

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
имени АКАДЕМИКА Ю.М. ЛОПУХИНА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

Богомякова Маргарита Евгеньевна

**Иммуногенность дифференцированных производных
плюрипотентных стволовых клеток человека**

Специальность 3.2.7. – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор РАН,

член-корреспондент РАН

Лагарькова Мария Андреевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.1. Главный комплекс гистосовместимости. Разнообразие гаплотипов HLA	14
1.1.2. Иммунный ответ при аллогенной трансплантации.....	17
1.1.3. Принципы подбора донора для аллогенной трансплантации. Иммуносупрессия ...	22
1.2.1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.....	23
1.2.2. Банкирование плюрипотентных стволовых клеток	26
1.2.3. Иммуногенность плюрипотентных стволовых клеток и их производных	29
1.2.4. Возможные причины иммуногенности производных ИПСК	32
1.3. Гипоиммуногенные линии ПСК как решение проблемы иммунного отторжения.....	37
1.3.1. Механизмы избегания опухолями иммунного надзора	37
1.3.2. Редактирование генов HLA подавляет ответ аллогенных Т-лимфоцитов.....	43
1.3.3. Стратегии «иммунной маскировки» для ингибирования НК-клеток.....	46
1.3.4. Псевдомозиготные и полу-универсальные линии ПСК.....	48
1.3.5. Вопросы безопасности «универсальных» ПСК.....	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	51
2.1. Культивирование ИПСК в бесфидерных условиях.....	51
2.2. Обработка матригелем чашек Петри	51
2.3. Криоконсервация клеточных культур	51
2.4. Размораживание культур эукариотических клеток.....	52
2.5. Плазмидный вектор	52
2.6. Транфекция ИПСК.....	52
2.7. Сортировка ИПСК после трансфекции	53
2.8. Отбор клонов.....	53
2.9. Первичный скрининг методом проточной цитометрии.....	54
2.10. Секвенирование по Сэнгеру	54
2.11. Проточная цитометрия.....	55
2.12. Иммуноцитохимическое окрашивание	56
2.13. Формирование и культивирование эмбрионных телес	57
2.14. Спонтанная дифференцировка ИПСК.....	58
2.15. Выделение тотальной РНК	58
2.16. Полимеразная цепная реакция, сопряженная с реакцией обратной транскрипции..	58

2.17. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека	59
2.18. Дифференциальное окрашивание метафазных хромосом.....	60
2.19. Дифференцировка ИПСК в фибробластоподобные клетки (iPS-fibro).....	60
2.20. Дифференцировка ИПСК в клетки пигментного эпителия сетчатки (iPS-RPE) и кардиомиоциты (iPS-CM)	61
2.21. Культивирование клеточной линии K562	61
2.22. Стимуляция клеток IFN γ	62
2.23. Выделение мононуклеаров периферической крови	62
2.24. Иммуномагнитная сепарация CD8 ⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток	62
2.25. Анализ активации Т-клеток	63
2.26. Анализ дегрануляции NK-клеток.....	63
2.27. Анализ цитотоксичности NK-клеток.....	63
2.28. Анализ данных РНК-секвенирования.....	64
2.29. Полимеразная цепная реакция в реальном времени	65
2.30. Статистическая обработка данных	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	67
3.1. Создание изогенной клеточной модели для изучения иммуногенности ИПСК	68
3.2. Анализ иммуногенности производных ИПСК по отношению к Т-лимфоцитам.....	76
3.3. Анализ иммуногенности производных ИПСК по отношению к NK-клеткам	79
3.4. Профилирование экспрессии генов NK-клеточных лигандов в производных ИПСК.....	84
3.5. Возможная причина дисбаланса NK-клеточных лигандов в iPS-fibro.....	92
3.6. Изучение возможности корректировки баланса NK-клеточных лигандов.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ	103
БЛАГОДАРНОСТИ	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	119
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	120

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АПК – антигенпрезентирующие клетки
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ДК – дендритные клетки
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
- ПСК – плюрипотентные стволовые клетки
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭС – пигментный эпителий сетчатки
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РТПХ – реакция трансплантата против хозяина
- АРС, allophycocyanin (*англ.*) – аллофикоцианин
- ANOVA – Analysis of variance
- B2M, beta-2 microglobulin (*англ.*) – бета-2-микроглобулин
- bFGF, basic fibroblast growth factor (*англ.*) – основной фактор роста фибробластов
- BMP4, bone morphogenic protein 4 (*англ.*) – костный морфогенетический белок 4
- CD, cluster of differentiation (*англ.*) – кластер дифференцировки
- СИТА – class II, major histocompatibility complex, transactivator
- CNVs, copy number variations (*англ.*) – вариация числа копий генов
- CRISPR – clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
- CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
- CTLs, cytotoxic T-lymphocytes (*англ.*) – цитотоксические Т-лимфоциты
- DAMPs, damage-associated molecular patterns (*англ.*) – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением
- DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole (*англ.*) – 4,6-диамино-2-фенилиндол
- DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMEM/F12 – Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F-12
- DMSO, dimethyl sulfoxide (*англ.*) – диметилсульфоксид
- FBS, fetal bovine serum (*англ.*) – эмбриональная сыворотка коровы
- FDR – false discovery rate
- FITC, fluorescein (*англ.*) – флуоресцеин
- GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*англ.*) – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

GFP, green fluorescent protein (*англ.*) – зелёный флуоресцентный белок

GMP, good manufacturing practice (*англ.*) – надлежащая производственная практика

GO – gene ontology

HLA, human leukocyte antigen (*англ.*) – человеческий лейкоцитарный антиген

HSV-TK – herpes simplex virus-thymidine kinase

IFN γ , interferon gamma (*англ.*) – интерферон гамма

IL, interleukin (*англ.*) – интерлейкин

KIRs – killer cell immunoglobulin-like receptors

LAK – lymphokine-activated killer cell

LDH, lactate dehydrogenase (*англ.*) – лактатдегидрогеназа

MHC, major histocompatibility complex (*англ.*) – главный комплекс гистосовместимости

miHA, minor histocompatibility antigen (*англ.*) – минорные антигены гистосовместимости

MMLV, mouse Moloney leukemia virus (*англ.*) – вирус лейкоза мышей

NK, natural killer cells (*англ.*) – естественные киллеры

PBMCs, peripheral blood mononuclear cells (*англ.*) – мононуклеарные клетки периферической крови

PBS, phosphate-buffered saline (*англ.*) – фосфатно-солевой буфер

PD-1 – programmed cell death 1

PE, phycoerythrin (*англ.*) – фикоэритрин

PRRs, pattern recognition receptors (*англ.*) – паттернраспознающие рецепторы

ROCK – rho-associated protein kinase

RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640

SD, standard deviation (*англ.*) – стандартное отклонение

SEM, standard error of the mean (*англ.*) – стандартная ошибка среднего

SNP, single-nucleotide polymorphism (*англ.*) – однонуклеотидный полиморфизм

SR, serum replacement (*англ.*) – заменитель сыворотки

STR – short tandem repeats

TALEN – transcription activator-like effector nucleases

TCR, T-cell receptor (*англ.*) – Т-клеточный рецептор

TNF, tumor necrosis factor (*англ.*) – фактор некроза опухоли

TPM, transcripts per million (*англ.*) – число транскриптов на миллион картированных прочтений

ВВЕДЕНИЕ

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, 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 aberrantная 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

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 I класса 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

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 I класса. 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 НК-клеток. Таким образом, полученные данные могут иметь существенную значимость для регенеративной медицины.

Методология 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 I класса, 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 НК-клеточной активности проводили по измерению цитотоксичности, а также по измерению экспрессии маркера дегрануляции НК-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 НК-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 НК-клеток, независимо от наличия или отсутствия HLA класса I.

3) Повышенный ответ НК-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК обусловлен дисбалансом лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам НК-клеток.

4) Баланс НК-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 В2М 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.

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.

Апробация результатов

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 опубликовано 11 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 3.2.7. – иммунология, а также 7 тезисов.

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 гипои иммуногенные 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., Ereemeev A.V., Shuvalova L.D., Bobrovsky P.A., Zerkalenkova 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. Ereemeev 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., Ereemeev 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*

Тезисы конференций:

1. **Bogomiakova M.E.**, Bobrovsky P.A., Zhukova Y.N., Lazarev V.N., Lagarkova M.A. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells lines with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. // FEBS Open Bio. – 2018. – № 8 (S1). – Supplement: 43rd FEBS Congress, Biochemistry Forever, Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018. – P. 152.
2. **Богомякова М.Е.**, Колесникова О.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н., Лагарькова М. А., Еремеев А.В. Поиск возможных путей ингибирования цитотоксического действия НК клеток против клеточных культур, не экспрессирующих HLA I класса. // Научные труды научной конференции молодых ученых по медицинской биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России. – 2019. – С. 4.
3. **Богомякова М.Е.**, Секретова Е.К. Иммуногенность индуцированных плюрипотентных стволовых клеток зависит от метода репрограммирования соматических клеток. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020». / Отв.ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. М.: МАКС Пресс, 2020. – Секция 2.2., доклад №4.
4. Секретова Е.К., **Богомякова М.Е.** Характеристика и изучение иммуногенности линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с инактивацией гена бета-2-микроглобулина. // Материалы Международного молодежного научного форума

«Ломоносов-2021». / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2021. – Секция 2.11, доклад №8.

5. **Богомякова М.Е.**, Хабарова П.О., Еремеев А.В., Секретова Е.К., Бобровский П.А., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Повышенный ответ НК-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК обусловлен увеличением экспрессии лигандов к рецепторам семейства DNAM-1 и NKG2D в клетках-мишенях. // Тезисы докладов итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. – 2022. – С. 10.

6. **Bogomiakova M.**, Khabarova P., Eremeev A., Sekretova E., Bobrovsky P., Bogomazova A., Lagarkova M. Hypersensitivity of iPSC-derivatives to autologous NK-cells is caused by increased expression of ligands for DNAM-1 and NKG2D family receptors. // FEBS Open Bio. – 2022. – № 12 (S1). – Supplement: The Biochemistry Global Summit, 25th IUBMB Congress, 46th FEBS Congress, 15th PABMB Congress. – P. 191-192.

7. **Богомякова М.Е.**, Секретова Е.К., Ануфриева К.С., Хабарова П.О., Казакова А.Н., Бобровский П.А., Григорьева Т.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Чувствительность производных ИПСК к аутологичным НК-клеткам обусловлена дисбалансом экспрессии лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам НК-клеток. // Гены и Клетки. – 2022. – № 17(3). – Материалы V Национального Конгресса по Регенеративной Медицине. – С. 31.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.1. Главный комплекс гистосовместимости. Разнообразие гаплотипов HLA

Главный комплекс гистосовместимости (*англ.*, major histocompatibility complex, МНС), который у человека называется человеческим лейкоцитарным антигеном, или HLA (*англ.*, human leukocyte antigen), расположен в 6p21.3 регионе короткого плеча хромосомы 6 (Рис. 1). HLA признан наиболее сложно устроенным кластером генома человека, его длина превышает 4 миллиона п. о. (Horton *et al.*, 2004). В данной области закодированы более 220 генов, включая сами белки HLA, которые опосредуют множество реакций врожденной и адаптивной иммунной системы.

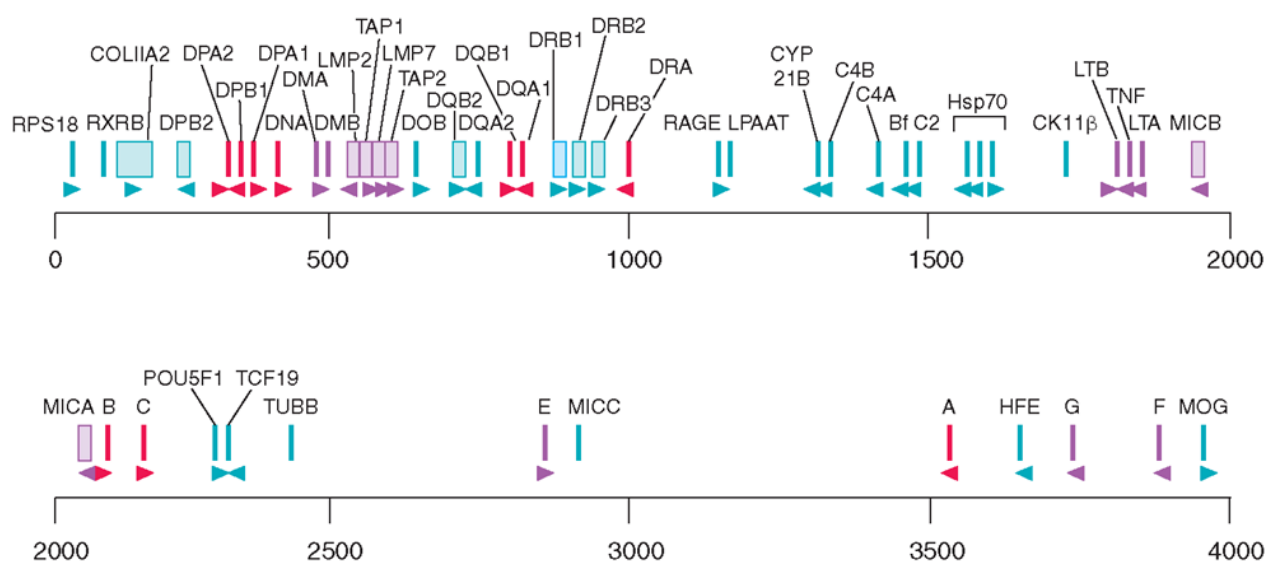


Рисунок 1. Карта локуса HLA, показывающая гены класса I и класса II, а также другие иммунологически важные гены, расположенные в данном локусе. Направление генов указано стрелками. Шкала указана в т.п.н. Красным обозначены высокополиморфные гены, фиолетовым – гены со средней степенью вариабельности. Источник: <http://what-when-how.com/rheumatology/the-major-histocompatibility-complex-the-immune-system-in-health-and-diseaserheumatology-part-1/>

Область HLA является наиболее полиморфной областью в геноме человека (Mungall *et al.*, 2003). Аллельные варианты в основном возникают в пределах девяти классических генов (HLA-A, -B, -C, -DPA1, -DPB1, -DQA1, -DQB1, -DRA и -DRB1). Наименованием HLA генов и аллелей занимается номенклатурный комитет ВОЗ, который ведёт базу данных наименований IPD-IMGT/HLA и регулярно выпускает обновления по новым аллелям HLA. В настоящее время по состоянию на январь 2023 года насчитывается чуть больше, чем 35 000 идентифицированных аллелей HLA, из которых 25228 относятся к HLA-I и 10592 – к HLA-II (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>). Стоит отметить, что за

последние 5 лет количество новых аллелей увеличилось более чем на две трети, что в первую очередь связано с повышением уровня разрешения HLA-типирования. Также немаловажным фактором служит актуальность использования базы данных в целях трансплантологии (Robinson *et al.*, 2016).

Регион, кодирующий HLA I класса, охватывает более 2 млн п.о. и состоит примерно из 20 генов. К классическим генам I класса, или Ia, относятся HLA-A, -B и -C. HLA-B признан наиболее полиморфным геном в человеческом геноме (Robinson *et al.*, 2003), и в настоящее время в базе IMGT/HLA зарегистрировано 9 000 аллельных вариантов. В свою очередь, HLA-A и HLA-C представлены практически одинаковым числом аллелей – 7562 и 7513, соответственно.

Схема строения молекул HLA-I представлена на рисунке 2. HLA-I представляют собой гетеродимер, состоящий из тяжелой α -цепи и нековалентно связанной с ней легкой цепью β 2-микроглобулина. Молекулы HLA-I экспрессируются всеми ядродержащими клетками организма и ответственны за презентацию собственных и чужеродных, в том числе вирусных, внутриклеточных пептидов CD8⁺ Т-лимфоцитам. Домены α 1 и α 2 – это наиболее вариабельные области генов HLA I класса. Примечательно, что гены HLA-I состоят из восьми экзонов, при этом области полиморфизма находятся в областях, кодирующих α 1 и α 2 домены: они образуют антигенсвязывающую щель, в которой происходит связывание эндогенных пептидов. Данный факт определяет биологическую роль разнообразия аллелей HLA, что подробно будет рассмотрено далее.

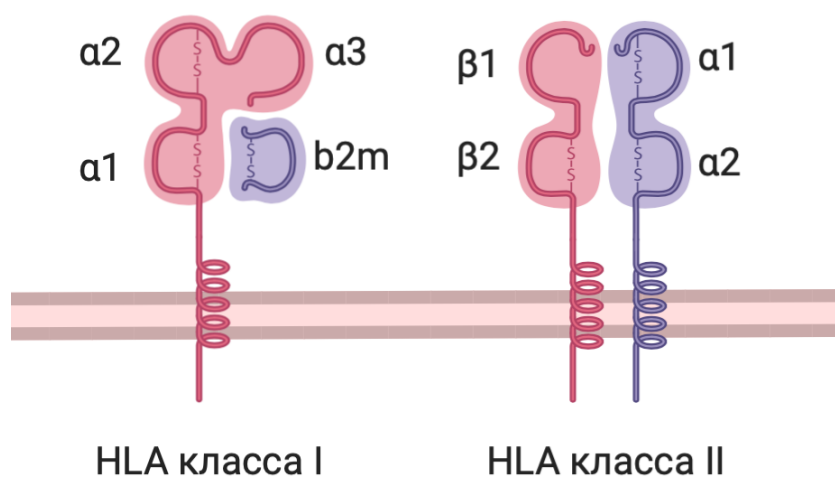


Рисунок 2. Схема строения молекул HLA I и II класса. Источник: <http://biorender>.

Также молекулы HLA I класса взаимодействуют с рецепторами семейства KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) на поверхности НК-клеток. Согласно классической гипотезе иммунологического распознавания «отсутствие своего» это взаимодействие опосредует толерантность или активацию НК-клеток (Ljunggren & Kaare,

1990). В свою очередь клетки, лишенные экспрессии HLA-I, будут распознаны и элиминированы NK-клетками.

Помимо классических генов HLA I класса, есть также группа так называемых неклассических генов HLA-I, которым относятся гены с ограниченным полиморфизмом (HLA-E, -F, -G). Это молекулы с иммуномодулирующей функцией, они играют важную роль в регуляции врожденных иммунных реакций. Так, например, HLA-G экспрессируется клетками плаценты, где он ингибирует материнские эффекторные клетки, в основном, NK-клетки.

Молекулы HLA II класса включают классические гены HLA-D, которые подразделяются на DQ (DQA1 и DQB1), DP (DPA1 и DPB1) и DR (DRA и DRB1). Экспрессия молекул HLA-II преимущественно ограничена антигенпрезентирующими клетками – АПК (В-клетками, макрофагами и дендритными клетками), которые ответственны за представление экзогенных пептидов CD4⁺ Т-лимфоцитам. Экспрессия HLA-II также может повышаться на эпителиальных клетках и эндотелиальных клетках сосудов после воздействия провоспалительных цитокинов.

Схема строения молекул HLA-II представлена на рисунке 2. HLA-II представляют собой гетеродимер, состоящий из α - и β -цепей, при этом каждая цепь состоит из двух доменов: $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\beta 1$, $\beta 2$. Домены $\alpha 1$ и $\beta 1$ образуют антигенсвязывающую щель и являются наиболее вариабельной областью. Молекулы HLA II класса участвуют в защите от внеклеточных патогенов, в том числе от бактерий.

Эволюция иммунной системы человека проходила таким образом, чтобы выработать эффективную защиту от вирусов, бактерий, паразитов и других патогенов. Гипервариабельность локуса HLA, которая достигается в основном за счет однонуклеотидных полиморфизмов (*англ.*, single-nucleotide polymorphism, SNP), существенно расширяет способность антигенсвязывающей щели связываться с тем или иным чужеродным пептидом (Robinson *et al.*, 2017). Таким образом, аллельные изменения приводят к тому, что различающиеся белковые структуры комплекса HLA-пептид способны более эффективно представить широкий спектр пептидов одному и тому же набору Т-клеточных рецепторов. На популяционном уровне наиболее важен тот факт, что высокое разнообразие гаплотипов HLA в пределах одной популяции или этнической группы существенно повышает вероятность выживания членов этой группы в условиях разнообразия патогенов (Jin & Wang, 2003).

Генетическое разнообразие аллелей HLA создает сложности при трансплантации тканей и органов. Степень соответствия HLA между донором и реципиентом влияет на

успешность трансплантации, а несовпадение антигенов HLA донора и реципиента приводит к отторжению пересаженного органа или реакции трансплантата против хозяина.

1.1.2. Иммунный ответ при аллогенной трансплантации

Когда донорский орган, например почка, трансплантируется реципиенту, этот орган называется аллотрансплантатом. Иммунный ответ реципиента на аллотрансплантат инициируется распознаванием антигенов донорского органа (аллоантигенов) Т-клетками реципиента и является первым шагом в серии сложных событий, изучением которых занимается трансплантационная иммунология.

Существует три типа отторжения: гиперострое, острое и хроническое. Гиперострое отторжение развивается сразу после трансплантации, чаще в интервале до нескольких часов (Moreau *et al.*, 2013). Данный тип отторжения происходит при ксенотрансплантации, а также при наличии предсуществующих антител (например, после беременности или при повторной трансплантации от одного и того же донора – так называемая форма вторичного отторжения – реакция second set). При гиперостром отторжении предсуществующие антитела взаимодействуют с эндотелием трансплантата, что приводит к массивному тромбозу капилляров и некрозу трансплантированной ткани. Такая форма отторжения также происходит в случае трансплантации васкуляризированных органов при несовместимости по системе аллогенов ABO (Kawagishi & Satomi, 2008). Однако стоит отметить, что современные методы перекрестного типирования сделали крайне редким явление гиперострого отторжения посредством HLA-реактивных антител.

