов в сторону активации НК-клеток. В свою очередь, более существенное усиление ингибирующих сигналов должно снизить активацию и цитотоксичность НК-клеток, то есть привести баланс НК-клеточных лигандов в равновесное состояние. В связи с важной биологической ролью IFN γ , а также его уникальной особенностью усиливать экспрессию HLA класса I (Drukker *et al.*, 2002), данный цитокин был использован в качестве внешнего сигнала для изменения паттерна экспрессии лигандов ингибирующих и активирующих рецепторов в iPS-fibro.

Как и ожидалось, стимуляция клеток IFN γ значительно усиливала экспрессию молекул HLA класса I (Рис.11). Мы наблюдали более чем двукратное увеличение

экспрессии B2M и HLA-I в исходных фибробластах, и более чем пятикратное увеличение в iPS-fibro (Рис. 11).

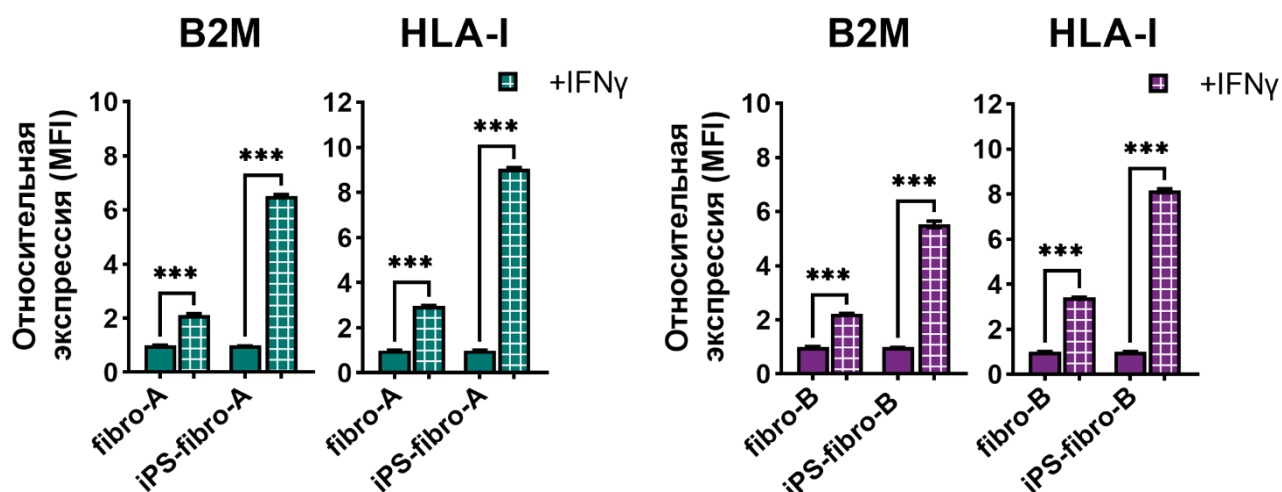


Рисунок 11. Анализ экспрессии B2M и HLA класса I после обработки клеток IFN γ . Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных интактных исходных фибробластов. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. ***P < 0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

Далее было проведено профилирование экспрессии генов после стимуляции IFN γ (Рис. 12). Мы показали, что помимо молекул главного комплекса гистосовместимости, IFN γ также увеличивает экспрессию генов минорных ингибирующих лигандов NK-клеток, в частности *CEACAM1* и *LGALS9*, а также других молекул, способных оказывать ингибирующее действие на NK-клетки, таких как CD274, или PD-L1 (Oyer *et al.*, 2018) и IDO (Park *et al.*, 2019).