Второй тип отторжения, называемое острым отторжением, начинает проявляться спустя несколько дней или недель после трансплантации. Отторжение трансплантата возникает как в результате прямого цитотоксического действия иммунных клеток (в основном CD8⁺ Т-клеток), так и при участии сформировавшихся за это время специфических антител. Клиническая картина острого отторжения выражается в нарушении кровоснабжения трансплантата, тромбоза сосудов, некроза тканей и последующего отделения трансплантата от ложа (Ярилин, 2010). Острая фаза купируется применением иммуносупрессивных препаратов и часто переходит в более медленную, или хроническую форму, которая характеризуется постепенным отмиранием клеток (Holt, 2017). Именно хроническая форма воспаления является основной причиной отторжения донорских органов. Даже в условиях эффективных современных схем иммуносупрессивной терапии отторжение может возникнуть в течение нескольких лет после трансплантации.

Острое отторжение прежде всего инициируется повреждением клеток, которое происходит в результате хирургического вмешательства и последующего извлечения донорских тканей и органов (Moreau *et al.*, 2013). Само повреждение клеток и тканей приводит к экспрессии DAMPs (damage-associated molecular patterns) - молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением. DAMPs, к которым относятся активные формы кислорода, белки теплового шока, гепарин сульфат и HMBG-1 (high mobility group box 1 protein), распознаются клетками врожденной иммунной системы с помощью паттерн-распознающих рецепторов (*англ.*, pattern recognition receptors, PRRs). Это приводит к сборке инфламмасом (Ogura *et al.*, 2006), что усиливает транскрипцию генов и выработку различных медиаторов воспаления и хемоаттрактантов, стимулирующих адаптивный иммунитет. Таким образом, реакция на повреждение ткани и сопутствующее воспаление будет стимулировать миграцию донорских АПК в лимфоидную ткань реципиента, где они столкнутся с Т-клетками реципиента (van Kooten *et al.*, 2011).

Распознавание аллоантигенов Т-клетками – это первый этап адаптивного иммунного ответа (Siu *et al.*, 2018). Оно происходит тремя различными способами. В случае прямого пути Т-клетки реципиента распознают интактные аллогенные (т.е. донорские) молекулы HLA. При непрямом пути сначала происходит захват чужеродных молекул, их процессинг в ЭПР и дальнейшее представление Т-клеткам реципиента в виде пептидов в составе комплекса с собственными HLA-I/II. При полупрямом пути дендритные клетки (ДК) реципиента (или другие АПК) в результате обмена фрагментами клеточной мембраны способны интернализировать донорские комплексы HLA-пептиды, которые в интактном виде распознают Т-клетки реципиента (Gökmen *et al.*, 2008).

Распознавание антигенов по прямому пути играет доминирующую роль в иницировании адаптивного иммунного ответа на трансплантат и очень важен в раннем посттрансплантационном периоде (Benichou *et al.*, 2011). Этот путь запускается преимущественно миграцией донорских «клеток-пассажира» во вторичные лимфоидные органы реципиента, что упоминалось выше. Стоит отметить, что поскольку в трансплантируемом органе или ткани обычно присутствует конечное количество «клеток-пассажира», предполагается, что роль прямого пути в отторжении аллотрансплантата будет уменьшаться со временем (Moreau *et al.*, 2013). Однако, другие типы донорских клеток, например, эндотелиальные клетки, также могут стимулировать Т-клетки реципиента по прямому пути в более долгосрочной перспективе. Непрямой путь распознавания обычно начинает преобладать при хроническом отторжении (Siu *et al.*, 2018). Пока аллотрансплантат присутствует в организме пациента, его АПК смогут улавливать и процессировать чужеродные антигены и, следовательно, запускать иммунный

ответ. Именно поэтому поддерживающая иммуносупрессивная терапия необходима для предотвращения отторжения трансплантата.

Активация Т-клеток является ключевым процессом отторжения аллотрансплантата (Siu *et al.*, 2018). Инициация внутриклеточной передачи сигналов требует взаимодействия Т-клеточного рецептора (TCR) и ко-рецептора CD3. Однако одного сигнала, идущего от комплекса TCR-CD3 (сигнал 1), недостаточно для активации наивных Т-клеток (Ярилин, 2010). Для полной активации Т-клеток необходимы два сигнала. Сигнал 2, или костимулирующий сигнал, обеспечивается взаимодействием костимулирующих молекул на поверхности Т-клеток (CD28, CD154) и АПК (CD80/86, CD40). Комбинация сигналов 1 и 2 активирует Т-клетки: они подвергаются клональной экспансии и продуцируют большое количество цитокинов. В зависимости от микроокружения и дополнительных сигналов Т-клетки дифференцируются в CD8⁺ Т-киллеры или CD4⁺ Т-хэлперы (Ярилин, 2010).

Далее, в отсутствие иммуносупрессивной терапии посредством клеточных и гуморальных ответов, происходит отторжение трансплантируемых органов и тканей (Moreau *et al.*, 2013). Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (*англ.*, cytotoxic T-lymphocytes, CTLs) мигрируют в область аллографта, где они напрямую распознают аллогенные клетки-мишени и высвобождают гранулы, содержащие перфорин и гранзим В. Также CTLs повышают экспрессию лиганда Fas на поверхности клеток (FasL) и секретируют растворимые медиаторы воспаления, в том числе TNF. Цитолиз клеток-мишеней происходит по контактному механизму (Ярилин, 2010). Перфорины полимеризуются и внедряются в клеточную мембрану клетки-мишени, образуя пору, что облегчает проникновение гранзима В в клетку. Гранзим В – это протеаза, которая способна инициировать апоптоз с помощью нескольких механизмов, включая активацию каскада каспаз. Связывание FasL с Fas на поверхности клетки-мишени также способно инициировать апоптоз (Kawahara *et al.*, 1998).

В свою очередь, В-клетки вырабатывают донор-специфичные антитела, которые могут вызвать отторжение в течение нескольких дней после трансплантации или способствовать более поздней потере трансплантата (Chong *et al.*, 2019). Механизм повреждений, опосредованный антителами, связан, в первую очередь, с комплемент-зависимой цитотоксичностью (Thorgeresen *et al.*, 2019). Также повреждение трансплантата может быть вызвано с помощью других механизмов: например, через FC-рецептор на поверхности НК-клеток, макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов (антителозависимая клеточная цитотоксичность). Обычно В-клетки рассматриваются только как клетки, секретирующие антитела, но они также могут выступать в роли АПК, взаимодействуя с Т-клетками реципиента (для обзора см. Chong, 2020). Также В-клетки экспрессируют

рецепторы компонентов комплемента и могут взаимодействовать с клетками, покрытыми комплементом, облегчая презентацию антигена и, следовательно, регуляцию адаптивного иммунитета.

Помимо создания воспалительного «фона», способствующего активации клеток адаптивной иммунной системы в раннем посттрансплантационном периоде, врожденная иммунная система также рассматривается как важный фактор в иммунном отторжении (Li, 2010). Макрофаги мигрируют в трансплантат в ответ на провоспалительные цитокины, такие как IL-1b и IL-6. Там они могут продуцировать активные формы кислорода, оксид азота и ферменты, которые потенциально могут вызвать повреждение эндотелия и паренхимы сосудов (Moreau *et al.*, 2013). Нейтрофилы также вырабатывают активные формы кислорода и частично опосредуют повреждение тканей, вначале связываясь с эндотелиальными клетками, а потом посредством секреции и дегрануляции гепарин-связывающего белка (Sprahn *et al.*, 2014). Позже, в процессе хронического отторжения нейтрофилы могут выполнять роль АПК и усиливать активацию Т-клеток. Кроме того, они могут связывать аллоантитела через FC-рецепторы, что запускает антителозависимую цитотоксичность, либо ведет к опсонизации поврежденной или некротической донорской ткани, что также усиливает презентацию антигена (Scozzi *et al.*, 2017).

Интересна роль НК-клеток в трансплантационном иммунитете (Рис. 3). НК-клетки вырабатывают провоспалительные цитокины, в частности IFN γ и TNF, что, вероятно, индуцирует и усиливает экспрессию молекул HLA и костимулирующих рецепторов на АПК, тем самым повышая эффективность созревания профессиональных АПК. В дополнение к выработке цитокинов НК-клетки могут непосредственно (контактный цитолиз) или через взаимодействие с антителами (антитело-зависимая цитотоксичность) воздействовать на пересаженную ткань и орган (Adenugba, 2017). Цитотоксическая активность НК-клеток опосредуется по перфорин-гранзимовому механизму, а также через взаимодействие с Fas-L, что приводит к разрушению приживленной ткани (Ярилин, 2010). Результат взаимодействия НК-клеток с клеткой-мишенью будет определяться балансом сигналов, поступающих от лигандов ингибирующих и активирующих рецепторов НК-клеток (Lanier, 2005). В то же время возможен аллореактивный ответ НК-клеток ввиду полиморфизма НК-клеточных рецепторов. Однако в отличие Т-клеток, которые распознают чужеродные молекулы, аллореактивность НК-клеток определяется по механизму распознавания «отсутствие своего», например, в случае отсутствия лиганда для того или иного рецептора KIR (KIR2DL1 или KIR2DL3). Впервые влияние генотипа KIR/HLA было продемонстрировано при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) (Ruggeri *et al.*, 2002). Однако, стоит отметить, что популяция НК-

клеток очень неоднородна, и гены рецепторов KIR экспрессируются стохастическим образом (Villard *et al.*, 2011). Было показано, что НК-клетки не экспрессируют одновременно все гены, кодирующие KIRs, однако могут одновременно экспрессировать от 0 до 4 рецепторов семейства KIR. Таким образом, популяции НК-клеток с уникальным репертуаром рецепторов KIR могут оказывать значительное влияние на уровень аллореактивности в контексте трансплантационного иммунитета.

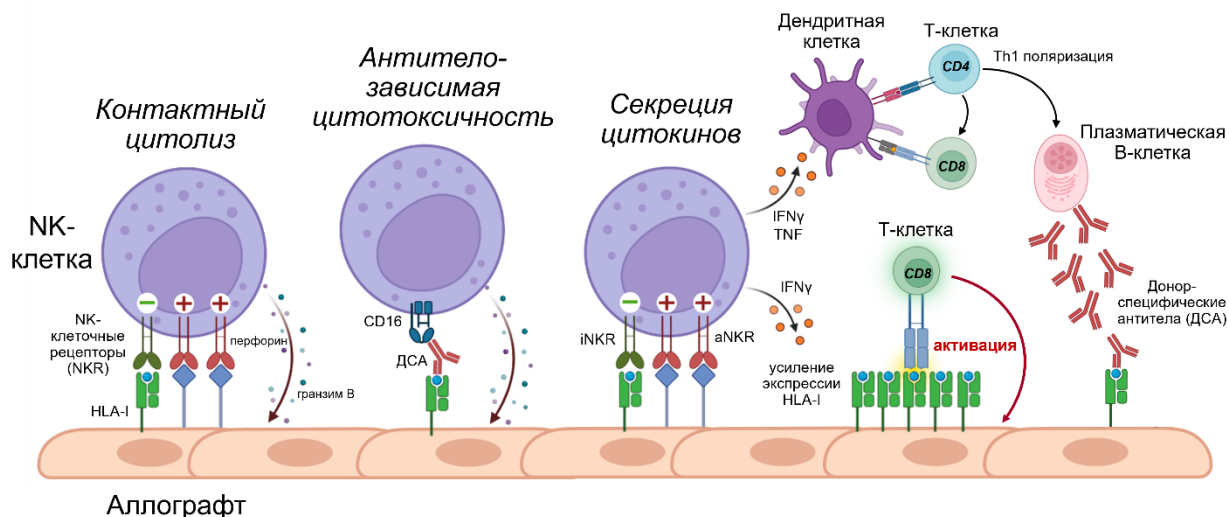


Рисунок 3. Роль НК-клеток в трансплантационном иммунитете. По материалам Duugu *et al.*, 2021.

Также, некоторые субпопуляции НК-клеток обладают иммунорегуляторными функциями (для обзора см. Pontrelli *et al.*, 2020). В мышинной модели, в частности, было показано, что НК-клетки могут продуцировать высокие уровни IL-10, проявляя таким образом толерогенное действие (Jiang *et al.*, 2007). Помимо этого, активированные НК-клетки могут непосредственно элиминировать ДК донора, тем самым способствуя выживаемости трансплантата (Veilke *et al.*, 2005).

Стоит также упомянуть о другой группе антигенов, вызывающих тканевую несовместимость – минорных антигенах гистосовместимости (miHA). Так называют небольшие эндогенные эпитопы в контексте молекул HLA I класса, которые распознаются CD8⁺ Т-клетками и могут быть причиной отторжения трансплантата (Dierselhuis & Goulmy, 2009). Наиболее частой причиной возникновения miHA служат несинонимичные SNP, которые приводят к формированию иной аминокислотной последовательности белка. Особенно важную роль играют miHA в развитии реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), даже при правильном подборе пары донор-реципиент (Spierings, 2014). При этом роль miHA в трансплантации солидных органов недостаточно изучена ввиду крайне малого числа неродственных пересадок органов, полностью совпадающих по всем локусам HLA.

Одним из самых известных miNA является H-Y miNA, который закодирован на Y-хромосоме у мужчин и может индуцировать иммунный ответ при пересадке органа от донора мужского пола женщине-реципиенту (Scott *et al.*, 1997).

1.1.3. Принципы подбора донора для аллогенной трансплантации. Иммуносупрессия

Успешную пересадку органов можно назвать одним из величайших достижений в истории медицины. Наиболее часто трансплантируемыми органами в мире являются почки, реже пересаживают печень, сердце и другие органы (Lewis *et al.*, 2021). Среди тканей наиболее пересаживаемыми являются трансплантаты роговицы и костно-мышечной ткани.

В подавляющем большинстве случаев иммунологическая совместимость тканей определяет успех операции, особенно это касается трансплантации ГСК. Именно трансплантация ГСК требует наиболее строгого совпадения по локусу HLA между донором и реципиентом – необходимы минимум 9/10 совпадающих аллелей в пяти локусах HLA (HLA-A, -B, -C, -DQB1 и -DRB1), однако даже это не отменяет риска возникновения РТПХ (Caillat-Zucman *et al.*, 2004). Трансплантация солидных органов требует менее строгого соответствия HLA, чем трансплантация ГСК. Обычно, например, перед трансплантацией почки или поджелудочной железы проводят типирование локусов HLA-A, -B и -DR (3 пары, 6 антигенов). При этом есть сведения, что основное влияние на долгосрочное приживление трансплантата оказывает совпадение антигена DR, так при трансплантации почки порядок совпадения HLA должен быть следующим DR > B > A (Süsal & Opelz, 2013).

Риск острого отторжения наиболее высок в первые месяцы после трансплантации (фаза индукции) и снижается впоследствии (фаза поддержания). Современные протоколы иммуносупрессивной терапии достаточно эффективны, и хроническое отторжение наблюдается не более чем в 15% случаев при первичных трансплантациях (Moreau *et al.*, 2013). В раннем пост-трансплантационном периоде применяются наиболее высокие дозы иммуносупрессивной терапии, которые впоследствии постепенно снижаются. В настоящее время общепринятые протоколы иммуносупрессии состоят из тройного терапевтического режима: большинство пациентов получают ингибиторы кальциневрина (циклоспорин или такролимус), антипролиферативные агенты (азатиоприн или микофеноловую кислоту), а также кортикостероиды (Holt, 2017). Кортикостероиды обладают широким противовоспалительным действием, блокируют секрецию многих цитокинов, а также, вероятно, вызывают апоптоз незрелых тимоцитов в корковом слое тимуса. Ингибиторы кальциневрина также блокируют синтез цитокинов, в основном IL-2, который необходим для активации и экспансии лимфоцитов (Matsuda & Koyasu, 2000). Антипролиферативные агенты ингибируют *de novo* синтез нуклеотидов, тем самым предотвращая клональную

экспансию. В настоящее время продолжается разработка новых иммуносупрессивных препаратов, которая направлена не только на улучшение краткосрочных результатов, но и на достижение максимальной безопасности для пациентов, меньшей нефротоксичности и минимальных побочных эффектов (Parlakpınar & Gunata, 2021).

Длительный прием иммуносупрессивной терапии ассоциирован с рядом нежелательных побочных эффектов. Во-первых, общее угнетение иммунной функции сильно повышает риски различных инфекций, которые особенно опасны в ранний пост-трансплантационный период. Во-вторых, практически вдвое повышается риск формирования злокачественных новообразований, например, базальноклеточного рака кожи и пост-трансплантационного лимфопролиферативного синдрома (Bolton & Bradley, 2015). Среди других побочных эффектов иммуносупрессивной терапии можно выделить сахарный диабет, увеличение массы тела, гипертонию и остеопороз (Holt, 2017).

Помимо рассмотренных выше проблем, связанных с иммунным отторжением и применением иммуносупрессивной терапии, важнейшей проблемой современной трансплантационной медицины остается хронический дефицит органов и тканей, как постмортального происхождения, так и от живых доноров (Orlando *et al.*, 2013). Прогресс, достигнутый за последнее десятилетие в области биологии плюрипотентных стволовых клеток, способствует внедрению технологий заместительной клеточной терапии в широкую клиническую практику. По всей видимости, регенеративная медицина сможет помочь решить сразу две острые проблемы трансплантологии: найдет неиссякаемый источник органов и тканей и сделает возможным проведение трансплантации без использования иммуносупрессивных препаратов.

1.2.1. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

В 2006 году Такахаши и Яманака показали, что эмбриональные фибробласты мыши могут быть репрограммированы до плюрипотентного состояния при совместной эктопической экспрессии транскрипционных факторов Oct4 (octamer-binding transcription factor 4, или POU5F1), Sox2 (SRV sex determining region Y box 2), Klf4 (Krueppel-like factor 4) и c-Myc (v-Myc myelocytomatosis avian viral oncogene homolog), комбинация которых теперь известна как «коктейль Яманаки». (Takahashi & Yamanaka, 2006). Полученные клетки получили название индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Уже в следующем году с использованием тех же, или аналогичных факторов были получены первые линии ИПСК человека (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Открытие технологии репрограммирования произвело настоящую революцию в биомедицинских исследованиях.

ИПСК обладают свойством плюрипотентности, характерным для ЭСК, т.е. способностью к дифференцировке в производные трех зародышевых листков и способностью к неограниченной пролиферации. Однако получение ИПСК не требует разрушения эмбриона, что снимает этические проблемы при работе с данным типом клеток. Более того, технология репрограммирования позволяет получать ИПСК из соматических клеток пациентов с наследственными заболеваниями, что особенно важно для моделирования различных заболеваний. Также ИПСК имеют огромные перспективы в качестве инструмента для разработки и скрининга новых лекарственных препаратов, а также развития клеточной терапии и персонализированной медицины.

Фибробласты – один из наиболее часто используемых для репрограммирования типов клеток (Hanna *et al.*, 2010). Фибробласты сравнительно легко и с хорошей эффективностью поддаются репрограммированию, также их достаточно просто и дешево культивировать. С другой стороны, биопсия кожи — это инвазивная и болезненная процедура, и не каждый донор может согласиться на ее проведение. В этой связи сейчас чаще стали репрограммировать мононуклеары периферической крови (*англ.*, peripheral blood mononuclear cells, PBMCs). Во-первых, забор крови – это практически не инвазивная процедура, при этом для получения ИПСК требуется совсем небольшой объем крови, около 2–4 мл. Во-вторых, PBMCs могут быть репрограммированы вскоре после отбора крови, в то время как изолированные фибробласты сначала должны быть размножены и пассированы перед репрограммированием.

Существует множество способов, с помощью которых можно доставить факторы коктейля Яманаки в ядро клетки (Рис. 4). Изначально для получения ИПСК широко использовали ретровирусные и лентивирусные конструкции. Наибольшее распространение получили именно лентивирусы, так как данный метод отличается относительной дешевизной, методологически прост, доступен практически в любой лаборатории и хорошо отработан (Yu *et al.*, 2007). Более того, лентивирусы, в отличие от ретровирусов, способны реплицироваться и в неделящихся клетках (Stadtfeld & Hochledinger, 2010). Однако оба типа вируса случайным образом интегрируют в геном клетки, что увеличивает риск мутагенеза. По этой причине были разработаны и оптимизированы неинтеграционные методы: с использованием аденовирусов (Stadtfeld *et al.*, 2008), вируса Сендай (Fusaki *et al.*, 2009), плазмид (Okita *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2011) транспозонов piggyBac (Woltjen *et al.*, 2009; Yusa *et al.*, 2009), мРНК (Warren *et al.*, 2010) и рекомбинантных белков (Kim *et al.*, 2009). Среди перечисленных методов наиболее часто применяется вирус Сендай благодаря двум характерным преимуществам. Во-первый, вирус Сендай – это РНК-вирус, который не проникает в ядро и не может интегрировать в геном клетки. Во-вторых, и для фибробластов,

и для PBMCs средняя эффективность репрограммирования с использованием вируса Сендай достигает 0,1% (Seki *et al.*, 2010), этот показатель признан высокоэффективным.

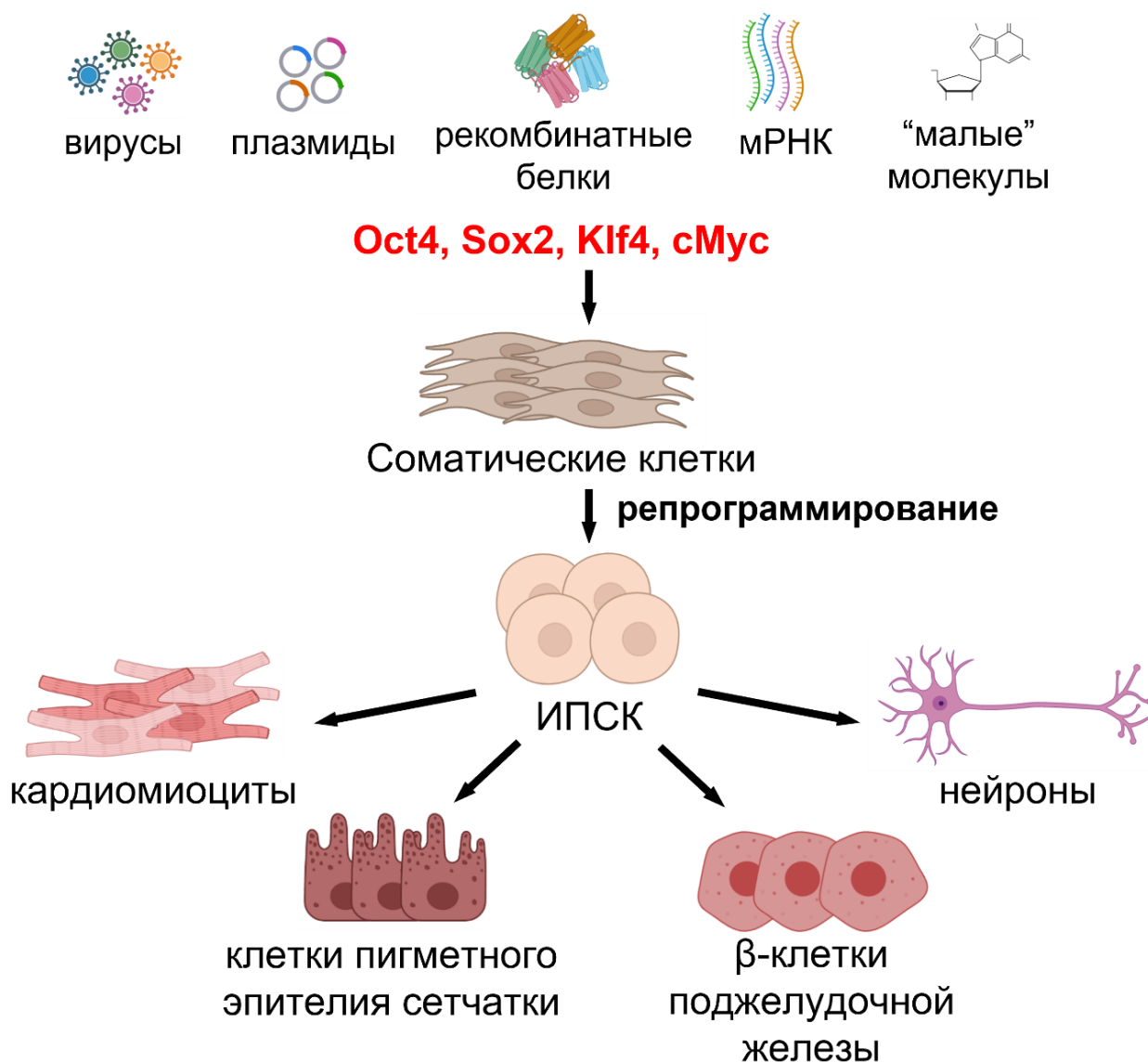


Рисунок 4. Векторы, используемые для репрограммирования соматических клеток, и возможность дифференцировать полученные ИПСК в различные производные (по материалам <https://www.mirusbio.com/applications/stem-cell-solutions>).

Международная инициативная группа по банкированию стволовых клеток определила конкретные критерии, которые должны быть соблюдены для каждой полученной линии ИПСК (Crook *et al.*, 2010). Большинство исследовательских лабораторий и биобанков также имеют общие критерии, необходимые для характеристики линий ИПСК. При этом в качестве «золотого стандарта» сравнения для характеристики ИПСК используют линии ЭСК.

В первую очередь, ИПСК должны обладать характерной морфологией, подобной морфологии ЭСК. ИПСК формируют плоские ровные колонии с плотными клеточными контактами, а клетки внутри колоний отличаются высоким ядерно-цитоплазматическим

соотношением, ядра клеток – хорошо заметным ядрышком. Далее определяют маркеры плюрипотентных клеток: должна быть подтверждена экспрессия характерных для ПСК ядерных транскрипционных факторов (ОCT4 и NANOG) и поверхностных молекул (SSEA-4 и TRA-1-60/81). Сюда также относится тест на активность эндогенной щелочной фосфатазы (Takahashi *et al.*, 2007). Помимо этого, должен быть проведен тест на замолкание трансгена, анализ кариотипа для выявления хромосомных аномалий, а также анализ на микробиологическую чистоту. Обязательно также подтверждение генетической идентичности ИПСК исходным донорским клеткам, например, с помощью STR-анализа (от STR-short tandem repeats) для исключения возможности контаминации другими клеточными культурами.

Определяющим свойством ИПСК является плюрипотентность – способность развиваться во все типы соматических клеток. Поэтому следующим пунктом характеристики ИПСК служит оценка потенциала дифференцировки каждой линии. Наиболее часто проводят функциональный тест *in vitro* через стадию эмбрионидных телец или *in vivo* через образование тератом при инъекции иммунодефицитным мышам.

1.2.2. Банкирование плюрипотентных стволовых клеток

Технология репрограммирования позволяет получать аутологичные пациент-специфические ИПСК и их производные, что должно снять вопрос об иммунном отторжении. Однако, в персонализированной модели имеется ряд недостатков. Во-первых, это длительное время, требуемое на получение линии ИПСК для каждого пациента. По различным оценкам, весь процесс может занимать до 4–6 месяцев, начиная с выделения соматических клеток донора и заканчивая тщательной характеристикой линии ИПСК (Madrid *et al.*, 2021). Дальнейшая дифференцировка, а также контроль качества дифференцированных производных может занимать еще 3–6 дополнительных месяцев. В связи с длительностью ожидания готовых клеточных продуктов подобная терапия может быть доступна только для лиц с хроническими заболеваниями и не подходит для более срочных случаев. Во-вторых, это дороговизна получения линий ИПСК. Согласно недавним оценкам, получение одной линии ИПСК, которую можно будет использовать в клинической практике, обходится примерно в 800 000 долларов США (Doss & Sachinidis, 2019). Стоимость получения линии ИПСК в исследовательской лаборатории намного меньше, однако по некоторым оценкам может достигать 20 000 долларов США (Huang *et al.*, 2019).

В целях снижения затрат на производство охарактеризованных линий ИПСК было предложено создать банк линий ПСК, гомозиготных по HLA (Taylor *et al.*, 2012). HLA-

гомозиготные клетки, в отличие от HLA-гетерозиготных, обладают более широким потенциалом совместимости: они должны соответствовать только одному из двух гаплотипов HLA реципиента, чтобы избежать отторжения. Предполагается, что эта стратегия может стать альтернативой персонализированной терапии.

Некоторые авторы провели расчеты для определения минимального количества гомозиготных линий ИПСК, которые потенциально могли бы подойти той или иной популяции. Например, для получения ИПСК, подходящих 93% населения Великобритании, требуется 150 HLA-гомозиготных линий (Taylor *et al.*, 2012), а для 90% населения Японии – всего 50 линий (Nakatsuji *et al.*, 2008).

Однако у данного подхода есть свои ограничения, в первую очередь, связанные с полиморфизмом локуса HLA, что подробно было описано ранее. Гетерогенность гаплотипов HLA, равно как и их представленность, сильно варьирует в зависимости от географического региона и этнических групп. Поэтому в странах с этнически более разнообразным населением, например, в США или в России, таких линий потребуется в несколько раз больше, чем для более гомогенного по HLA населения, например, Японии. Следует отметить, что для создания банка из всего 20 HLA-гомозиготных линий с наиболее часто встречаемыми гаплотипами нужно типировать 26 тысяч европеоидных американцев и 110 тысяч афроамериканцев (Gourraud *et al.*, 2012). Во-вторых, при создании гапlobанков необходимо учитывать совместимость по системе групп крови ABO, чтобы избежать гиперострого отторжения при трансплантации васкуляризированных органов и тканей (Solomon *et al.*, 2015). Таким образом, донор для гапlobанка должен соответствовать сразу двум условиям: быть гомозиготным по HLA и иметь I (O) группу крови.

Очевидно, что данная альтернатива персонализированной терапии также является дорогостоящей, требует большого количества времени и ресурсов для массового тестирования добровольцев и создания клеточных линий в GMP-условиях. Развитие гапlobанков и последующее клиническое применение «гаплолиний» возможно только в условиях международного сотрудничества. Наиболее известным банком HLA-гомозиготных линий ИПСК является центр исследования и применения ИПСК в Киото (<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/e/>), где банкирование ведется с 2012 года. Также существуют банки линий ИПСК, которые специализируются на создании большой коллекции донорских линий, не обязательно гомозиготных по HLA. Наиболее крупным из них является Калифорнийский институт регенеративной медицины (California Institute for Regenerative Medicine – CIRN). Этот банк обладает уникальной коллекцией из более чем 1500 линий ИПСК, из них более 200 были получены от пациентов с различными заболеваниями, включая кардиомиопатии и болезнь Альцгеймера.

Несмотря на оптимистичные прогнозы в отношении потенциального применения гапlobанков, следует помнить, что совпадения по гаплотипу HLA может быть недостаточно для предотвращения аллогенного отторжения и отмены иммуносупрессивной терапии. Так, при неродственной трансплантации различные mHA неизбежно будут способствовать аллореактивности. Более того, аллореактивность может быть опосредована и действием NK-клеток вследствие взаимодействия разных аллелей HLA-C с ингибирующими рецепторами NK-клеток семейства KIR.

Все аллели HLA-C делятся на две группы – HLA-C1 и HLA-C2 – в зависимости от последовательности аминокислот в позициях 77 и 80 альфа-цепи, что определяет их способность связываться с рецепторами NK-клеток KIR2DL3 и KIR2DL1, соответственно (Moffett & Colucci, 2015). По этому принципу все доноры и реципиенты могут быть поделены на следующие группы: HLA-C1/C1, HLA-C1/C2 и HLA-C2/C2. NK-клетки в процессе лицензирования и созревания обретают толерантность к определенному набору аллелей HLA-C на собственных клетках. Поэтому в случае трансплантации гомозиготных клеток гетерозиготному HLA-C1/C2 реципиенту его NK-клетки будут отвечать на отсутствие любого из KIR-лигандов. Схема лицензирования и условия ответа NK-клеток на несовпадение HLA-C представлена на рисунке 5.

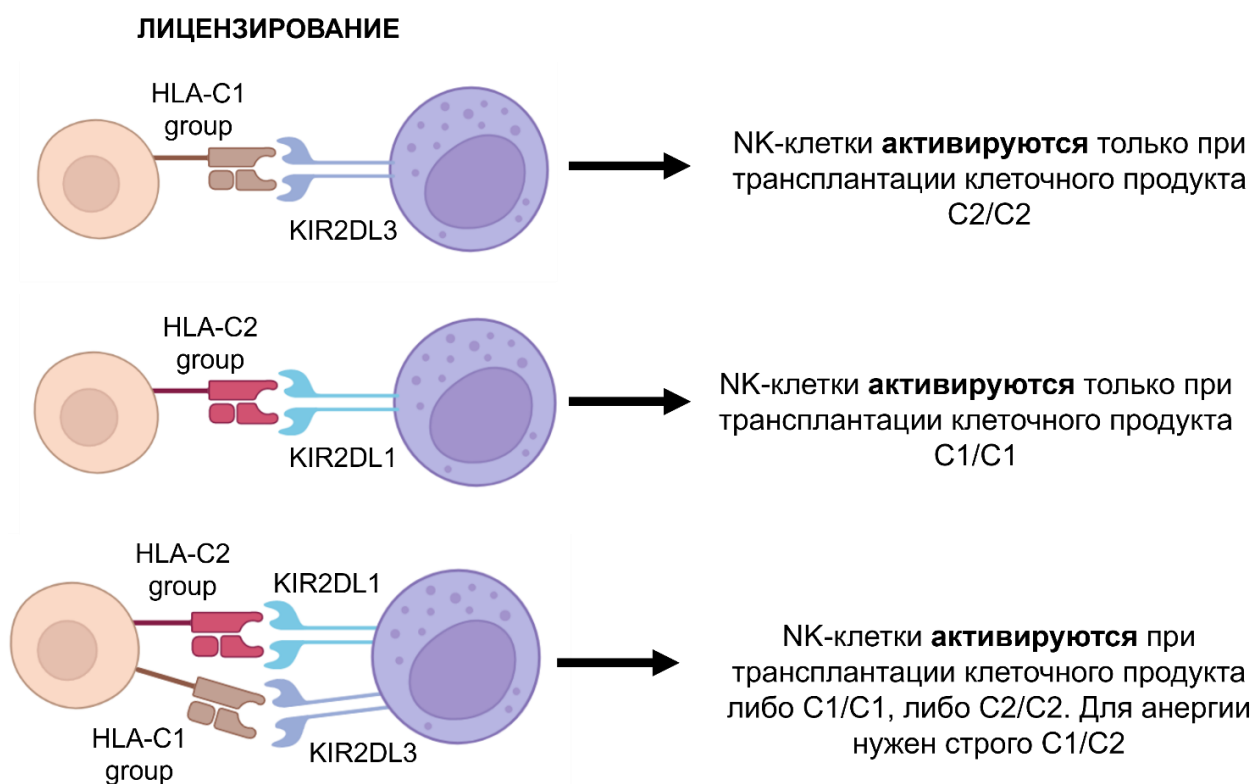


Рисунок 5. Лицензирование NK-клеток реципиента. Слева указаны соматические клетки реципиентов с разными аллелями HLA-C, в центре NK-клетки реципиентов с соответствующими рецепторами KIR, справа – условие активации NK-клеток реципиента.

Недавно эта гипотеза была подтверждена на клетках, дифференцированных из HLA-гомозиготных линий ИПСК (Ichise *et al.*, 2017). Авторы этой работы показали, что HLA-C1/C2 NK-клетки, выделенные из крови здоровых доноров, лизируют Т-клетки и эндотелиальные клетки, дифференцированные из HLA-C1/C1 ИПСК. В свою очередь, эктопическая экспрессия HLA-C2 в дифференцированных HLA-C1/C1 производных приводила к снижению NK-клеточного ответа. Несмотря на то, что влияние несовпадения KIR-лигандов в трансплантации солидных органов изучено мало, данный механизм аллореактивности также необходимо учитывать при трансплантации производных HLA-гомозиготных ИПСК.

1.2.3. Иммуногенность плюрипотентных стволовых клеток и их производных

ИПСК – многообещающий источник клеток для заместительной терапии и регенеративной медицины. Изначально предполагалось, что использование аутологичных ИПСК решит такие проблемы, как отторжение аллотранспланта и необходимость применения иммуносупрессии. Таким образом, главным преимуществом аутологичных ИПСК и их производных считалась их иммунотолерантность (Barrilleaux & Knoepfler, 2011). Возможность, что клетки, дифференцированные из аутологичных ИПСК, могут спровоцировать возникновение иммунного ответа, широко не рассматривалась до публикации Zhao *et al.* (2011). В этом исследовании авторы показали, что подкожное введение сингенных ИПСК мышам приводило к образованию зон инфильтрации Т-клетками, что сопровождалось последующим некрозом и регрессом образовавшихся тератом. При этом сингенные ЭСК с тем же генетическим бэкграундом значительно реже вызывали иммунный ответ. Авторы отметили, что частота отторжения ИПСК значительно снижалась при использовании эписомных векторов для репрограммирования исходных соматических клеток, хотя в последнем случае сформированные тератомы все равно отторгались с частотой 10–20%, и большинство из них были также инфильтрированы Т-клетками. Тем не менее, данные результаты были встречены в научном сообществе с некоторым скептицизмом, во многом в связи с тем, что недифференцированные ИПСК не рассматриваются в качестве источника клеток для клинического применения (Barrilleaux & Knoepfler, 2011).

Более поздние работы оказались достаточно противоречивыми, хотя большая часть все-таки свидетельствует о безопасности сингенных производных ИПСК. Об обратном свидетельствовали единичные исследования. Первая работа предоставила дополнительные доказательства иммуногенности клеток, полученных из сингенных ИПСК (Araki *et al.*, 2013). Авторы обнаружили аналогичную частоту отторжения тератом, сформированных

как сингенными ИПСК, так и ЭСК. Было высказано предположение, что иммунный ответ на тератомы потенциально связан с экспрессией генов, регулирующих плюрипотентность. Кроме того, в этой работе были впервые обнаружены признаки иммунного ответа на терминально дифференцированные производные сингенных ИПСК. При трансплантации кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, сингенным мышам авторы наблюдали значительный уровень инфильтрации Т-клетками.

Во второй работе сообщалось о полной выживаемости тератом, сформированных сингенными ПСК, хотя в некоторых тератомах все-таки наблюдались зоны инфильтрации Т-клетками, но это не приводило к дальнейшему отторжению (Guha *et al.*, 2013). Далее авторы сравнили иммуногенность эндотелиальных клеток, гепатоцитов и нейрональных предшественников, дифференцированных из сингенных ЭСК и ИПСК. Дифференцированные производные ИПСК не вызвали признаков специфического Т-клеточного ответа ни в *in vitro* модели, ни при трансплантации сингенным мышам. Таким образом, степень иммуногенности ПСК может снижаться по мере последующей дифференцировки, что также было показано и в другой работе (de Almeida *et al.*, 2014).

В том же году было опубликовано исследование, в котором сравнивался иммунный ответ на аутологичную и аллогенную трансплантацию дофаминергических нейронов среднего мозга, дифференцированных из ИПСК, в мозг приматов (Morizane *et al.*, 2013). Авторы обнаружили, что значительное количество микроглии и Т-клеток инфильтрировало аллотрансплантаты, в то время как аутологичные нейроны вызвали минимальную реакцию иммунных клеток. Похожая работа была проведена на нейрональных предшественниках ИПСК, где также не наблюдали существенной инфильтрации в зонах аутологичных трансплантированных клеток (Emborg *et al.*, 2013). Интересно отметить, что в некоторых случаях все-таки детектировался ограниченный Т-клеточный ответ на аутологичные дофаминергические нейроны, если те были дифференцированы из ИПСК, полученных с помощью ретровирусных конструкций. При этом репрограммирование эписомальными векторами не приводило к иммунному ответу аутологичных Т-клеток. Эти данные могут свидетельствовать о том, что вирусная интеграция факторов плюрипотентности может влиять на иммуногенность финальных клеточных продуктов.

Стоит отметить некоторые ограничения данной работы. В первую очередь, провести анализ иммунного ответа авторы смогли только после эвтаназии модельных животных, примерно через 3–4 месяца после трансплантации. Были предприняты попытки отследить иммунные реакции в динамике с помощью позитронно-эмиссионной томографии или путем измерения цитокинов в крови и спинномозговой жидкости, однако полученные результаты обладали высокой вариабельностью и слабо коррелировали с гистологическими

данными. Возможно, дополнительные временные точки могли бы точнее определить вероятность иммунного ответа на трансплантацию аутологичных производных ИПСК. Во-вторых, хотя авторы и продемонстрировали, что степень иммунного ответа была выше при трансплантации аллогенных дофаминергических нейронов, значительное количество аллогенных производных ИПСК не было отторгнуто даже в отсутствие иммуносупрессивной терапии. Данный феномен можно объяснить тем, что мозг является иммунопривилегированным органом. Более того, эти данные согласуются с клиническими наблюдениями за длительной выживаемостью аллогенных дофаминергических нейронов, полученных из фетального материала, у пациентов с болезнью Паркинсона, которые получали только кратковременную иммуносупрессию или вообще не получали (Kordower *et al.*, 2008; Mendez *et al.*, 2008).

Все предыдущие работы описывали иммуногенность ИПСК животных (мышей и приматов). Однако для клинического применения очень важно изучение иммуногенности аутологичных производных ИПСК человека. В 2015 году Zhao *et al.* (2015) изучили этот вопрос, используя гуманизованную мышиную модель с реконструированной иммунной системой человека. Они обнаружили зоны Т-клеточной инфильтрации и некроз тканей в большинстве тератом, сформированных из ИПСК. Тем не менее, степень иммунного ответа на аутологичные ИПСК оказалась слабее, чем на аллогенные ЭСК. В связи с этим авторы предположили, что только некоторые типы производных ИПСК могут быть причиной отторжения. Кроме того, глубокое секвенирование TCR репертуара инфильтрующих лимфоцитов выявило их олигоклональный характер, что свидетельствовало об антиген-специфичном ответе Т-лимфоцитов на аутологичные ИПСК. В случае аллогенных ЭСК был выявлен поликлональный репертуар TCR.

Для выявления потенциально иммуногенных тканей были проанализированы гистологические срезы тератом, инфильтрованных Т-клетками. Авторы обнаружили, что десмин-положительные гладкомышечные клетки (ГМК) значительно чаще окружены инфильтрующими Т-лимфоцитами, в то время как клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) практически не были инфильтрованы Т-лимфоцитами. Далее авторы провели сравнительный анализ иммуногенности двух типов клеток – ГМК и ПЭС. Оказалось, что аутологичные ГМК были более иммуногенными в связи с дерегулированной экспрессией опухолеассоциированных генов, в частности, *HORMAD1* и *ZG16*. Эктопическая экспрессия *Zg16* в клетках ПЭС приводила к значимому Т-клеточному ответу в аутологичных реципиентах.