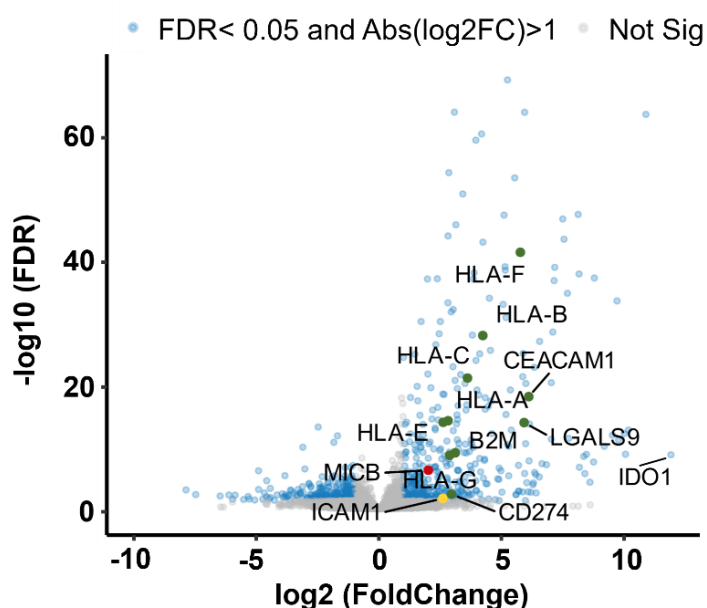


Рисунок 12. Точечная диаграмма, демонстрирующая дифференциально экспрессируемые гены в iPS-fibro после обработки клеток IFN γ . Гены, кодирующие лиганды ингибирующих NK-клеточных рецепторов, обозначены зеленым цветом; гены, кодирующие лиганды активирующих NK-клеточных рецепторов, обозначены красным цветом; молекулы адгезии обозначены желтым. Серым цветом обозначены гены, не изменившие экспрессию после обработки IFN γ .

Между тем, IFN γ незначительно влияет на экспрессию генов, кодирующих лиганды активирующих рецепторов НК-клеток или молекул адгезии. Небольшое увеличение экспрессии было детектировано только для генов *MICB* и *ICAM1*. (Рис. 12). В совокупности, полученные результаты показывают, что IFN γ является значительно более эффективным стимулом для корректировки баланса НК-клеточных лигандов, чем длительное культивирование.

Далее мы оценили, как влияет обработка IFN γ на НК-клеточный ответ. Мы показали, что степень дегрануляции аутологичных и аллогенных НК-клеток против производных ИПСК сократилась примерно вдвое после их предварительной стимуляции IFN γ (Рис. 13А). Более того, не только интенсивность дегрануляции, но и цитотоксичность НК-клеток против стимулированных iPS-fibro снижалась практически до значений, характерных для исходных фибробластов (Рис. 13Б). Напротив, IFN γ не влиял на степень иммунного ответа НК-клеток при их сокультивировании с Δ iPS-fibro. Как индекс дегрануляции (Рис. 13А), так и цитотоксичность (Рис. 13Б) оставались на уровне, сопоставимом с необработанными образцами.