Таким образом, данные об иммуногенности аутологичных производных ИПСК достаточно противоречивы. Тем не менее, большинство из них все-таки обнадеживают, как,

например, сравнительно недавняя работа, проведенная на гуманизированных мышах (Benabdallah *et al.*, 2021). С другой стороны, даже малая вероятность иммунного отторжения вызывает опасения в отношении трансплантации аутологичных производных ИПСК без иммунодепрессантов. Так как каждый тип клеток экспрессирует разные наборы генов и белков, вероятно, что для последующего клинического применения необходимо будет скринировать каждый тип клеток на иммуногенность (Kaneko & Yamanaka, 2013).

Несмотря на это, наиболее красноречивым ответом могут считаться результаты текущих клинических исследований с применением аутологичных производных ИПСК. В настоящее время опубликованы результаты трех трансплантации аутологичных клеток, дифференцированных из ПСК (Mandai *et al.*, 2017; Takagi *et al.*, 2019; Schweitzer *et al.*, 2020). В первых двух были трансплантированы клетки ПЭС для лечения возрастной макулярной дегенерации, а в третьем – дофаминергические клетки-предшественники для лечения болезни Паркинсона. Ни при одной трансплантации не применялась иммуносупрессивная терапия, но и не сообщалось о побочных эффектах. Справедливости ради, стоит отметить, что трансплантация проводилась в иммунопривилегированные органы – глаз и мозг.

1.2.4. Возможные причины иммуногенности производных ИПСК

До сих пор нет четкого понимания, что является ключевым фактором возможной иммуногенности аутологичных производных ИПСК. Так, одним из первых высказанных предположений о причинах иммуногенности ИПСК было использование разных репрограммирующих векторов. Еще в первой работе было показано, что тератомы, сформированные сингенными ИПСК, отторгались чаще при использовании ретровирусных векторов в качестве метода репрограммирования (Zhao *et al.*, 2011). В свою очередь, использование эписомных конструкций сильно снижало процент отторгнутых тератом. Похожие результаты были получены при трансплантации дофаминергических нейронов в мозг приматов (Morizane *et al.*, 2013). Ретровирусные и лентивирусные конструкторы преимущественно интегрируют в транскрипционно активные сайты, что может вызывать мутации, геномную нестабильность и хромосомные aberrации. Кроме того, есть сведения о том, что последующая активация трансгенов коррелирует с aberrантной продукцией иммуногенного белка Oct 4 (Dhodapkar *et al.*, 2010).

В целом, предполагается, что иммуногенность линий, полученных «неинтеграционным» способом, должна быть ниже в сравнении с линиями, полученными с помощью ретро- и лентивирусных конструкций, однако подробных исследований на этот счет никто не проводил. Данные, посвященные сравнению геномной нестабильности в линиях ИПСК, полученных разными способами репрограммирования, достаточно

противоречивы. Так, одни исследователи сообщают о схожем количестве точечных мутаций (Bhutani *et al.*, 2016), а также вариаций числа копий генов CNVs (copy number variations) (Popp *et al.*, 2018), а другие – наоборот, показывали вдвое меньшее число мутаций в безынтеграционных ИПСК (Sugiura *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015), а значит, и меньший шанс формирования потенциальных неоэпитопов. Частота генетических вариаций также была низкой в ИПСК человека, полученных с помощью эписомных конструкций (Cheng *et al.*, 2012). Результаты, полученные в последних трёх работах, показывают, что безынтеграционные способы репрограммирования в настоящее время являются наиболее безопасными и эффективными для дальнейшего клинического применения.

Наиболее часто различия в иммуногенности объясняют мутациями. Во-первых, это могут быть мутации, которые существовали в исходных соматических клетках. Так, фибробласты – один из наиболее часто используемый источник клеток для репрограммирования (Hanna *et al.*, 2010). Недавнее исследование с использованием мультиомиксных технологий показало, что мутации, приобретенные вследствие УФ-индуцированного мутагеза, присутствуют в ~ 50% ИПСК человека, репрограммированных из фибробластов кожи (D'Antonio *et al.*, 2018). Такие мутации характеризуются C-to-T или CC-to-TT замещениями и часто наблюдаются в меланоме (Martincorena *et al.*, 2015). В качестве альтернативы фибробластам очень часто выступают клетки периферической крови. Rouhani *et al.* (2022) показали, что ИПСК, полученные из клеток крови, значительно реже содержат мутации, чем ИПСК, полученные из фибробластов. В то же время есть данные о том, что мутации в клетках крови также накапливаются с возрастом (Genovese *et al.*, 2014). Так, работа с использованием 16 линий ИПСК, полученных из клеток крови доноров в возрасте 21–100 лет, продемонстрировала, что мутации в ИПСК линейно увеличиваются с возрастом (Lo Sardo *et al.*, 2017). Помимо этого, частота мутаций митохондриальной ДНК в ИПСК человека также увеличивается с возрастом донора, и это может привести к метаболическим дефектам в ИПСК (Kang *et al.*, 2016). И хотя *de novo* мутации в митохондриальной ДНК – в целом редкое явление для ИПСК (Wei *et al.*, 2021; Kosanke *et al.*, 2021), они могут приводить к образованию иммуногенных неоэпитопов и провоцировать иммунный ответ даже при аутологичной трансплантации, как было показано в одной из недавних работ (Deuse *et al.*, 2019). Таким образом, возраст донора прямо связан с повышенным риском аномалий в ИПСК. В связи с этим соматические клетки молодых доноров могут иметь сравнительное преимущество.

Также мутации в ИПСК могут возникать в процессе репрограммирования. Такие мутации обычно схожи с мутациями, вызванными окислительным стрессом (C-to-A замещения), и преимущественно обнаруживаются в конденсированных ламина-

ассоциированных хромосомных доменах, расположенных на периферии ядра (Yoshihara *et al.*, 2017). Более ранние работы свидетельствуют о том, что до 75% точечных мутаций в ИПСК возникают во время репрограммирования (Gore *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012). При этом наличие субклональных мутаций (содержащихся в разных изогенных клонах ИПСК), а также меньшая частота точечных мутаций в изогенных ЭСК также предположительно указывает на то, что такие мутации не были получены от исходных соматических клеток (Sugiura *et al.*, 2014). В то же время в более поздних работах было показано, что до 90% различных SNPs и инделов в ИПСК происходят от соматических клеток (Kwon *et al.*, 2017; D'Antonio *et al.*, 2018). Более того, Kosanke *et al.* (2021) показали, что только 2% мутаций в ИПСК не обнаруживались в исходных эндотелиальных клетках, использованных для репрограммирования.

Третья причина возникновения мутаций в ИПСК – длительное культивирование. Например, в одной линии ИПСК на поздних пассажах было обнаружено возникновение четырех дополнительных точечных мутаций (Gore *et al.*, 2011). Большинство точечных мутаций обнаруживают в репрессированных областях хроматина, в то время как субклональные мутации обычно встречаются в активных промоторах и могут изменять экспрессию генов – что также может влиять на иммуногенные детерминанты. Тем не менее, по последним данным, частота и спектр мутаций, возникающих в ИПСК в ходе культивирования, не отличается от мутаций, возникающих в ходе прегастрюляционной стадии эмбриогенеза (Hasaart *et al.*, 2022). Помимо мутаций, на поздних пассажах в ИПСК также выявляют анеуплоидии (Liu *et al.*, 2014) и CNVs (Laurent *et al.*, 2011).

Еще одной потенциальной причиной иммуногенности клеток, дифференцированных из ИПСК, может являться их незрелость. Несмотря на активное развитие протоколов дифференцировки, существует ряд типов клеток, которые в *in vitro* условиях могут быть дифференцированы только до незрелого фенотипа, в частности, кардиомиоциты, гепатоциты, β -клетки поджелудочной железы (Scheiner *et al.*, 2014). Основной риск незрелого фенотипа – экспрессия эмбриональных, или фетальных белков, которые также характерны для некоторых раковых опухолей (например, альфа-фета протеин) (Simpson *et al.*, 2005). Помимо этого, не до конца зрелые клетки могут обладать низким уровнем экспрессии молекул HLA-I класса, что делает их уязвимыми к действию НК-клеток.

Различные условия культивирования, а также выбор реактивов для дифференцировки также могут влиять на иммуногенность ИПСК и их производных. Так, применение ксеногенных материалов для культивирования ПСК потенциально может осложнить дальнейшее клиническое использование производных ПСК. Так, в одной работе было показано, что ЭСК и эмбрионидные тельца способны поглощать Neu5G (N-

гликолилнейраминовою кислоту) из фидерных слоев эмбриональных фибробластов, а также из питательных сред, содержащих сыворотку животных (Martin *et al.*, 2005). Это представляет большой риск, поскольку в крови человека циркулируют антитела к Neu5Gc (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). В настоящее время ПСК обычно культивируют в бесфидерных условиях, кроме того, были разработаны протоколы репрограммирования и дифференцировки без применения чужеродных компонентов (xeno-free), в которых снижен или полностью отсутствует Neu5G, однако эти методы признаны более дорогостоящими или могут быть технически сложными (Rodríguez-Pizà *et al.*, 2010; Swistowski *et al.*, 2010). С другой стороны, коммерческие xeno-free среды могут содержать повышенный уровень аскорбата, который может влиять на метилирование промотора CD30 – маркера злокачественных новообразований (Chung *et al.*, 2010). Это означает, что риск не ограничивается продуктами животного происхождения, и для новых составов сред в обязательном порядке должны быть определено их биологическое воздействие на культивируемые клетки.

Помимо мутаций, которые потенциально могут возникнуть в процессе репрограммирования и культивирования, также следует учитывать и эпигенетические изменения, которые могут регулировать экспрессию разных белков. Существует мнение, что некоторые клетки не до конца проходят процесс репрограммирования, и ИПСК в значительной мере способны сохранять транскрипционную и эпигенетическую память о своем происхождении (Chin *et al.*, 2009). Тем не менее работы в этой области достаточно противоречивы и, согласно современным представлениям, молекулярные и функциональные различия в разных линиях ИПСК теряются в процессе продолжительного пассирования (Poetsch *et al.*, 2022). Однако, теоретически, эпигенетические особенности могли бы объяснить аномальную экспрессию иммуногенных белков, которые экспрессируются при дифференцировке только в ИПСК, но не в ЭСК. Так, по крайней мере в двух работах было продемонстрировано, что феномен «соматической памяти» может влиять на дальнейшую иммуногенность полученных линий ИПСК (Wang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013). ИПСК, полученные из клеток Сертоли семенников мыши, являющихся анатомически иммунопривилегированной областью, с большей эффективностью формировали тератомы, чем ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов мыши (Wang *et al.*, 2014). Более того, дифференцированные производные сингенных ЭСК продемонстрировали сниженный потенциал к активации аллогенных Т-клеток *in vitro* по сравнению с ИПСК, полученных из эмбриональных фибробластов мыши. Однако стоит отметить, что на более поздних пассажах авторы не увидели отличий в иммуногенности ИПСК, полученных из разных соматических клеток, что потенциально еще раз

подтверждает, что некая «соматическая память» может присутствовать только на ранних пассажах. В другой работе было показано, что мезенхимальные клетки пуповины являются менее иммуногенным источником клеток для репрограммирования, чем фибробласты кожи (Liu *et al.*, 2013).

На степень иммунного ответа также может влиять интенсивность экспрессии молекул HLA I класса, а также костимуляторных молекул и молекул адгезии. Более того, каждый тип клеток обладает уникальным паттерном экспрессии наборов генов и белков, в связи с чем предполагается, что для различных производных ИПСК может быть характерна дифференциальная иммуногенность. Например, некоторые типы клеток, которые относятся к иммунопривилегированным тканям, могут обладать иммуномодулирующими функциями для подавления иммунного ответа. Было показано, что некоторые типы дифференцированных производных ПСК, в частности клетки ПЭС (Idelson *et al.*, 2018; Yamasaki *et al.*, 2021), ганглиозные клетки сетчатки (Edo *et al.*, 2020), нейрональные предшественники (Liu *et al.*, 2013; Itakura *et al.*, 2017; Ozaki *et al.*, 2017), клетки нервного гребня (Fujii *et al.*, 2019; Mehler *et al.*, 2020) и хондроциты (Kimura *et al.*, 2016) демонстрируют сниженную иммуногенность даже по отношению к аллогенным лимфоцитам. Так, в одной из работ авторы отмечали ингибирование синтеза IFN γ и пролиферации аллогенных Т-клеток при сокультивировании с клетками ПЭС, дифференцированными из ЭСК (Idelson *et al.*, 2018). Подобные свойства также демонстрировали и хондроциты, дифференцированные из ИПСК: они не вызывали активацию Т- и НК-клеток, а также подавляли пролиферацию Т-клеток, преактивированных интерлейкином-2 и фитогемагглютинином (Kimura *et al.*, 2016). В работе по изучению иммуногенности дифференцированных из ИПСК нейрональных предшественников обнаружено, что совпадение гаплотипа HLA не влияет на степень Т-клеточного ответа при сокультивировании как с аутологичными, так и с аллогенными Т-клетками (Ozaki *et al.*, 2017). Иммуносупрессирующие свойства проявляли также и клетки нервного гребня, дифференцированные из ИПСК (Fujii *et al.*, 2019; Mehler *et al.*, 2020). Стоит отметить, что вышеизложенные работы хоть и свидетельствуют о низкой иммуногенности дифференцированных производных, но по совокупности причин не гарантируют таких же результатов на других линиях ИПСК.

Таким образом, сразу несколько факторов может влиять на иммуногенность финального клеточного продукта. Перечисленные выше причины должны быть учтены для обеспечения безопасности клинического применения производных ПСК.

1.3. Гипоиммуногенные линии ПСК как решение проблемы иммунного отторжения

Несмотря на десятки клинических исследований производных ЭСК и ИПСК, а также общий прогресс в этой области за последние 20 лет, проблема гистосовместимости на сегодняшний день является основным препятствием для широкого внедрения производных стволовых клеток в клиническую практику. В свою очередь, модификация генома ПСК за счет удаления иммуногенных и добавления иммуномодулирующих элементов делает возможным создание «универсальных» линий ПСК, производные которых теоретически смогут подойти любому реципиенту (Рис. 6). Несмотря на сохраняющиеся проблемы, в том числе вопросы безопасности, разработка генетически модифицированных плюрипотентных стволовых клеток может способствовать крупномасштабному производству «готовых» (off-the-shelf) клеточных продуктов.

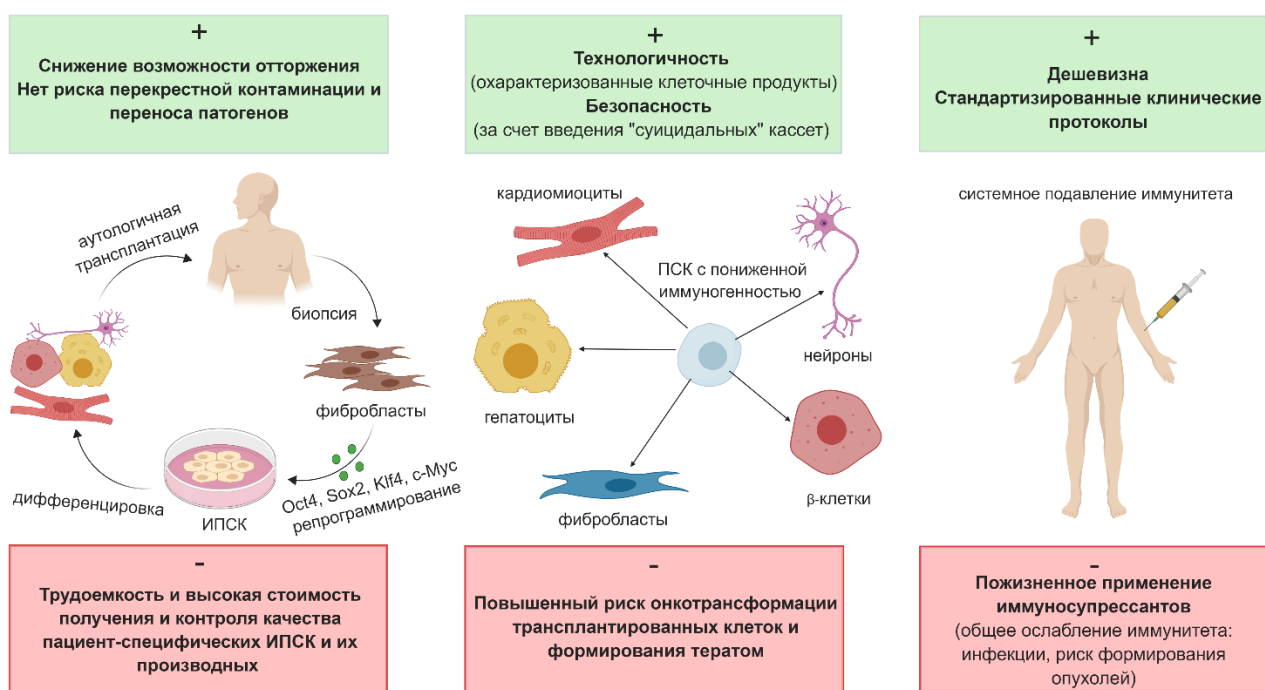


Рисунок 6. Преимущества и недостатки потенциального использования аутологических (слева), гипоиммуногенных (в центре) и аллогенных (справа) клеточных продуктов при трансплантации. Источник: Богомякова с соавт., 2019.

1.3.1. Механизмы избегания опухолями иммунного надзора

Для создания ИПСК с пониженной иммуногенностью может быть применён ряд иммуносупрессивных стратегий, которые используют раковые клетки для ускользания от иммунного надзора (Богомякова с соавт., 2019). «Чтобы “обмануть” иммунную систему, опухолевые клетки уменьшают экспрессию молекул, необходимых для представления антигена (HLA), коstimуляции (CD80 и CD86) и адгезии (CD54), тем самым предотвращая

их распознавание иммунными клетками, а также повышают экспрессию таких иммуносупрессирующих компонентов, как HLA-G, PD-L1 и CTLA-4 (de Charette & Houot, 2018). Эти механизмы играют большую роль в повышении активности регуляторных Т-клеток и последующей анергии цитотоксических Т- и НК-клеток.

CTLA-4 и PD-L1 – важнейшие иммунологические чекпойнты в поддержании периферической толерантности Т-клеток. Поэтому эти молекулы можно использовать для индукции иммунной толерантности к аллогенным трансплантатам (Rong *et al.*, 2014). CTLA-4 связывается с CD80 и CD86 на поверхности АПК, тем самым блокируя Т-клеточные костимуляторные пути, в то время как PD-L1 связывается с PD-1, который экспрессируется на активированных Т-клетках, для индукции ингибиторных сигнальных путей. Вместе они контролируют баланс костимуляторных и коингибиторных сигналов, что играет значительную роль в регуляции амплитуды и длительности Т-клеточного ответа. Экспрессия этих молекул повышена в клетках различных типов рака (Menter & Tzankov, 2018).

Далее мы более подробно рассмотрим основные стратегии, применяемые опухолевыми клетками для развития иммунотолерантности, которые можно использовать для решения проблемы гистосовместимости аллогенных дифференцированных производных плюрипотентных клеток.

HLA-I

Ускользание от иммунного надзора достаточно часто связано с потерей молекул HLA-I на поверхности опухолевых клеток. Молекулы HLA-I играют ключевую роль в представлении пептидов (включая опухолеассоциированные антигены) цитотоксическим Т-клеткам. Экспрессия этих антигенов и костимуляторных рецепторов, возможных сигналов процессов, происходящих в клетке, запускает иммунную активацию и способствует цитотоксическому разрушению опухолевых клеток (Stewart & Abrams, 2008)». «Поэтому часто дефекты в экспрессии HLA-I опухолевыми клетками ведут к гипоиммуногенности, последующей эвазии и прогрессии метастазирования. Потеря экспрессии HLA-ABC обнаружена при целом ряде онкологических заболеваний, включая плоскоклеточный рак головы и шеи (примерно 70% случаев), рак молочной железы (96%), рак толстой кишки (87%) и меланому (63%) (Angell *et al.*, 2014).

Белки HLA-I представляют собой гетеродимеры, состоящие из тяжелой α -цепи с высокой степенью полиморфизма и консервативной легкой цепи β -2-микроглобулина (B2M). B2M – небольшой белок с молекулярной массой около 12 кДа без трансмембранного домена, который входит в суперсемейство иммуноглобулинов. Связь B2M с α 3-доменом

тяжелой α -цепи HLA-I необходима для поддержания конформации гетеродимера и формирования функционального комплекса HLA-I на поверхности клетки, она также способствует усилению аффинности связывания пептидов (Li *et al.*, 2016).

Различные мутации, возникающие в гене *B2M*, могут препятствовать синтезу белка B2M и, соответственно, стабилизации функционально активной молекулы HLA-I. Такие мутации детектируются в различных клеточных линиях и опухолевых тканях, они могут быть представлены инсерциями и делециями нуклеотидов в мотивах с повторяющимися последовательностями, а также однобуквенными заменами в одном аллеле гена *B2M* в комбинации с потерей больших сегментов хромосомы 15q21, выключающей второй аллель гена *B2M* (Bernal *et al.*, 2012). Эти мутации ингибируют экспрессию *B2M*, препятствуя транскрипции или, что случается более часто, приводят к сбою трансляции мРНК или синтезу нефункционального белка. Возникновение необратимых функциональных дефектов в гене *B2M* способствует селекции и прогрессии агрессивных клонов опухолевых клеток за счет отсутствия экспрессии HLA-I.

Еще одним механизмом эвазии, например, в случае гематологических опухолей, могут быть изменения экспрессии HLA-II, в том числе, вызванные мутациями в гене *CIITA*, трансактиваторе HLA-II. Такие мутации обнаружены у пациентов с классической лимфомой Ходжкина (Steidl *et al.*, 2011)».

HLA-G – малоизученный член семейства HLA-I

«HLA-G вместе с HLA-E, -F и -H принадлежит к “неклассическим” молекулам HLA-Ib. Молекулы HLA-Ib в отличие от “классических” молекул HLA-Ia с высоким уровнем полиморфизма сравнительно консервативны и представлены ограниченным числом аллелей. HLA-G не только выполняет основную функцию молекул HLA-I – представляет пептидные фрагменты специфическим субпопуляциям CD8⁺ Т-лимфоцитов, но и обладает иммуномодулирующей функцией (Morandi *et al.*, 2016). В норме HLA-G не экспрессируется на поверхности здоровых клеток и детектируется только на клетках трофобласта, эпителиальных клетках тимуса, моноцитах, активированных цитокинами, зрелых миелоидных и плазмацитоидных ДК и на воспаленных мышечных волокнах (Rouas-Freiss *et al.*, 2014). Основная физиологическая роль этой молекулы – формирование иммунной толерантности в гематоплацентарном барьере. Различные формы HLA-G экспрессируются клетками трофобласта. Они могут взаимодействовать с рецепторами на поверхности иммунных клеток, уменьшая материнский иммунный ответ против полуаллогенных тканей плода путем снижения цитотоксичности Т- и NK-клеток, пролиферации Т- и В-клеток и индукции апоптоза активированных CD8⁺ Т-клеток (Le Bouteiller, 2015).

Молекулы HLA-G представлены не только на поверхности клетки, существуют также их растворимые изоформы. Известно семь изоформ HLA-G, которые образуются в процессе альтернативного сплайсинга одной мРНК – мембраносвязанные mHLA-G1, -G2, -G3, -G4 и растворимые изоформы sHLA-G5, -G6 и -G7 (González *et al.*, 2012). Существует также растворимый sHLA-G1, идентичный sHLA-G5, который образуется путем вырезания трансмембранного домена металлопротеиназами (Pistoia *et al.*, 2007). Только HLA-G1 и -G5 могут представлять функциональную тяжелую α -цепь, ассоциированную с молекулой B2M и способную связывать малые пептиды.

Иммуномодулирующие свойства HLA-G опосредуются взаимодействием с иммуноглобулин-подобным транскриптом ILT2 (immunoglobulin-like transcript 2) на поверхности Т- и В-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов, ДК и NK-клеток, а также с ILT4, который экспрессируется только на миелоидных клетках – ДК, моноцитах/макрофагах и нейтрофилах (Morandi *et al.*, 2016). Кроме того, HLA-G взаимодействует с KIR2DL4 на поверхности NK-клеток (Le Page *et al.*, 2014) и CD160, который экспрессируется Т-лимфоцитами, NK-клетками и эндотелиальными клетками (Fons *et al.*, 2006). В покоящихся клетках эти рецепторы экспрессируются на низком уровне, но на активированных клетках в патологических состояниях, например при вирусной инфекции, экспрессия возрастает (Nakajima *et al.*, 2003). Взаимодействуя с этими рецепторами, HLA-G воздействует на функции различных клеточных популяций: препятствует активации эффекторных клеток, секреции цитокинов В-клетками, способствует апоптозу, ингибирует хемотаксис, уменьшая экспрессию некоторых поверхностных рецепторов хемокинов (Morandi *et al.*, 2016), а также уменьшает ангиогенез (Fons *et al.*, 2006).

Повышенная экспрессия мембраносвязанного HLA-G и растворимого sHLA-G, обнаруженная в различных солидных и гематологических опухолях, коррелирует с повышенным риском прогрессии опухолей и метастазов и с общим плохим прогнозом (Menter & Tzankov, 2018)».

Лиганды NKG2D

«NKG2D (NK group 2 member D) – основной активирующий рецептор, который экспрессируется на поверхности NK-клеток. Он присутствует на поверхности цитотоксических, CD4⁺ и $\gamma\delta$ Т-клеток (Ogasawara & Lanier, 2005). Поэтому рецептор NKG2D не только индуцирует цитотоксичность эффекторных клеток (Wu *et al.*, 1999), но способствует продукции цитокинов и влияет на дифференцировку и пролиферацию Т-клеток (Verneris *et al.*, 2004). Лигандами данного рецептора служат MICA, MICB (MIC – MHC class I-related chain) и семейство ULBP (*UL-16 binding proteins*), которые, в отличие

от HLA-I, не связаны с В2М. Экспрессия этих так называемых “стресс-индуцированных” лигандов способствует иммунному надзору трансформированных, инфицированных или подвергшихся стрессу клеток. При увеличении экспрессии соответствующих лигандов NKG2D распознает повреждение ДНК, высокий уровень активных форм кислорода, повышенный уровень пролиферации и тепловой шок. Кроме того, пара лиганд-рецептор является одним из известных иммунологических чекпойнтов. Иммунные клетки, экспрессирующие NKG2D, атакуют трансформированные клетки до начала процесса изменения иммунологического фенотипа опухолевых клеток, служащего предпосылкой к иммунному ускользанию. Несмотря на это, ряд данных свидетельствует о противоречивой роли лигандов NKG2D в регуляции развития опухоли (Zhang *et al.*, 2015).

Раковые клетки способны управлять экспрессией лигандов NKG2D на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях. Регуляция экспрессии лигандов NKG2D недостаточно изучена. Однако недавно выявили множественные механизмы, которые раковые клетки используют для уменьшения индуцируемых стрессом лигандов, избегая таким образом иммунного распознавания (Schmiedel & Mandelboim, 2018). Чаще всего встречается шеддинг, или слущивание молекул с поверхности клеточной мембраны. Металлопротеазы, в частности ADAM10, ADAM17 и MMP14, часто детектируемые в микроокружении опухоли, разрезают трансмембранный домен, убирая белки MICA, MICB и ULBP1-6 с поверхности злокачественных клеток (Salih *et al.*, 2002; Waldhauer & Steinle, 2006; Salih *et al.*, 2006). Кроме того, GPI-заякоренные лиганды (гликозилфосфатидилинозит – GPI-якорь), такие как ULBP1, ULBP3 и MICA*008, очень часто высвобождаются в экзосомальных везикулах (Fernandez-Messina *et al.*, 2010; Ashiru *et al.*, 2010), как и опухолеассоциированные антигены, молекулы HLA-I/II, лиганды “рецепторов смерти” и молекулы адгезии (Whiteside, 2013). Растворимые и экзосомальные рецепторы связываются с соответствующими сайтами на NK- и Т-клетках с последующей интернализацией и деградацией (Groh *et al.*, 2002). В то время как различные сигналы клеточного стресса могут распознаваться функциональным рецептором, “слущивания” лиганда одного типа достаточно, чтобы сделать иммунные клетки “слепыми” по отношению ко всему семейству лигандов (Schmiedel & Mandelboim, 2018).

Уровень растворимых стресс-индуцированных лигандов в сыворотке онкологических больных считается значимым прогностическим фактором. Выявлена обратная корреляция между уровнем этих лигандов и активностью NK- и Т-клеток, корреляция со стадией рака, а также негативное влияние на выживание пациента (Schmiedel & Mandelboim, 2018)».

«CD47, или ассоциированный с интегрином белок (IAP) – трансмембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов. CD47, широко представленный в различных тканях взрослого организма, обладает множеством функций – регулирует целый ряд процессов, включая апоптоз, пролиферацию, адгезию, миграцию, иммунные и ангиогенные реакции. Экспрессия CD47 существенно повышена в опухолевых клетках (Sick *et al.*, 2012; Chao *et al.*, 2012).

С помощью блокирующих антител показано, что выключение CD47 подавляет миграцию и метастазирование клеток меланомы, рака предстательной железы и яичника (Shahan *et al.*, 2000). У мышей с дефицитом CD47, используемых в качестве моделей множественной миеломы, число метастазов в кость было меньше, чем в контроле (Uluçkan *et al.*, 2009). Аналогичные результаты получены в экспериментах на мышах с ксенографтом клеток неходжкинской лимфомы человека – блокирование функции CD47 с помощью антител приводило к резкому снижению числа метастазов (Chao *et al.*, 2011).

В 2012 году были опубликованы результаты, согласно которым CD47 препятствует фагоцитозу раковых клеток. Блокирование взаимодействий CD47 с его рецептором SIRP α (от *Signal regulatory proteins*) антителами к CD47 позволило замедлить прогрессию лейкосаркомы у мышей (Edris *et al.*, 2012; Willingham *et al.*, 2012). Более того, оказалось, что фагоцитоз раковых клеток макрофагами, опосредованный блокирующими анти-CD47-антителами, может инициировать противоопухолевый иммунный ответ Т-клеток, в том числе при опухолях, которые ранее не поддавались иммунотерапии (Tseng *et al.*, 2013; Unanue, 2013; Matlung *et al.*, 2017). Кроме того, связывание CD47 с SIRP α блокирует созревание незрелых ДК и ингибирует синтез цитокинов зрелыми ДК, снижая их функции по представлению антигенов. Взаимодействие между CD47 на клетках эндотелия и SIRP на лейкоцитах регулирует трансэндотелиальную миграцию Т-клеток. У мышей с нокаутом CD47 снижена доля Т-лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов в зонах воспаления (Azcutia *et al.*, 2012). CD47 может также уменьшать цитотоксичность НК-клеток в культурах опухолевых клеток *in vitro* (Kim *et al.*, 2008).

Важная роль CD47 в регуляции фагоцитоза показана не только при опухолевых заболеваниях, но и в норме, в частности, взаимодействие CD47 с растворимым тромбоспондином 1 (THBS1) и SIRP α на поверхности макрофагов негативно регулирует фагоцитоз нормальных эритроцитов (Soto-Pantoja *et al.*, 2014).

Таким образом, высокий уровень CD47 позволяет раковым клеткам избегать фагоцитоза макрофагами при взаимодействии с SIRP α , и подавляет распознавание цитотоксическими Т-лимфоцитами и, возможно, НК-клетками. В настоящее время CD47

рассматривается в качестве еще одной мишени для создания гипоиммуногенных линий ИПСК (Deuse *et al.*, 2019)».

Обобщенные стратегии индукции иммунологической толерантности, используемые опухолевыми или нормальными клетками представлены на рисунке 7.

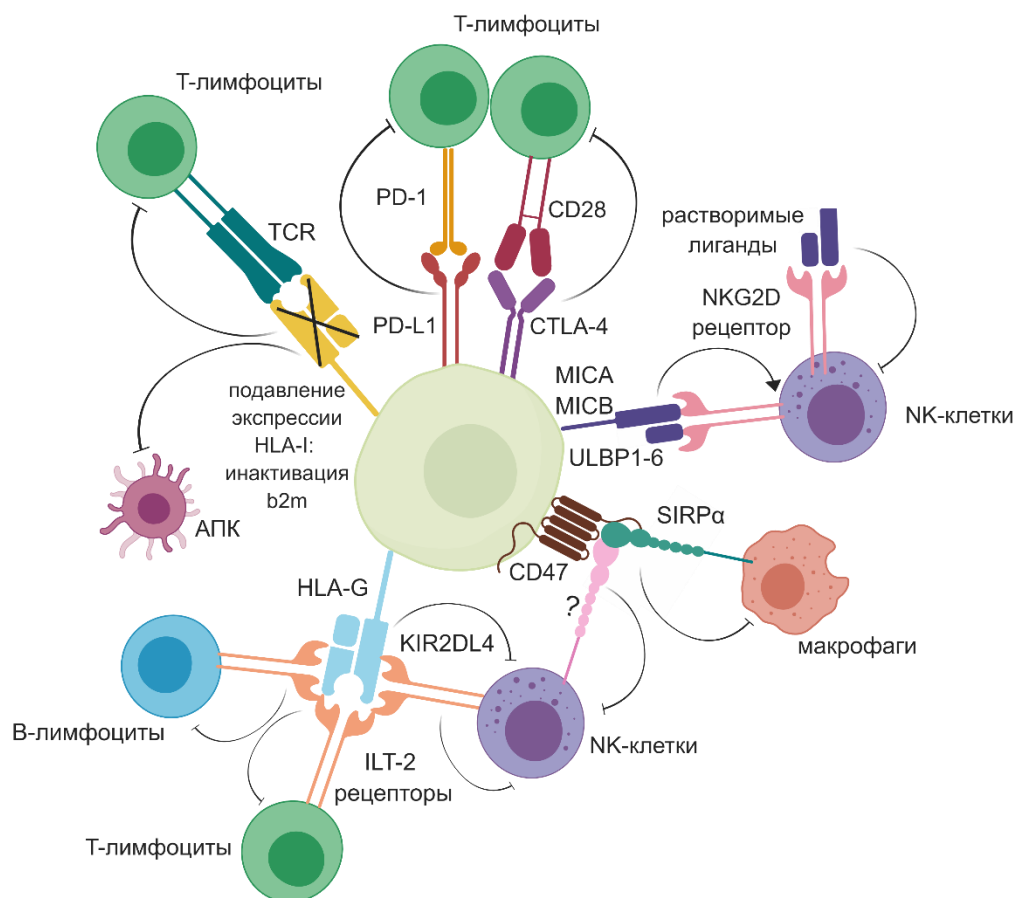


Рисунок 7. Обобщенные стратегии индукции иммунологической толерантности, используемые опухолевыми или нормальными клетками. Источник: Богомякова с соавт., 2019.

1.3.2. Редактирование генов HLA подавляет ответ аллогенных T-лимфоцитов

Для создания гипоиммуногенных клеток наиболее часто применяется стратегия полного «выключения» экспрессии молекул HLA. Клетки, лишённые молекул HLA, должны стать полностью невидимыми для T-клеток реципиента (как CD8⁺, так и CD4⁺). С другой стороны, молекулы HLA I класса являются «молекулярным паролем» для NK-клеток, важнейшей функцией которых является распознавание и элиминация клеток, лишённых молекул HLA-I. Поэтому получение линий ПСК с пониженной иммуногенностью обычно состоит из двух шагов: сначала должна быть подавлена экспрессия HLA, а затем добавлены дополнительных факторы, которые позволяют избежать NK-клеточного ответа.

Поскольку локус HLA-I/II очень протяженный и сложно устроенный, его трудно удалить с помощью прямого редактирования генов. Поэтому редактирование отдельных генов HLA I класса встречается значительно реже (Torikai *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2019). Методологически проще нокаутить гены, необходимые для экспрессии молекул HLA. Для подавления экспрессии HLA I класса обычно нокаутят ген *B2M*, кодирующий легкую субъединицу, необходимую для стабильного формирования гетеродимера (Zheng *et al.*, 2016). Также возможна инактивация генов *TAP1* (transporter associated with antigen presentation 1) и *TAPBP* (TAP-associated glycoprotein), которые участвуют в регуляции экспрессии HLA-I (Cui *et al.*, 2016). Для подавления экспрессии HLA II класса нокаутят ген *CIITA* – транскрипционный фактор, необходимый для экспрессии HLA-II (Chen *et al.*, 2015).

В последние годы вышел целый ряд работ, в которых был осуществлен нокаут гена *B2M*. Для этого были использованы разные методы геномного редактирования, включая аденоассоциированные векторы (Riolobos *et al.*, 2013), гомологичную рекомбинацию (Wang *et al.*, 2015), нуклеазу TALEN (Lu *et al.*, 2013). В более поздних работах чаще всего применяют CRISPR/Cas9 (Bogomiakova *et al.*, 2018; Matapally *et al.*, 2018) систему ввиду ряда преимуществ, в первую очередь высокой эффективности данного типа геномного редактирования. Кроме того, в некоторых работах также описан двойной нокаут гена *B2M* и гена *CIITA* (Matapally *et al.*, 2019; Deuse *et al.*, 2019; Petrus-Reurer *et al.*, 2020). Поскольку молекулы HLA II класса экспрессируются ограниченным типом клеток, в основном АПК, инактивация *CIITA* необходима, в первую очередь, для трансплантации васкуляризованных органов (Koga *et al.*, 2020).

Стоит сказать, что в первых работах, посвященных созданию гипои иммуногенных ПСК, авторы исследовали иммуногенность недифференцированных клеток (Deuse *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015) или спонтанно дифференцированных клеток (Wang *et al.*, 2015), включая эмбрионидные тельца (Riolobos *et al.*, 2013), что не представляет особого интереса с точки зрения применения в клинической практике. Позже была проанализирована аллореактивность Т-клеток и НК-клеток при их сокультивировании с различными терминально дифференцированными производными: кардиомиоцитами (Matapally *et al.*, 2018; Deuse *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2020), эндотелиальными клетками (Deuse *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022), гладкомышечными клетками (ГМК) (Han *et al.*, 2019), клетками ПЭС (Petrus-Reurer *et al.*, 2020), тромбоцитами (Suzuki *et al.*, 2020), Т-клетками (Wang *et al.*, 2021). Все типы дифференцированных производных ПСК с отсутствием экспрессии HLA-I (а для ряда работ и HLA-II) демонстрировали

резистентность к действию аллогенных Т-лимфоцитов по сравнению с изогенными контролями дикого типа (Lanza *et al.*, 2019).

В большинстве исследований элиминация молекул HLA I класса приводила к тому, что производные ПСК становились чувствительными к цитотоксическим свойствам НК-клеток (Wang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Тем не менее, если рассматривать некоторые работы более детально, НК-клеточный ответ против производных ПСК окажется не столько однозначным. Так, в некоторых работах наблюдался минимальный уровень дегрануляции как на производные дикого типа, так и на клетки с нокаутом гена *B2M*, что практически соответствовало базальному уровню дегрануляции наивных НК-клеток (Deuse *et al.*, 2011; Riobos *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2020). Было показано, что тромбоциты, дифференцированные из ИПСК, не экспрессировали целый ряд молекул (MICA, MICB, ULBP1-6, CD112, CD155 и B7H6), которые являются лигандами активирующих рецепторов НК-клеток. Поэтому подобный феномен скорее всего связан с крайне низкой экспрессией лигандов активирующих рецепторов НК-клеток, что приводит к превалированию ингибирующих сигналов в эффекторных клетках. С другой стороны, в некоторых работах не отмечалось существенной разницы в ответе НК-клеток на нокаутные производные ПСК и производные ПСК дикого типа. Так, различия в цитотоксичности и количестве CD107a⁺ НК-клеток были статистически незначимыми при сокультивировании с ГМК дикого типа и ГМК, не экспрессирующими HLA I класса (Han *et al.*, 2019). В свою очередь, клетки ПЭС дикого типа провоцировали крайне высокую НК-клеточную цитотоксичность, которая была сравнима с нокаутными производными ПСК (Petrus-Reurer *et al.*, 2020). При этом процент дегранулировавших НК-клеток также не различался между исходными и нокаутными клетками ПЭС, хотя и сильно варьировал в зависимости от донора. Высокая цитотоксичность НК-клеток наблюдалась и для кардиомиоцитов, дифференцированных из ЭСК (Shi *et al.*, 2020). Эндотелиальные клетки вызвали одинаковый уровень дегрануляции НК-клеток вне зависимости от экспрессии HLA I класса, хотя цитотоксичность НК-клеток была выше против производных ИПСК с нокаутом гена *B2M* (Song *et al.*, 2022).

Есть три возможные причины данного феномена. Во-первых, каждый тип клеток может обладать уникальным паттерном экспрессии ингибирующих и активирующих лигандов НК-клеток, что должно определять функциональное поведение эффекторных клеток. Во-вторых, нельзя исключать физиологические особенности доноров, принимавших участие в исследованиях, особенно учитывая высокую вариабельность показателей дегрануляции, которые наблюдали Petrus-Reurer *et al.* (2020). Возможно также несовпадение по гаплотипам групп аллелей HLA-C1 и HLA-C2, так как не во всех работах

было проведено типирование доноров крови, участвующих в исследованиях. В-третьих, не исключены и методологические ошибки. На данный момент не существует стандартизированного теста, который точно сможет определить показатели НК-клеточного ответа. Так, наиболее часто используемым тестом является тест на дегрануляцию или цитотоксичность. Теоретически, на полученный результат может влиять и протокол преактивации НК-клеток, и время сокультивирования с клетками-мишенями, и другие детали. Так, например, в работе Shi et al. (2020) вместо донорских НК-клеток использовали линию эффекторных клеток NK92. В любом случае, сравнительно высокий уровень НК-клеточного ответа детектировали только при сокультивировании с клетками ПЭС, в то время как другие типы дифференцированных производных ПСК вызвали умеренную цитотоксичность вне зависимости от экспрессии HLA I класса.

1.3.3. Стратегии «иммунной маскировки» для ингибирования НК-клеток

Несмотря на то, что элиминация HLA-I не всегда ведет к активации НК-клеток, вторая стадия в создании гипоиммуногенных ИПСК предполагает ингибирование этого типа иммунных клеток. Классическая гипотеза распознавания «отсутствия своего» предполагает, что НК-клетки распознают и уничтожают все клетки, в которых отсутствуют молекулы HLA I класса (Ljunggren & Kaare, 1990). Современный взгляд на эту теорию является более сложным и включает взаимодействие между множеством активирующих и ингибирующих рецепторов НК-клеток (Lanier, 2005). Взаимодействие как активирующих, так и ингибирующих сигналов, поступающих от соответствующих рецепторов, регулируют активность НК-клеток, а «перевес» в ту или иную сторону приводит к изменению функционального поведения НК-клеток. Следовательно, можно манипулировать реакцией НК-клеток, смещая баланс в сторону их ингибирования, что успешно используется для получения гипоиммуногенных ИПСК.