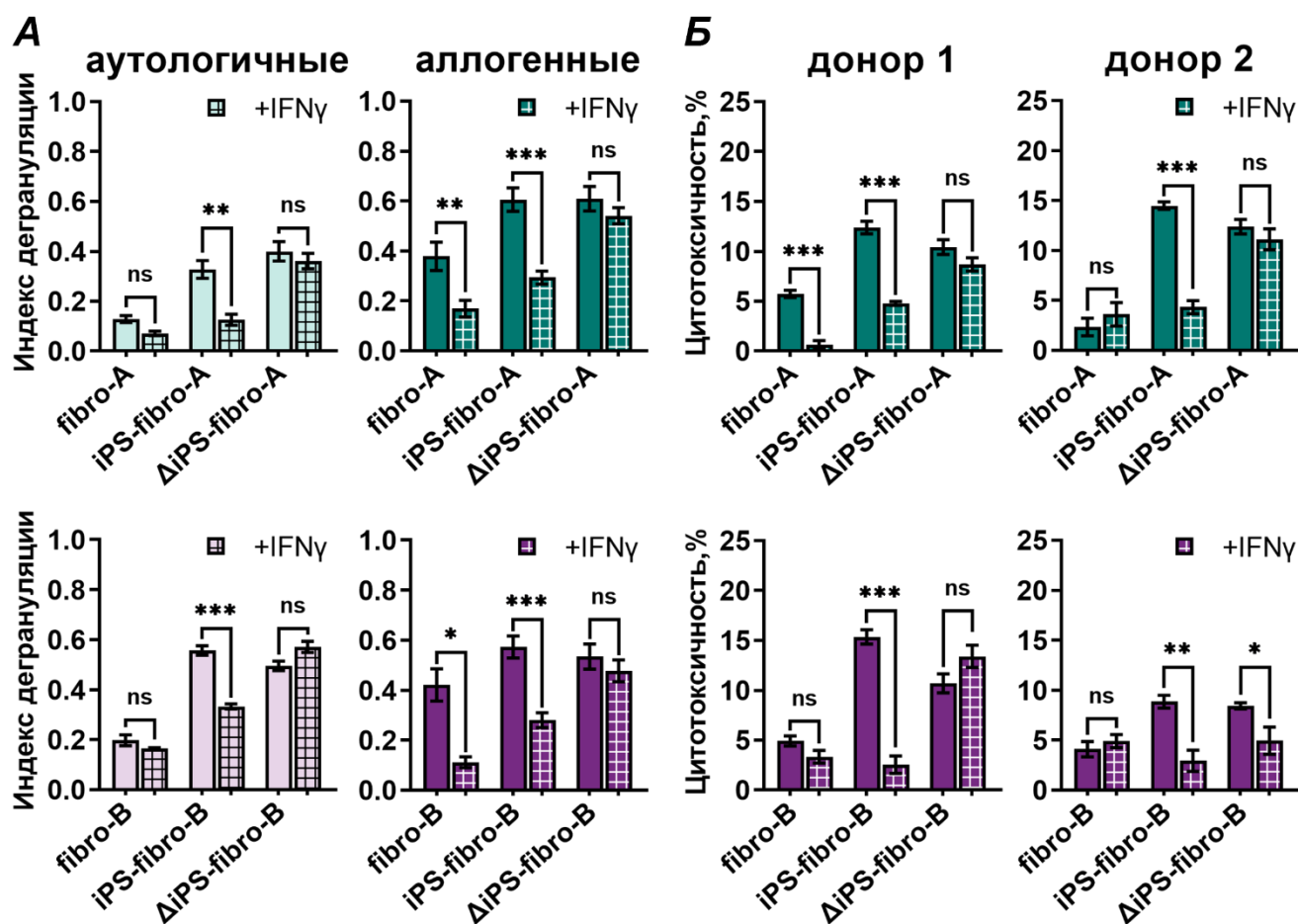


Рисунок 13. Предварительная обработка iPS-fibro IFN γ снижает уровень дегрануляции и цитотоксичность НК-клеток. (А) Дегрануляция аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (N=7, выделено темным) НК-клеток после предварительной обработки клеток-мишеней IFN γ . Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. **P < 0.01; ***P < 0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью. (Б) Анализ цитотоксичности НК-клеток, выделенных из крови двух аллогенных доноров, после предварительной

обработки клеток-мишеней IFN γ . Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение $\pm$ SEM. *P <0.05; ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

Аналогично, мы не наблюдали каких-либо изменений в активации аутологичных НК-клеток на исходные фибробласты (Рис. 13А), что является свидетельством «правильного» баланса НК-клеточных лигандов в соматических клетках. Между тем аллогенные НК-клетки в значительной степени снижали степень дегрануляции против стимулированных фибробластов. В то же время снижение цитотоксичности наблюдалось только при сокультивировании fibro-A с НК-клетками донора 1 (Рис. 13Б). Несколько повышенный ответ НК-клеток в аллогенной модели и его модуляция с помощью IFN γ могут быть связаны как с физиологическим состоянием некоторых доноров НК-клеток, принимавших участие в нашем исследовании.

Таким образом, мы показали, что стимуляция IFN γ способна восстановить баланс НК-клеточных лигандов в производных ИПСК. В то время как IFN γ оказывает слабое влияние на лиганды активирующих рецепторов НК-клеток, он значительно повышает экспрессию HLA-I и других ингибирующих молекул, что в совокупности обеспечивает преобладание ингибирующих сигналов в стимулированных iPS-fibro и приводит к нормализации НК-клеточного ответа на дифференцированные производные ИПСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первые успешные трансплантации аутологичных производных ИПСК способствуют развитию персонализированной регенеративной медицины (Madrid *et al.*, 2021). Однако вопрос о полной иммунной толерантности аутологичных ИПСК до сих пор остается не полностью решенным. В отличие от более ранних работ (Zhao *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2015), данное исследование показывает, что клетки, дифференцированные из аутологичных ИПСК, могут быть распознаны как не “свое” не Т-клетками, а НК-клетками. В то время как исходные фибробласты, использованные для репрограммирования, не нарушали анергию аутологичных НК-клеток, фибробластоподобные клетки, дифференцированные из ИПСК, независимо от статуса экспрессии HLA-I, вызывали интенсивную цитотоксическую активность НК-клеток.

Полученные в этой работе результаты еще раз доказывают, что регуляция активации НК-клеток является более сложной, чем в соответствии с классической гипотезой распознавания “отсутствие своего”, и зависит от взаимодействия ингибирующих и активирующих рецепторов НК-клеток. Мы показали, что в производных ИПСК нарушен баланс лигандов НК-клеток. По сравнению с изогенными фибробластами равновесие лигандов в iPS-fibro было смещено в сторону активирующих сигналов за счет одновременного снижения экспрессии ингибирующих молекул и увеличения экспрессии активирующих молекул. В то время как недостаток экспрессии молекул HLA-I можно компенсировать в ходе длительного культивирования и пассирования производных ИПСК, избыток активирующих молекул сохраняется как в «молодых», так и более «зрелых» iPS-fibro. Достичь равновесного состояния лигандов и нормализовать НК-

клеточный ответ можно за счет предварительной обработки клеток провоспалительным цитокином IFN γ .