Поскольку HLA-E – основной лиганд ингибирующего рецептора НК-клеток CD94/NKG2A (Lee et al., 1998), усиленная экспрессия одноцепочечного HLA-E может подавлять NKG2A⁺ НК-клетки. Действительно, вставка *HLA-E* в локус гена *B2M* обеспечивала резистентность к НК-клеточному лизису *in vitro* (Gornalusse et al., 2017). Аналогично, трансдукция одноцепочечного *HLA-E* в нокаутные ИПСК снижала дегрануляцию NKG2A⁺ НК-клеток (Wang et al., 2021). В свою очередь для супрессии KIR2D⁺ НК-клеток может быть использована эктопическая экспрессия другой неклассической молекулы HLA I класса – HLA-G. Подавление активности НК-клеток при сокультивировании с производными ИПСК было показано как для мембранной изоформы HLA-G (Zhao et al., 2014; Han et al., 2019), так и для секретлируемой изоформы HLA-G5 (Shi

et al., 2020). Однако ввиду гетерогенности субпопуляций NK-клеток, которые обладают различными типами ингибирующих рецепторов (рецепторы семейства KIR и NKG2A), остается открытым вопрос, могут ли все субпопуляции NK-клеток быть адекватно подавлены.

CD47 также используется в качестве иммуносупрессирующего фактора для NK-клеток (Han *et al.*, 2019; Deuse *et al.*, 2019). При этом в первой работе иммуномодулирующий эффект CD47 был исследован вместе с HLA-G и PD-L1 (Han *et al.*, 2019), а сравнительных данных по отдельным молекулам представлено не было. Возможно, что именно HLA-G в этой работе оказывал более существенный эффект на NK-клетки. Во второй работе CD47 использовался для подавления иммунного ответа не только NK-клеток, но и других клеток врожденного иммунитета, в том числе макрофагов (Deuse *et al.*, 2019). Однако, стоит отметить, что механизм, по которому происходит ингибирование NK-клеток при взаимодействии с CD47 еще не до конца изучен. Основных рецепторов CD47 – молекул SIRP α и CD61 на NK-клетках обнаружено не было.

Совсем недавно была предложена новая стратегия для подавления активности NK-клеток (Wang *et al.*, 2021). Если в ранее рассмотренных работах использовали иммуномодулирующие молекулы, которые взаимодействовали с ингибирующими рецепторами NK-клеток, то Wang с соавторами пошли другим путем и исследовали возможность уменьшить количество сигналов, идущих от активирующих рецепторов. Для этого они нокаутировали ген *PVR*, кодирующий CD155, который является лигандом активирующего рецептора NK-клеток DNAM-1. Инактивация *PVR* уменьшала уровень дегрануляции NK-клеток по сравнению с исходными клетками.

Таким образом, в настоящее время одной из основных проблем, связанных с созданием линий ИПСК с пониженной иммуногенностью, является эффективная превентивная защита от действия NK-клеток. Как уже было подробно рассмотрено ранее, «ослепить» NK-клетки можно либо путем ингибирования активирующих рецепторов, либо, наоборот, путем активации ингибирующих рецепторов. Однако не существует универсальных NK-клеточных рецепторов, которые экспрессируются на поверхности всех NK-клеток, поэтому есть предположения, что для полной инактивации NK-клеточного ответа потребуется ингибировать сразу несколько рецепторов (Koga *et al.*, 2020). Это предположение подтверждается экспериментальными данными: одновременное введение ингибирующего трансгена *HLA-E* и нокаут гена *PVR*, кодирующего активирующий лиганд, снижали уровень NK-клеточного ответа до значений, характерных для клеток дикого типа (Wang *et al.*, 2021). Также еще предстоит сравнить и выявить, какой из «универсальных» кандидатов сможет лучше и эффективнее остальных противостоять атакам со стороны NK-

клеток. Возможно, оптимальная комбинация иммуномодулирующих молекул может также зависеть от типа дифференцированных производных ПСК (Koga *et al.*, 2020).

1.3.4. Псевдогомозиготные и полу-универсальные линии ПСК

Полное выключение экспрессии HLA I класса – не единственная стратегия для создания «универсальных» линий ИПСК. Так, например, с помощью методов геномного редактирования можно инактивировать один из двух аллелей генов HLA I класса и получить гемизиготные линии ИПСК (Xu *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021). Тем не менее, применение подобного подхода мало реалистично для клинического применения. Как и в случае банкирования HLA-гомозиготных линий ИПСК, он также требует создания сотен линий.

Помимо гемизиготных ПСК с помощью подобного подхода можно получить полу-универсальные ПСК путем избирательного нокаута отдельных генов HLA I класса. Так, в работе Xu *et al.* (2020) были получены ИПСК-HLA-C⁺, в которых был сохранен только один аллель HLA-C, при этом оба аллеля генов HLA-A и HLA-B, а также второй аллель HLA-C были нокаутированы. CD43⁺ клетки крови, дифференцированные из ИПСК-HLA-C⁺, оказались устойчивыми к цитотоксической активности Т-клеток доноров, которые имели тот же аллель HLA-C. Более того, модифицированные производные ИПСК также подавляли активность NK-клеток. Результаты этой работы были подтверждены на модели иммунодефицитных мышей NRG (у которых отсутствуют собственные Т-, В- и NK-клетки). При введении в таких мышей NK-клеток человека выживаемость ИПСК-HLA-C⁺ была существенно выше по сравнению с ИПСК с нокаутом гена *B2M*. Интересно отметить, что в этом исследовании было показано, что HLA-C более эффективен для подавления NK-клеточного ответа, чем HLA-E. В другом исследовании был применен похожий подход, и была получена линия ИПСК с нокаутом гена *B2M* и эктопической экспрессией HLA-A11, который является наиболее часто встречающимся аллелем в южном Китае (Song *et al.*, 2022).

Аллельное разнообразие гена *HLA-C* гораздо меньше, чем *HLA-A* и *HLA-B*, поэтому такой подход потребует создания меньшего количества линий. Согласно оценкам всего 12 линий с наиболее распространенными аллелями HLA-C смогут подойти 90% гетерогенной популяции, состоящей из европейцев, афроамериканцев, азиатов и латиноамериканцев (Koga *et al.*, 2020). Поэтому HLA-C⁺ полу-универсальные ИПСК, лишённые молекул HLA-A, HLA-B и HLA II класса, могут также рассматриваться в качестве источника клеток для применения в клинической практике.

1.3.5. Вопросы безопасности «универсальных» ПСК

Попытки уменьшить отторжение аллогенных дифференцированных производных ПСК могут привести к созданию клеток, которые смогут полностью «ослепить» иммунную систему реципиента (Gonzales *et al.*, 2020). В таком случае иммунная эвазия может увеличить риски онкогенной трансформации клеток в трансплантате и возникновения опухолей. Само по себе отсутствие молекул МНС/HLA не будет способствовать онкогенезу (Zimmer *et al.*, 2005), однако подобную злокачественную трансформацию в HLA-негативных клетках будет труднее устранить с помощью обычных иммунных механизмов. При этом также существует вероятность формирования агрессивных трансмиссивных опухолей, которые встречаются в природе у тасманийских дьяволов и собак. В связи с этим перед трансплантацией необходимо тщательно исследовать универсальные линии на наличие потенциальных онкогенных мутаций (Lanza *et al.*, 2019).

Другая проблема гипоиммуногенных клеток связана с ролью молекул HLA в эффективной защите от вирусов (Matheus *et al.*, 2022). Ткани, лишенные экспрессии молекул HLA, не смогут презентировать Т-клеткам вирусные и другие патогенные антигены в случае возникновения инфекции, в связи с чем гипоиммуногенные клетки могут стать причиной серьезной инфекции пересаженной ткани или органа, и, возможно, окружающих тканей. Несмотря на то, что HLA-независимые механизмы все равно ограничивают развитие многих инфекций, что подтверждается у пациентов с синдромом «голых» лимфоцитов (с генетическими дефектами молекул HLA-I/II) (Hanna & Etzioni, 2014), модифицированные стратегии, которые поддерживают частичную презентацию антигена, например, за счет экспрессии отдельных генов HLA, например HLA-C (Xu *et al.*, 2019), HLA-A (Song *et al.*, 2022) или HLA-E (Gornalusse *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021) могут быть в целом более безопасными.

Возможным методом устранения рисков, связанных с трансплантацией «универсальных» клеток, является введение «суицидальных кассет», которые могут быть активированы в случае злокачественной трансформации или вирусного инфицирования трансплантата (Li & Xiang, 2013). Так, селективное удаление недифференцированных или остаточных ПСК в клеточном продукте может быть достигнуто за счет введения тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-ТК) под промотор гена Oct4 (*POU5F1*) и обработки ганцикловиром (Nara *et al.*, 2008). Аналогичным образом могут быть удалены и активно делящиеся клетки, если ввести HSV-ТК под промотор гена *CDK1*, который играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла (Harding *et al.*, 2019). Другой суицидальной системой может стать индуцируемая каспаза-9 (iCas9). Введение iCas9 под промотор

miR302/367 обеспечило селективное удаление недифференцированных ПСК (Ando *et al.*, 2015; Villanueva *et al.*, 2019).

Таким образом, на сегодняшний день прогресс в понимании механизмов иммуногенности и иммунотолерантности позволяет создавать гипоиммуногенные ПСК, которые потенциально могут стать источником клеток для универсальной заместительной клеточной терапии. Несмотря на то, что стратегии, рассмотренные в данной работе, имеют большие перспективы, до применения в клинике таких “универсальных” линий еще предстоит многочисленное исследование их биобезопасности и эффективности на животных, в том числе животных с гуманизированной иммунной системой.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культивирование ИПСК в бесфидерных условиях

ИПСК культивировали в чашках Петри в среде Essential 8™ Medium (Gibco, США) при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. В качестве подложки для культивирования использовали Matrigel (BD Bioscience, США). Смену среды производили каждый день. Перед пересевом клетки промывали раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия). Клетки пассировали с использованием 0,05% раствора трипсина-ЭДТА (Gibco, США), который после 5 минутной инкубации при комнатной температуре инактивировали равным объемом среды для инактивации следующего состава: DMEM (ПанЭко, Россия) + 10% FBS (Gibco, США). Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 250 g (Eppendorf Centrifuge 5804R, США), отбирали супернатант, ресуспендировали клетки в среде Essential 8™ с добавлением 5 мкМ ингибитора ROCK - Y-27632 (Miltenyi Biotec, Германия) и рассевали на чашки Петри или культуральные планшеты, покрытые матригелем.

2.2. Обработка матригелем чашек Петри

В качестве подложки для культивирования ИПСК использовали Matrigel®. Приготовление покрытой матригелем культуральной посуды производили в соответствии с инструкциями производителя. Matrigel® разводили в 10 раз средой DMEM и хранили на -20°C в пробирках типа «эппендорф» по 0,5 и 1 мл. По мере необходимости аликвоту быстро размораживали в охлажденной среде DMEM и разводили еще в 10 раз (конечное разведение 1:100), затем равномерно покрывали чашки и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Покрытые матригелем чашки хранили в течение двух недель при 4-8°C.

2.3. Криоконсервация клеточных культур

Клетки снимали с подложки с использованием 0,05% раствора трипсина для ИПСК и 0,25% раствора трипсина для других клеточных культур, который инактивировали равным объемом среды для инактивации. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 250 g, отбирали супернатант, ресуспендировали клетки в 0,5 мл охлажденной FBS, переносили в пробирку для замораживания и аккуратно, по каплям, добавляли 0,5 мл среды, содержащей 80% FBS и 20% DMSO (ПанЭко, Россия). При криоконсервации ИПСК в среду для замораживания добавляли Y-27632 в концентрации 5 мкМ. Пробирку для замораживания немедленно помещали в низкотемпературный морозильник на -70°C. На следующий день переносили в жидкий азот для длительного хранения.

2.4. Размораживание культур эукариотических клеток

В предварительно нагретой до 37°C среде DMEM ресуспендировали клетки, переносили их в пробирки объемом 15 мл и доводили до объема 10 мл. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 250 g, отбирали супернатант, ресуспендировали клетки в необходимой среде и рассевали на чашки Петри.

2.5. Плазмидный вектор

В работе использовали вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP-b2m, созданный на основе плазмидного вектора PX458 (Ran *et al.*, 2013; <https://www.addgene.org/48138>), который содержит гены *Cas9*, *GFP*, и в который была клонирована последовательность направляющей РНК GAGTAGCGCGAGCACAGCTA для внесения специфического двуцепочечного разрыва в гене *B2M*. Подробная карта вектора приведена на рисунке 8. Направляющая РНК была подобрана ранее в лаборатории генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России с помощью онлайн-ресурса CRISPOR (Concordet & Haeussler, 2018).

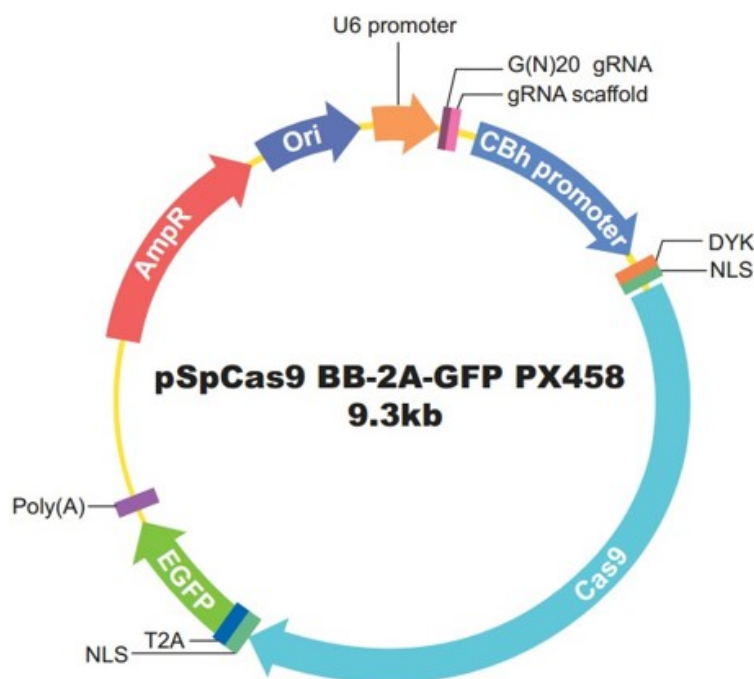


Рисунок 8. Карта плазмидного вектора, разработанного на основе плазмиды PX458 (Ran *et al.*, 2013), которая была использована для получения клонов ИПСК, нокаутных по гену *B2M*.

2.6. Трансфекция ИПСК

За два дня до трансфекции ИПСК в количестве 500 тысяч клеток рассаживали в лунки 6-луночного планшета, предварительно покрытого матригелем. Для максимальной эффективности конфлюентность в день трансфекции не должна была превышать 60–70%.

Непосредственно перед трансфекцией производили смену среды Essential 8™. В данной работе в качестве основного использовали реагент Lipofectamine Stem Transfection Reagent (Invitrogen, США). Липосомные комплексы готовили согласно рекомендациям производителя: в 1,5 мл пробирке растворяли 1,25 мкг ДНК в 125 мкл бессывороточной среды OPTI-MEM (Gibco, США); в другой 1,5 мл пробирке параллельно растворяли 5 мкл реагента Lipofectamine Stem Transfection Reagent в 125 мкл среды Opti-MEM. Полученные растворы смешивали друг с другом и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Образовавшиеся ДНК-липидные комплексы по каплям добавляли в соответствующие лунки. Заменяли среду на следующий день.

2.7. Сортировка ИПСК после трансфекции

Максимум GFP-положительных клеток наблюдали в течение 36–48 часов после трансфекции. Для увеличения выживаемости ИПСК за 2 часа до сортировки в среду добавляли Y-27632 в концентрации 5 мкМ. Далее клетки снимали при помощи 0,05% раствора трипсина, как было описано выше, и ресуспендировали в 500 мкл раствора dPBS (ПанЭко, Россия) с добавлением 5 мкМ Y-27632. Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences, США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дэбриса и дуплетов. В качестве негативного контроля (контроля аутофлуоресценции) использовали нетрансфицированные клетки. Отсортированные GFP-положительные клетки рассеивали на 35 мм чашки Петри, покрытые матригелем, в количестве не более чем 20–30 тысяч клеток. Для повышения выживаемости единичных ИПСК концентрацию Y-27632 увеличивали до 10 мкМ. На следующий день после сортировки заменяли ростовую среду и добавляли реагент CloneR™ (Stem Cell Technologies, Канада) в концентрации, рекомендованной производителем. Начиная с третьего дня после сортировки сменяли среду клеткам ежедневно.

2.8. Отбор клонов

По мере роста (приблизительно 7 дней после сортировки), переходили к механическому отбору индивидуальных колоний. Клетки инкубировали в растворе диспазы с концентрацией 0,1 мг/мл (Invitrogen, США) при комнатной температуре в течение 6–8 мин, отбирали его и промывали минимум 5 раз большим объемом среды DMEM. Колонии отбирали механически с помощью стерильных наконечников для пипеток, переносили каждый клон в лунку 48-луночного планшета и культивировали

отдельно в бесфидерных условиях. По мере роста (приблизительно 7 дней после отбора клонов), переходили к первичному скринингу потенциальных нокаутных клонов ИПСК.

2.9. Первичный скрининг потенциальных нокаутных клонов

При достижении конфлюентности 60–70% клетки снимали с подложки, как было описано ранее, и приблизительно $\frac{3}{4}$ клеточной суспензии отбирали для скрининга, а $\frac{1}{4}$ суспензии переносили в лунку 24-луночного планшета для дальнейшего культивирования. Отобранные клетки промывали раствором PBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Далее клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл буфера для проточной цитометрии: PBS без Ca^{2+} Mg^{2+} , 2% FBS. В суспензию клеток добавляли первично-меченые антитела FITC anti-human beta-2-microglobulin (Sony Biotechnology, Япония) в расчете 1 мкл антител на 1 миллион клеток. Инкубировали клетки в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Далее промывали клетки в буфере для проточной цитометрии. Осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора DAPI с концентрацией 50 нг/мл для определения популяции живых клеток. Образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences, США).

2.10. Секвенирование по Сэнгеру

Выделение ДНК для скрининга клонов проводили с помощью раствора «ДНК-экспресс» (Литех, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки снимали с подложки, как было описано выше, центрифугировали при 250 g в течение 5 мин и отбирали супернатант. Ресуспендировали осадок в 100 мкл раствора «ДНК-экспресс», инкубировали 20 мин при 95°C в термостате. Центрифугировали при 12000 g в течение 60 с (Eppendorf MiniSpin, США). Полученный супернатант использовали в качестве исследуемого образца ДНК для постановки ПЦР (хранили образцы на -20°C). ПЦР проводили с использованием реагентов фирмы ThermoScientific (США) и Евроген (Россия).

Очищенные ПЦР-продукты в концентрации 25–50 нг/мкл отправляли на секвенирование в компанию Евроген (Россия). Секвенирование проводили, используя специфические праймеры для секвенирования ПЦР-продуктов в концентрации 5 пмоль/мкл. Праймеры, использованные для секвенирования, указаны в таблице 1. Для секвенирования гетерозиготных мутаций в локусе *B2M* продукты ПЦР предварительно клонировали в Т-вектор с использованием набора Quick-TA kit (Евроген, Россия) по стандартной методике. Для секвенирования плазмидной ДНК использовали стандартные праймеры M13F GTAAAACGACGGCCAG и M13R CAGGAAACAGCTATGAC.

Результаты секвенирования анализировали при помощи онлайн-ресурса <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> и <https://www.benchling.com>.

Таблица 1. Список праймеров, использованных для секвенирования локуса *B2M* и потенциальных сайтов неспецифического редактирования.

Праймер	Последовательность	Температура отжига и длина ПЦР продукта
b2mS1 b2mS2	CTGGCTTGGAGACAGGTGACGGTC CGAGATCCAGCCCTGGACTAGC	60°C, 335 п.о.
LIMCH1-F LIMCH1-R	TATGATGCCAGACCCATCCG TCAATCCACTTCTGCGCCTC	60°C/543 п.о
SEMA5A-F SEMA5A-R	GGATGAAAATCTCCTCCGTGCT TCCAGCTGTAGCGAATCTTGT	60°C/267 п.о.
DNM2-F DNM2-R	GGGGATGCTGTGTGACTTGA CAAAGAGTGCAGGGGGACAT	60°C/568 п.о
PIK3R5-F PIK3R5-R	TCCCAACAACCTTATGGACCC ACTGGCGTGTTCCTTTAGGG	60°C/405 п.о
SLC9A2-F SLC9A2-R	GACGTGTTTCGTGGTGACCT AGGTCCGGTCTAAGGAGACA	60°C/355 п.о
GABRQ-F GABRQ-R	TCGGTTCTTTGACGTCCACC AGGCCCCAGGTAAGTGTAGT	60°C/439 п.о

2.11. Проточная цитометрия

Клетки промывали раствором PBS без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Далее клеточный осадок ресуспендировали в 50 мкл раствора антител. Список антител для проточной цитометрии, использованных в работе, и объем антител, необходимый для окрашивания 1 млн клеток, представлены в таблице 2. Инкубировали клетки в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Далее промывали клетки в буфере для проточной цитометрии. Осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора DAPI с концентрацией 50 нг/мл для определения популяции живых клеток. Образцы анализировали на проточном цитометре NovoCyte Flow Cytometer.

Таблица 2. Список первично меченых антител для проточной цитофлуориметрии, использованных в работе.

Название антитела	Каталожный номер	Количество на 1 млн клеток, мкл	Производитель
FITC anti-human beta-2-microglobulin	2181520	1	Sony Biotechnology (Япония)
APC anti-human HLA-ABC	2157045	2,5	Sony Biotechnology (Япония)
FITC anti-human CD73 (Ecto-55'-nucleotidase)	2320075	2,5	Sony Biotechnology (Япония)

Название антитела	Каталожный номер	Количество на 1 млн клеток, мкл	Производитель
Alexa Fluor® 647 anti-human CD90 (Thy1)	2240575	2,5	Sony Biotechnology (Япония)
APC anti-human CD105	2216040	2,5	Sony Biotechnology (Япония)
Brilliant Violet 785™ anti-human CD8	2323700	0,5	Sony Biotechnology (Япония)
PerCP/Cy5.5 anti-human CD3	2186680	1,5	Sony Biotechnology (Япония)
PE anti-human CD69	2154530	2	Sony Biotechnology (Япония)
APC anti-human CD56 (NCAM)	2191550	2	Sony Biotechnology (Япония)
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD107a (LAMP-1)	2243230	0,5	Sony Biotechnology (Япония)

2.12. Иммуноцитохимическое окрашивание

Подготовленные для окраски клетки промывали два раза раствором Хэнкса. В течение 20 мин фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) и промывали три раза раствором PBS (ПанЭко, Россия). Пермеабелизовали мембраны клеток раствором PBS с 0,1% TritonX-100 (Ferak Berlin, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Промывали три раза раствором PBS с 0,1% Tween 20 (Ferak Berlin, Германия). Неспецифическую сорбцию антител блокировали инкубацией при комнатной температуре в течение 30 мин в растворе для блокировки неспецифической сорбции следующего состава: PBS, 0,1% Tween 20, содержащем 5% FBS, 2% сыворотки козы (HyClone, США). Первичные антитела наносили в разведениях, рекомендованных производителем, в растворе для блокировки неспецифической сорбции. Антитела, использованные в работе, указаны в таблице 3. Инкубировали 1 час при комнатной температуре (поверхностные антигены) или ночь при +4°C (ядерные антигены) и отмывали три раза по 5 мин раствором PBS с 0,1% Tween 20. Вторичные антитела (Invitrogen, США), конъюгированные флуоресцентными метками (Alexa Fluor™488, Alexa Fluor™555), наносили в разведении 1:800 в растворе PBS с 0,1% Tween 20, инкубировали 1 час в темноте при комнатной температуре, затем отмывали три раза по 5 мин раствором PBS с 0,1% Tween 20. Инкубировали 10 мин с DAPI (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 0,1 мкг/мл в PBS в темноте при комнатной температуре. Отмывали два раза PBS. Микрофотографии окрашенных антителами клеточных культур получали с помощью флуоресцентного

микроскопа Olympus IX53 и программного обеспечения cellSens Standart 1.11 (Olympus Corporation, Япония).

Таблица 3. Список первичных и вторичных антител, использованных в работе.

Название антитела	Каталожный номер	Разведение	Производитель
Rabbit anti-human Oct 3/4	#Ab18976	1:100	Abcam, США
Mouse anti-human Nanog homeobox	PCRP-NANOGP1-2D8	1:40	DSHB, США
Mouse anti-human TRA-1-81	# 4745S	1:40	CellSignalling, США
Mouse anti-human SSEA-4	#MC81370	1:40	DSHB, США
Mouse anti-human cytokeratin 18	#M7010	1:100	Agilent DAKO, США
Rabbit anti-human CD31	#Ab28364	1:100	Abcam, США
Rabbit anti-human HNF4A	# Ab92378	1:100	Abcam, США
Goat anti-mouse igG (H+L), Alexa Fluor 555	#A21422	1:800	ThermoFisher Scientific, США
Goat anti-rabbit igG (H+L), AlexaFluor 488	#A11008	1:800	ThermoFisher Scientific, США

2.13. Формирование и культивирование эмбрионных телец

В работе использовали коммерческие плашки AggreWell™400 (Stem Cell Technologies, Канада), предназначенные для формирования стандартизованных эмбрионных телец одинакового размера. Перед началом работы каждую лунку промывали 1 мл раствора Anti-Adherence Rinsing Solution (Stem Cell Technologies, Канада), не допуская образования пузырей в микролунках. Центрифугировали 5 мин при 3600 об./мин (Eppendorf Centrifuge 5804R, ротор A-2 DWP, США). После удаления пузырей отбирали раствор Anti-Adherence Rinsing Solution, промывали каждую лунку средой DMEM и заменяли ее на 1 мл Essential 8™ + 5 мкМ Y-27632. Параллельно подготавливали суспензию клеток: на одну лунку брали приблизительно 1,6–1,8 миллиона ИПСК, которые снимали с подложки трипсином, как было описано выше. Ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл Essential 8™ + 5 мкМ Y-27632. Переносили суспензию клеток в предварительно подготовленную лунку AggreWell™400. Пипетировали аккуратно для лучшего распределения клеток в пределах лунки. Центрифугировали при 100 g в течение 10 мин для помещения клеток в микролунки. Инкубировали в течение 24 часов на 37 °C. На следующий день в микролунках наблюдали сформировавшиеся эмбрионные телца. Отбирали 1 мл среды и добавляли 1 мл среды для культивирования эмбрионных телец следующего состава: DMEM/F12 (ПанЭко, Россия), 20% заменителя сыворотки KnockOut™ Serum Replacement (Gibco, США), 1-х смесь аминокислот, 0,1 мМ β-меркаптоэтанол. Аккуратно вымывали образовавшиеся эмбрионные телца, размером приблизительно 1000 клеток, струей среды

и переносили в лунки плашки с предельно низкой адгезией Ultra Low Adhesion Plates (Corning, США). Проверяли в микроскоп все микролунки. При необходимости добавляли 2 мл среды и повторяли процедуру. Через 5 мин, когда эмбрионидные тельца под силой тяжести опускаются на дно лунки – отбирали 75% среды и добавляли 1 мл среды Essential 8™ и 1 мл среды для культивирования эмбрионидных телец. Среду меняли каждый день. На третий день дифференцировки изменяли количество SR в среде на 15% и добавляли 5% FBS. Остальные компоненты среды оставляли неизменными. Аналогично на 6 день изменяли количество SR и FBS на 10% и 10%, соответственно.

2.14. Спонтанная дифференцировка ИПСК

После 12–14 дней суспензионного культивирования эмбрионидные тельца пересевали на 48-луночные культуральные планшеты, покрытые 0,1% желатином (Sigma-Aldrich, США) в среде для культивирования эмбрионидных телец с концентрацией SR 5% и FBS 10%. Среду меняли раз в 2–3 дня. Через неделю в среде для культивирования эмбрионидных телец оставляли только 10% FBS. Из прикрепленных и распластанных по поверхности желатиновой подложки эмбрионидных телец начиналась активная миграция клеток, которые через две недели образовывали обширные дифференцированные области. На этом сроке культивирования клетки фиксировали и окрашивали антителами.

2.15. Выделение тотальной РНК

Предварительно рабочее место и автоматические пипетки обрабатывали RNaseZap (Invitrogen, США) и промывали стерильной водой. Все дальнейшие манипуляции выполняли с использованием наконечников для пипеток с фильтрами и стерильных микропробирок без РНКаз. Выделение тотальной РНК из клеточных культур проводили при помощи набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Клетки снимали с подложки, как это было описано ранее, промывали раствором PBS и ресуспендировали в 600 мкл RLT буфера, после чего приступали к выделению РНК на колонке согласно инструкции производителя. На последнем этапе элюцию РНК проводили в 50 мкл буфера. Выделенную РНК хранили при -70°C.

2.16. Полимеразная цепная реакция, сопряженная с реакцией обратной транскрипции

Процедуру получения первой цепи кДНК проводили в реакционной смеси, объемом 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве праймеров для реакции обратной транскрипции использовали случайные декануклеотидные праймеры (Евроген, Россия). На

одну реакцию брали 2 мкг тотальной РНК. Полученные образцы первой цепи кДНК хранили в аликвотах по 10 мкл, не допуская повторных циклов замораживания-размораживания, при температуре -70 °С. ОТ-ПЦР проводили с использованием реагентов компании Евроген (Россия). Праймеры, использованные в работе, были синтезированы компанией Евроген (Россия). Реакцию проводили в приборе TC1000-G (DLAB Scientific, Китай). Схема амплификации: 95°С/2мин; 95°С/15 сек (30–35 циклов); Т°С отжига праймеров/15 сек (30–35 циклов); 72°С/20 сек (30–35 циклов); 72°С/2 минуты. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Список праймеров, использованных для ОТ-ПЦР.

Праймер	Последовательность	Температура отжига и длина продукта
OCT4-F OCT4-R	CCTTCGCAAGCCCTCATTTTC AACCACACTCGGACCACATC	60°С/887 п.о.
SOX2-F SOX2-R	AACCAGCGCATGGACAGTTA GACTTGACCACCGAACCCAT	60°С/278 п.о.
SALL4 -F SALL4 -R	TGGCGGAGAGGGCAAATAAC ATGCTGAAGAACTCCGCACA	60°С/300 п.о.
DPPA5-F DPPA5-R	AAGATGGGA ACTCTCCCGGC GCAAGTTTGAGCATCCCTCGC	61,6°С/311 п.о.
GAPDH-F GAPDH-R	GAAGGTGAAGGTCCGGAGTCA GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC	60°С/118 п.о.

Гель-электрофорез продуктов ОТ-ПЦР проводили в 1–2% агарозном геле с 0,5 мкг/мл бромистого этидия в камере для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия) на основе однократного буфера TAE (Tris-Acetate-EDTA). Каждый анализируемый образец смешивали с буфером для нанесения 6х DNA Loading Dye (Thermo Scientific, США). Для определения длины фрагментов использовали маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, США). Результаты гель-электрофореза фиксировали с помощью системы GelDoc XR+ (Biorad, США) в свете ультрафиолета (302 нм).

2.17. Приготовление препаратов метафазных хромосом ИПСК человека

За 8 ч до фиксации ИПСК меняли среду. За час до фиксации в среду клеткам добавляли колцемид (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.1–0.2 мкг/мл. После инкубации с колцемидом отбирали среду, промывали два раза раствором Хэнкса, после чего добавляли 0.05% раствор трипсина и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Отбирали раствор трипсина, ресуспендировали клетки в 1 мл среды для инактивации и переносили в 15 мл пробирку. Добавляли 5 мл 0.075 М раствора KCl комнатной температуры и инкубировали 20 минут при 42° С. Добавляли фиксатор (метанол-ледяная уксусная кислота в соотношении 6:1) в соотношении с объемом клеточной суспензии 1:40

и перемешивали переворачиванием. Клеточную суспензию центрифугировали при 4°C и 400 g в течение 5 мин, отбирали супернатант, оставляя примерно 0.5 мл и ресуспендировали клетки. Добавляли 1 мл холодного фиксатора (метанол-ледяная уксусная кислота в соотношении 6:1), перемешивали и центрифугировали при 4°C 600 g в течение 4 мин. Отбирали супернатант, оставляя примерно 0.5 мл. Добавляли 1 мл холодного фиксатора (метанол-ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) перемешивали и центрифугировали при 4°C 600 g в течение 5 мин. Отбирали супернатант, оставляя примерно 0.5 мл и ресуспендировали клетки. На холодное мокрое предметное стекло наносили 10–20 мкл клеточной суспензии, позволяли ей растечься по стеклу, собирали капли жидкости с краев стекла фильтровальной бумагой. Затем препараты высушивали при 40–60 °С.

2.18. Дифференциальное окрашивание метафазных хромосом

Высушенные на воздухе препараты метафазных хромосом выдерживали несколько дней при комнатной температуре. Препараты инкубировали в растворе DAPI в течение 5 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре. Затем метафазные пластинки анализировали и фотографировали при увеличении 63X при помощи эпифлуоресцентного микроскопа Eclipse Ti2, оборудованного соответствующими светофильтрами и камерой DS-Qi2 (Nikon). Часть препаратов была передана в ДГОИ им. Димы Рогачева для GTG-бэндинга, роботизированного поиска метафаз и кариотипирования.

2.19. Дифференцировка ИПСК в фибробластоподобные клетки (iPS-fibro)

Дифференцировку ИПСК в направлении фибробластоподобных производных проводили через стадию эмбриоидных тел. Эмбриоидные тельца были сформированы по протоколу, описанному выше, с небольшими изменениями: вместо AggreWell™400 были использованы 24-луночные планшеты AggreWell™800, которые позволяют формировать эмбриоидные тельца, состоящие из большего количества клеток. Также было увеличено количество клеточной суспензии до 3 млн клеток на 1 лунку. На следующий день сформированные эмбриоидные тельца аккуратно вымывали из лунок и переносили в 5 мл пробирки, при этом эмбриоидные тельца опускались на дно пробирки под действием силы тяжести. Далее отбирали надосадочную жидкость и переводили эмбриоидные тельца в среду F1 следующего состава: DMEM/F12 (3:1), 5% FBS, 0,1 мкг/мл гидрокортизон (Гедеон Рихтер, Венгрия), 10 нг/мл EGF (Miltenyi Biotec, Германия), 5 мкг/мл инсулин (Sigma-Aldrich, США). Эмбриоидные тельца культивировали на орбитальном шейкере в специальных минибиореакторах (Еремеев с соавт., 2019). С четвертого по седьмой дни

дифференцировки в среду F1 добавляли BMP4 (Peprotech, США) в концентрации 2 нг/мл. На восьмой день дифференцировки эмбрионидные тельца переводили на среду F3 следующего состава: DMEM (Gibco, США), 10% FBS, 5 нг/мл bFGF (Peprotech, США), культивировали на протяжении 7 дней, меняя среду 2–3 раза в неделю. Полученные эмбрионидные тельца переносили в среде F3 на чашки Петри, предварительно покрытые матригелем. Эмбрионидные тельца адгезировали к подложке, после чего начиналась активная миграция клеток. Смену среды осуществляли 2–3 раза в неделю. Полученные производные снимали с подложки, используя 0,25% раствор трипсина. Через 1,5–2 недели адгезивного культивирования образовывалась обогащенная популяция фибробластоподобных клеток. Эффективность дифференцировки оценивали по уровню экспрессии маркеров CD105, CD73, CD90 при помощи проточной цитометрии.

2.20. Дифференцировка ИПСК в клетки пигментного эпителия сетчатки (iPS-RPE) и кардиомиоциты (iPS-CM)

Дифференцировку ИПСК в iPS-RPE проводили согласно модифицированному протоколу Brandl (Brandl, 2019). ИПСК в течение 3 дней выдерживали в состоянии 100% конфлюентности, на 4 день переводили в среду iRPE-diff следующего состава: DMEM, 20% заменителя сыворотки, 10 мМ никотинамида (Sigma-Aldrich, США), 1-х смесь аминокислот, 0,1 мМ β-меркаптоэтанола. На третьей и четвертой неделях в среду iRPE-diff добавляли 62 нг/мл активина А. По мере роста и формирования колоний с характерной гексагональной морфологией, пигментированные области механически отбирали и культивировали далее в виде высоко очищенной клеточной популяции предшественников пигментного эпителия сетчатки в среде iRPE-med следующего состава: DMEM, 20% заменителя сыворотки, 10 мМ никотинамида, 50-х смесь аминокислот. Общая продолжительность дифференцировки составляет около 60–70 дней.

Дифференцировку ИПСК в кардиомиоциты проводили, используя коммерческий набор STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Kit (Stem Cell Technologies, Канада) согласно рекомендациям производителя. Кластеры сокращающихся клеток наблюдались на 10 день дифференцировки.

2.21. Культивирование клеточной линии K562

Клетки линии K562 культивировали в плашках для суспензионных культур в среде следующего состава: RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), 10% FBS. Плотность посева составляла 300–400 тыс. клеток/мл.

2.22. Стимуляция клеток *IFN* γ

Клетки обрабатывали *IFN* γ (Селлтера-Фарм, Россия) в концентрации 100 нг/мл в течение 48 часов. В день посева клетки дополнительно промывали раствором Хэнкса.

2.23. Выделение мононуклеаров периферической крови

Венозную кровь получали от здоровых доноров-добровольцев из ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, а лейкоконцентраты крови получали от здоровых доноров из ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России. Забор крови производился медицинским персоналом после подписания донором информированного согласия об участии в исследовании. Выделение мононуклеаров периферической крови (PBMCs) проводили не более чем через 2 часа после забора материала по стандартной методике в градиенте плотности фиколла. Для этого разбавляли образцы крови в 2–4 раза буфером PBS/EDTA следующего состава: PBS без Ca^{2+} Mg^{2+} , 2 мМ ЭДТА (pH 7,2). В стерильные 50 мл пробирки добавляли LymphoPrep™ Solution (Axis-Shield, Норвегия) и сверху аккуратно наслаивали разбавленные образцы крови. Центрифугировали в течение 20 мин при 800 g комнатной температуре в режиме медленного разгона и торможения. Осторожно переносили интерфазное кольцо в стерильные 50 мл пробирки. Трижды промывали клетки буфером PBS/EDTA в течение 10 мин сначала при 300 g, а затем при 200 g, чтобы избавиться от тромбоцитов. Отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в буфере PBS/EDTA. Подсчитывали количество клеток с помощью камеры Горяева. Переходили к дальнейшему сепарированию на магнитных колонках. Избыток мононуклеаров замораживали, используя смесь для криоконсервации следующего состава: инактивированная сыворотка FBS (HI-FBS) + 7% DMSO. Инактивированную сыворотку получали путем нагревания FBS при 56°C в течение часа, периодически перемешивая.

2.24. Иммуномагнитная сепарация CD8^+ Т-лимфоцитов и НК-клеток

Для получения требуемых популяций лимфоцитов применяли метод иммуномагнитной сепарации с использованием магнитных частиц MicroBeads компании Miltenyi Biotec (Германия). CD8^+ Т-клетки выделяли с помощью CD8 MicroBeads в соответствии с протоколом производителя. НК-клетки последовательно выделяли из немеченой клеточной фракции - CD8 -деплецированных PBMCs с использованием набора NK-Cell Isolation Kit. Выделенные лимфоциты культивировали в бессывороточной среде X-VIVO 15 (Lonza, Швейцария) в плотности 1,5–2 млн/мл. За день до иммунологических тестов CD8^+ Т-клетки и НК-клетки преактивировали цитокином IL-2 (Биотех, Россия) в концентрации 500 ед./мл.

2.25. Анализ активации Т-клеток

Клетки-мишени за день до теста рассаживали в 48-луночные планшеты для культивирования, по 75 тыс. клеток на лунку. В каждом независимом эксперименте все измерения проводили в трех повторностях. На следующий день к клеткам-мишеням вносили по 100 тысяч CD8⁺ Т-клеток в 500 мкл среды (X-VIVO 15 + 4% инактивированной сыворотки FBS + 100 ед./мл. IL-2). После добавления эффекторных клеток клетки быстро осаждали путем центрифугирования при 300 g в течение трех минут. Сокультивирование проводили на протяжении 7 дней. В качестве негативного контроля активации использовали нестимулированные Т-клетки. После окончания инкубирования образцы окрашивали антителами к CD3 и CD69 по стандартной методике и анализировали на проточном цитометре NovoCyte Flow Cytometer.

2.26. Анализ дегрануляции НК-клеток

Клетки-мишени за день до теста рассаживали в 96-луночные планшеты для культивирования, по 45 тыс. клеток на лунку. В каждом независимом эксперименте все измерения проводили в трех повторностях. На следующий день к клеткам-мишеням вносили по 60 тысяч НК-клеток в 70 мкл среды X-VIVO 15. Для накопления сигнала антитела к CD107a и CD56 напрямую добавляли в смесь с НК-клетками. В тестах на блокирование активирующих рецепторов НК-клеток дополнительно вносили антитела против NKG2D (#320813, Biolegend, США) или DNAM-1 (#2285520, Sony Biotechnology, Япония) рецепторов или изотипический контроль (#Ab37355, Abcam, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл. После добавления эффекторных клеток клетки быстро осаждали путем центрифугирования при 300 g в течение трех минут. Сокультивирование проводили на протяжении 4 часов. В качестве негативного контроля дегрануляции использовали нестимулированные НК-клетки, в качестве положительного контроля – клетки линии K562. После окончания инкубирования образцы дважды промывали буфером для проточной цитометрии, ресуспендировали в 100 мкл раствора DAPI с концентрацией 50 нг/мл и анализировали на проточном цитометре NovoCyte Flow Cytometer.

2.27. Анализ цитотоксичности НК-клеток

Клетки-мишени за день до теста рассаживали в 96-луночные планшеты для культивирования, по 25 тыс. клеток на лунку. На следующий день к клеткам-мишеням вносили НК-клетки на разных соотношениях эффекторные/таргетные клетки (4/1, 2/1, 1/1) в 200 мкл среды LDH medium (RPMI-1640 без фенолового красного + 1% HI-FBS) и

инкубировали в течение 4 часов. Далее отбирали 100 мкл супернатанта, который анализировали с помощью набора Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Швейцария) согласно инструкции производителя. При этом среду LDH medium использовали в качестве фонового контроля. Клетки-мишени, культивируемые отдельно (живые клетки - target spontaneous release), а также нестимулированные NK-клетки (effector cell control) использовали в качестве контроля спонтанного высвобождения LDH. Клетки-мишени, лизированные 1% Triton-X-100 в конечной точке проведения эксперимента, использовали в качестве максимального высвобождения LDH (мертвые клетки – target maximum release). Измерения во всех группах образцов проводили в трипликатах. Цитотоксичность NK-клеток (%) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Цитотоксичность, (\%)} = \frac{\text{ОП}_{[\text{иссл.образца}]} - \text{ОП}_{[\text{живых клеток-мишеней}]} - \text{ОП}_{[\text{NK-клеток}]}}{\text{ОП}_{[\text{мертвых клеток-мишеней}]} - \text{ОП}_{[\text{живых клеток-мишеней}]}}$$

2.28. Полногеномное секвенирование РНК

Полногеномное секвенирование РНК выполнялось на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (приволжского) федерального университета (г. Казань) совместно с Т.Н. Григорьевой. Обогащение полиаденилированной РНК и подготовку библиотеки проводили с помощью набора NEBNext Ultra II (NEB, США) в соответствии с протоколом производителя. Полученные библиотеки очищали с использованием системы Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США), после чего оценивали качество и распределение библиотек по размерам с помощью высокочувствительного ДНК-чипа (Agilent Technologies, США). Концентрации библиотек определяли с помощью Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (ThermoFisher, США). Секвенирование проводили в системе NextSeq 500 (Illumina) с помощью NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 циклов).

2.29. Анализ данных РНК-секвенирования

Анализ данных РНК-секвенирования проводился совместно с сотрудниками лаборатории системной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Дифференциально экспрессируемые гены были идентифицированы с использованием пакета языка программирования “R” “DESeq2” (Love *et al.*, 2014). Пакеты “FactoMineR” (Lê *et al.*, 2008) и “ggplot2” (Wickham, 2016) были использованы для анализа PCA и визуализации данных, соответственно. Для функциональной аннотации дифференциально экспрессированных генов была использована база данных “topGo” языка программирования “R” (Alexa &

Rahmenfuhrer, 2022). Пороговым уровнем отсечения считали p-value <0,05. Коррекцию значений p-value на множественное сравнение проводили при помощи метода Бенджамини–Хохберга (FDR - false discovery rate).

Сравнение с независимо полученными данными РНК-секвенирования проводили с помощью анализа log-преобразованных прочтений DESeq2 с использованием пакета языка программирования “R” “FactoMineR” (Lê *et al.*, 2008). Коэффициенты корреляции Пирсона были рассчитаны по нормализованным прочтениям DESeq2 и визуализированы с использованием пакета “corrplot” в языке программирования “R”.

2.30. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Реакцию проводили с использованием коммерческого реагента qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad, США). В качестве референсного гена использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*, для каждого гена реакцию проводили в трипликатах. Схема амплификации включала следующие стадии: 95°C/3 мин; 95°C/10 сек (40 циклов); T°C отжига праймеров/45 сек (40 циклов). Обработку полученных результатов производили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ Software (BioRad, США). Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени представлены в таблице 5.

Таблица 5. Список праймеров, использованных для ПЦР в реальном времени.

Праймер	Последовательность	Температура отжига и длина продукта
qB2M-F qB2M-R	AGATGAGTATGCCTGCCGTGTG GCGGCATCTTCAAACCTCCA	61°C/105 п.о.
qHLA-A-F qHLA-A-R	TGTTCTAAAGTCCGCACGCA CGGGACACGGATGTGAAGAA	60°C/168 п.о.
qHLA-B-F qHLA-B-R	CTAGCAGTTGTGGTCATCGGA TGCATCTCAGTCCCTCACAAG	60°C/177 п.о.
qHLA-C-F qHLA-C-R	ACCCACCCGGACTCACATTCTC ATACCTCATGGAGTGGGAGCAGGC	64°C/128 п.о.
qMICA-F qMICA-R	ACTCACCTGTGCCCTCTGGGAAA GCAGCAGCAACAGCAGAAACATGGA	66°C/80 п.о.
qULBP1-F qULBP1-R	CAGAGAAGTGGGAGAAGAACAGG GCCAGAGAGGGTGGTTTTGTT	60°C/136 п.о.
qULBP3-F qULBP3-R	GGGAGAAGGATAGCGGACTGACC GGTGGGTGGTGTGTGGGTTC	64°C/122 п.о.
qCD112-F qCD112-R	GGTGGAGGACGAGGGCAACTAC GCTTGGTTCTTGGGCTTGGCTATG	64°C/105 п.о.
qCD155-F qCD155-R	CCTCAGCTAATGGGCATGTCTCCT CAGTCCCGACGCTGTACACCTTG	64°C/100 п.о.
qGAPDH60-F qGAPDH60-R	GAAGGTGAAGGTTCGGAGTCA GTTGAGGTCAATGAAGGGGTC	60°C/118 п.о.
qGAPDH66-F	TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGT	64°C/112 п.о.

qGAPDH66-R	AAGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTG	
------------	--------------------------	--

2.31. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили в программе Prism 9.3.1 (GraphPad). Все данные, представленные в исследовании, представлены в виде среднего \pm SEM (Standard error of the mean – стандартная ошибка среднего). Для анализа различий использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA – Analysis Of Variance) с последующим тестом множественного сравнения (тест Тьюки). Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Технология репрограммирования соматических клеток делает возможным получение персонализированного, то есть пациент-специфического клеточного продукта, что должно снять вопросы, связанные с гистосовместимостью пересаженных тканей и органов. В то же время противоречивые сведения о главном преимуществе производных ИПСК аутологичного происхождения – их иммунотолерантности – ставят под сомнение применение таких клеток вне протоколов иммуносупрессивной терапии.

Данная работа посвящена изучению иммуногенности дифференцированных производных ИПСК. В качестве источника клеток для трансплантации рассматриваются только дифференцированные производные ИПСК, в связи с чем исследование иммуногенности ИПСК имеет смысл проводить на их производных. Чтобы изучить особенности ответа аутологичных и аллогенных иммунных клеток, мы создали изогенную клеточную модель, состоящую из фибробластов кожи, использованных для репрограммирования, и фибробластоподобных клеток, полученных из ИПСК (iPS-fibro). iPS-fibro подобны фибробластам кожи и могут служить источником клеток для кожных эквивалентов, биоинженерных конструкторов, которые состоят из фибробластов и кератиноцитов на подложке-скэффолде. В настоящее время кожные эквиваленты демонстрируют эффективность в противоожоговой терапии и заживлении хронических язв (Oualla-Bachiri *et al.*, 2020).

С одной стороны, исходные фибробласты и фибробластоподобные производные должны экспрессировать одинаковый набор генов и белков, что потенциально должно опосредовать одинаковый ответ эффекторных клеток. С другой стороны, в отличие от фибробластов, iPS-fibro проходят длительные стадии репрограммирования, культивирования и дифференцировки, что может негативно влиять на их иммуногенные свойства. Поэтому в качестве контрольного образца в изогенную модель были включены iPS-fibro с инактивацией гена *B2M* (Δ iPS-fibro), то есть дифференцированные производные, лишенные молекул HLA-I. Отсутствие экспрессии молекул HLA I класса должно делать Δ iPS-fibro «невидимыми» как для аутологичных, так и для аллогенных цитотоксических Т-лимфоцитов. В то же время, клетки, не несущие на своей поверхности молекулы HLA-I, должны стать мишенями для NK-клеток. Таким образом, Δ iPS-fibro являются одновременно негативным контролем для анализа Т-клеточного ответа и положительным контролем для анализа NK-клеточного ответа. Графическая иллюстрация изогенной модели представлена на рисунке 9.

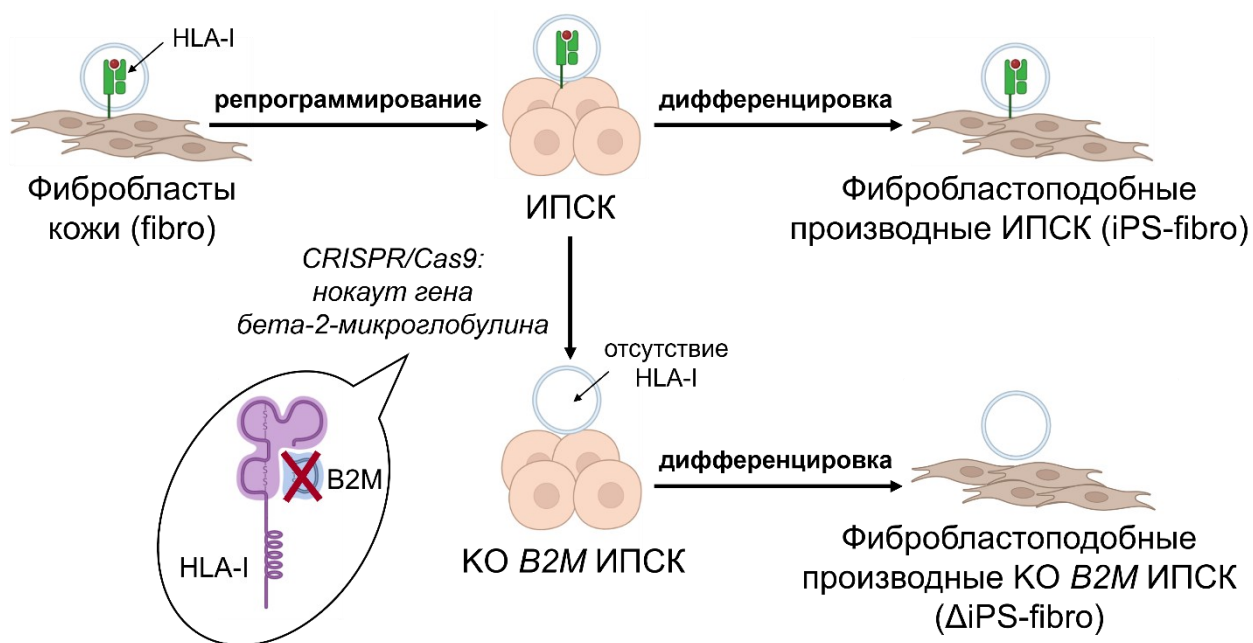


Рисунок 9. Схема изогенной клеточной модели, использованной в данном исследовании.

3.1. Создание изогенной клеточной модели для изучения иммуногенности ИПСК

Ранее в нашей лаборатории из фибробластов кожи здорового донора А (женщина, 48 лет на момент взятия биопсии) и фибробластов кожи здорового донора В (женщина, 26 лет на момент взятия биопсии) были получены линии ИПСК путём репрограммирования с помощью РНК-содержащего вируса Сендай. Вирус Сендай не имеет ДНК в качестве интермедиата процесса репликации, что делает данный способ репрограммирования возможным для потенциального терапевтического применения ИПСК. Здесь и далее используются следующие названия линий, обозначающие принадлежность к определенному донору: iPSC-A и iPSC-B. Полученные линии обладали нормальным кариотипом и ранее были охарактеризованы согласно стандартным критериям плюрипотентности (Vigont *et al.*, 2021; <https://hpscereg.eu/cell-line/RCPCMi007-A>).

Для получения клонов ИПСК, нокаутных по гену *B2M*, был использован метод геномного редактирования CRISPR/Cas9. На данный момент технология CRISPR/Cas9 – наиболее широко используемый метод для редактирования генома клеток человека, в том числе и ПСК (Bassett, 2017). Популярность этого метода обусловлена его высокой специфичностью, которая основана на связывании короткой направляющей РНК, находящейся в комплексе с нуклазой Cas9, с соответствующей последовательностью ДНК в геноме. Единственным лимитирующим фактором для нуклеазной активности Cas9 является наличие PAM (protospacer adjacent motif) последовательности, примыкающей к таргетной последовательности. При связывании направляющей РНК с таргетной

последовательностью нуклеаза Cas9 узнает PAM-последовательность и осуществляет около неё разрез двух нитей ДНК. Двунитевой разрыв ДНК подвергается репарации, которая может идти с ошибками, наиболее часто представленными небольшими инсерциями и делециями (инделами), которые могут приводить к мутациям сдвига рамки считывания, инактивирующих целевой ген.

Геномное редактирование CRISPR/Cas9 имеет целый ряд преимуществ. Во-первых, это дешеви́зна и сравнительная простота дизайна направляющей РНК, длиной всего в 20 пар оснований, что позволяет подобрать эффективную направляющую РНК практически к любому гену. Во-вторых, доступность и обилие биоинформатических сервисов, облегчающих подбор направляющей РНК для редактирования целевого гена с высокой степенью эффективности и минимальным уровнем возможных неспецифических (офф-таргет) эффектов. В-третьих, при наличии экзогенной донорной последовательности CRISPR/Cas9 может использоваться и для точных изменений нуклеотидных последовательностей, а не только для инактивации гена интереса. В-четвертых, в отличие от других методов геномного редактирования, важным преимуществом системы CRISPR/Cas9 является меньшая токсичность для клеток (Ding *et al.*, 2013). Однако, в то время как иммортализованные раковые линии клеток человека и ЭСК мыши подвергаются геномному редактированию с высокой эффективностью (Wang *et al.*, 2013), гораздо меньшая эффективность достигается в ЭСК и ИПСК человека, что существенно повышает затраты на геномное редактирование в линиях ПСК человека.

В целом, ПСК тяжело поддаются трансфекции и менее устойчивы к повреждениям ДНК, что является первым «узким» местом в геномном редактировании линий ИПСК. В данной работе были использованы два способа трансфекции ИПСК: химический (липофекция) и механический (электропорация). По данным литературы электропорация в сравнении с химическим методом является более эффективным методом для трансфекции ПСК (Sharifi Tabar *et al.*, 2015; Bohaciakova *et al.*, 2017). В нашей лаборатории и ранее трансфицировали разные линии ИПСК (в том числе, для целей геномного редактирования), для этого рутинно использовали реагент Lipofectamine 3000. Однако генетический бэкграунд клеточной линии, подвергаемой трансфекции (как механическим, так и химическим способом) является основополагающим фактором эффективности трансфекции. Перед началом работы рекомендуется для каждой клеточной линии подобрать оптимальное количество ДНК и липосомного реагента или оптимальное напряжение тока в случае электропорации, так как именно эти параметры играют ключевую роль в клеточной смерти и уровне доставки плазмиды. Поэтому первым этапом нашей работы стала оптимизация протокола трансфекции линий ИПСК.

Наибольшая эффективность трансфекции была достигнута при использовании электропоратора Neon Transfection System, однако при данном способе наблюдалась наибольшая токсичность и высокая смертность трансфицированных клеток, которая проявлялась не только сразу после трансфекции, но после сортировки трансген-позитивных клеток (Рисунок 10). Поэтому в качестве рабочего протокола для трансфекции ИПСК был выбран реагент Lipofectamine Stem Transfection Reagent, который специально разработан для культур стволовых клеток. В наших клеточных линиях он также показал свою сравнительно высокую эффективность, которая в ряде экспериментов достигала 20%, а также достаточно низкую токсичность для клеток.

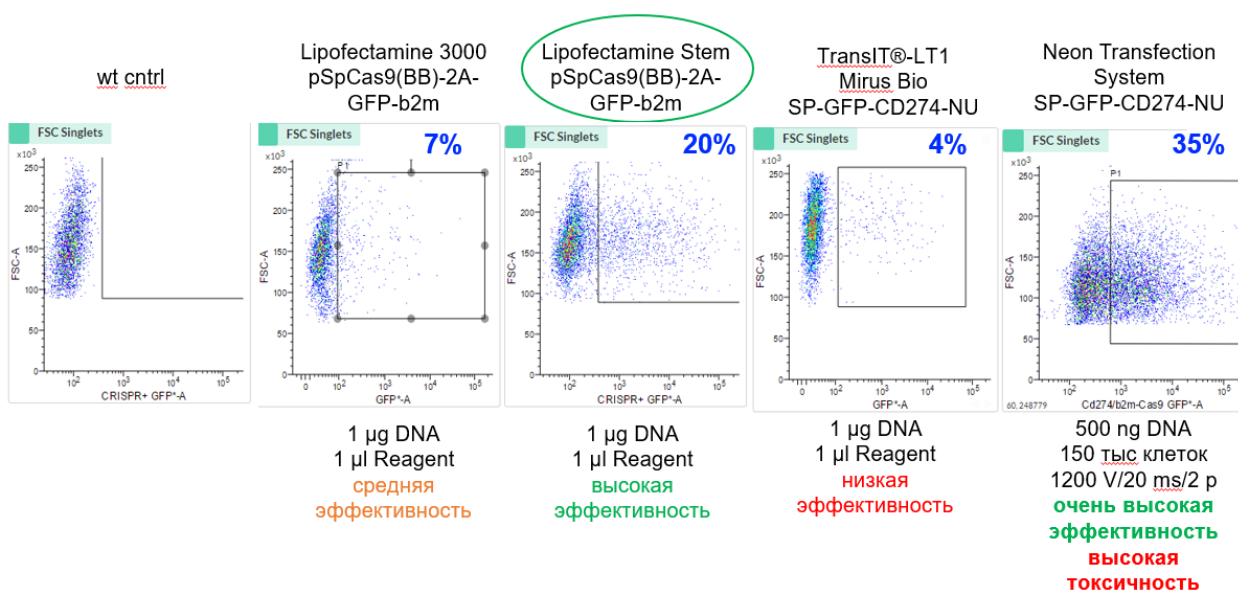


Рисунок 10. Оптимизация условий трансфекции ИПСК.

В работе был использован плазмидный вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP-b2m, разработанный на основе плазмиды PX458 (Ran *et al.*, 2013) в лаборатории генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА. Удобство и широкое применение данной плазмиды заключается в том, что в ней гены Cas9 и GFP разделены последовательностью 2A пептида, что упрощает получение отредактированных клеток, так как по флуоресценции белка GFP можно отсортировать популяцию клеток с высокой экспрессией нуклеазы Cas9. В плазмидном векторе также закодирована последовательность направляющей РНК (GAGTAGCGCGAGCACAGCTA) для внесения целевого двуцепочечного разрыва в первом экзоне гена *B2M*. Целевая область кодирует сигнальный пептид белка B2M, определяющий его транспорт в цитоплазматическую мембрану. Направляющая РНК была подобрана с использованием интернет-ресурса CRISPOR (Concordet & Hacussler, 2018), эффективность редактирования была предварительно оценена на клеточной линии НЕК293 (Димитриев с соавт., 2017).

Вторым узким местом геномного редактирования ИПСК является прохождение ИПСК через стадию одной клетки (single cell cloning), что сопровождается крайне низкой выживаемостью клеток (Chen *et al.*, 2018). В связи с этим сортировка одиночных клеток в 96-луночные планшеты применяется крайне редко, требует большого количества малых молекул и признана мало эффективной. Для решения этой проблемы обычно применяется стратегия посева клеток в предельно низкой плотности. При использовании данной методики отсортированные клетки высаживают на поверхность чашки Петри таким образом, чтобы клетки находились на максимально возможном расстоянии друг от друга, и каждая клетка в итоге смогла дать индивидуальную колонию, которую впоследствии можно будет отобрать механическим путем. При этом выжившие клетки способны обмениваться сигналами через общую культуральную жидкость. Однако слишком большое количество клеток в процессе их роста будет способствовать слиянию нескольких колоний в одну, что не подходит под критерии определения клеточной линии как потомства одной клетки. По данным литературы, для клонирования единичных ПСК-колоний плотность посева должна составлять 500–3000 клеток/см² площади. Однако наши первые попытки клонирования ИПСК показали, что данного количества GFP⁺ клеток после сортировки недостаточно для эффективного формирования колоний. Скорее всего, это связано с гибелью клеток, в которых активно работала нуклеаза Cas9. Поэтому для увеличения выживаемости единичных клеток был использован не только рутинно применяющийся ингибитор ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) (Wu *et al.*, 2016), но и специальный коммерчески доступный реагент CloneR™, что существенно повысило количество сформированных колоний после сортировки клеток.

Через 7 дней после сортировки подросшие колонии отбирали с чашки механическим путем, и далее каждый клон культивировали как самостоятельную клеточную линию. В результате для каждой линии было отобрано по 48 клонов. Поиск потенциально нокаутных клонов проводили путем первичного функционального скрининга, основанного на анализе экспрессии молекул B2M методом проточной цитометрии. B2M является поверхностной молекулой, что не требует специальной пробоподготовки или фиксации клеток для окраски, методология теста проста и занимает менее часа, что позволяет сразу отобрать клоны, у которых отсутствует экспрессия целевого белка – B2M. Данный метод позволил быстро элиминировать те клоны, в которых не произошло геномное редактирование и которые сохранили экспрессию гена *B2M*, что существенно сэкономило дорогостоящие среды для культивирования, а также расходные материалы и время, требуемое на процессинг клонов. Помимо этого, функциональный скрининг также позволил выявить и элиминировать клоны, в которых часть анализируемых клеток обладала экспрессией B2M,

а другая часть – нет. Такие клоны могли образовываться в результате слияния нескольких колоний на этапе клонирования ИПСК, то есть не являлись потомками одной клетки и не могли быть использованы в дальнейшей работе, так как представляли собой гетерогенную популяцию клеток по экспрессии B2M (как на рисунке 11). Всего по результатам первичного скрининга было отобрано 13 клонов ΔiPSC-A и 11 клонов ΔiPSC-B. Таким образом, суммарная эффективность редактирования составила 25%, что хорошо соотносится с литературными данными (Gonzalez *et al.*, 2014; Byrne *et al.*, 2014).