В целом, роль NK-клеток при трансплантации солидных органов остается довольно противоречивой (Villard *et al.*, 2011). Существуют свидетельства того, что некоторые субпопуляции NK-клеток могут играть роль в регуляции толерантности к аллотрансплантату, однако чаще NK-клетки участвуют в отторжении аллотрансплантата при посредстве Т-клеток и антител (Pontrelli *et al.*, 2020). В отсутствие иммуносупрессивной терапии, которая снижает цитотоксическую активность и регулирует свойства дегрануляции, активированные NK-клетки продуцируют IFN γ , что может способствовать развитию хронического воспаления и усилению иммунного ответа, опосредованного, в первую очередь, Т-клетками (Adenugba, 2017). Эти иммунные процессы могут еще больше усложнить использование аутологических производных ИПСК в клинической практике. К настоящему моменту опубликованы первичные результаты трёх трансплантаций аутологических клеток, полученных из ИПСК (Mandai *et al.*, 2017; Takagi *et al.*, 2019; Schweitzer *et al.*, 2020). Трансплантации проводились в иммунопривилегированные органы – глаз или мозг. Несмотря на то, что пациенты не получали иммуносупрессии, побочных эффектов при этом участники исследований не испытывали. Тем не менее, даже небольшая вероятность иммунного отторжения вызывает опасения в отношении трансплантации аутологических производных ИПСК без применения иммуносупрессии. В связи с этим различные типы производных ИПСК должны быть протестированы на надлежащий баланс лигандов рецепторов NK-клеток, чтобы избежать нежелательного ответа иммунных клеток.

ВЫВОДЫ

- 1) Методом геномного редактирования CRISPR/Cas9 получены линии ИПСК с нокаутом гена бета-2-микроглобулина, на основе которых создана изогенная клеточная модель для изучения иммуногенности дифференцированных производных ИПСК.
- 2) Показано, что исходные соматические клетки, использованные для репрограммирования, и фибробластоподобные производные ИПСК не вызывают существенной активации аутологических Т-лимфоцитов.
- 3) Впервые показана высокая чувствительность производных ИПСК к цитотоксическим свойствам аутологических NK-клеток, сопоставимая с клетками, которые не экспрессируют молекулы HLA I класса.
- 4) Повышенный ответ NK-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК обусловлен дисбалансом лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам NK-клеток.
- 5) Недостаток экспрессии молекул HLA класса I может быть компенсирован в ходе длительного культивирования и пассирования производных ИПСК, однако эти процессы не влияют на экспрессию активирующих NK-клеточных лигандов.

6) Баланс НК-клеточных лигандов в дифференцированных производных ИПСК может быть восстановлен за счет предварительной обработки клеточных культур IFN γ .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. **Богомякова М.Е.**, Еремеев А. В., Лагарькова М. А. “Свой среди чужих”: можно ли создать гипоиимуногенные линии плюрипотентных стволовых клеток? // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – №. 5. – С. 725–740. Импакт-фактор (WoS) – 1.540. (1,85/1,48)*
2. **Bogomiakova M.E.**, Sekretova E.K., Eremeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalnikova E.A., Lebedeva O.S., Lagarkova M.A. Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. // Stem Cell Research. – 2021. – Т. 55. – С. 102451. Импакт-фактор (WoS) – 1.587. (0.58/0.35)
3. Eremeev A.V., Lebedeva O.S., **Bogomiakova M.E.**, Lagarkova M.A., Bogomazova A.N. Cerebral Organoids-Challenges to Establish a Brain Prototype. // Cells. – 2021. – Т. 10(7) – С. 1790. Импакт-фактор (WoS) – 7.666. (1.96/0.3)
4. **Bogomiakova M.E.**, Sekretova E.K., Anufrieva K.S., Khabarova P.O., Kazakova A.N., Bobrovsky P.A., Grigoryeva T.V., Eremeev A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors. // Stem Cell Research & Therapy. – 2023. – Т. 14. – С. 77. Импакт-фактор (WoS) – 8.079. (2,08/1,56)

** В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах*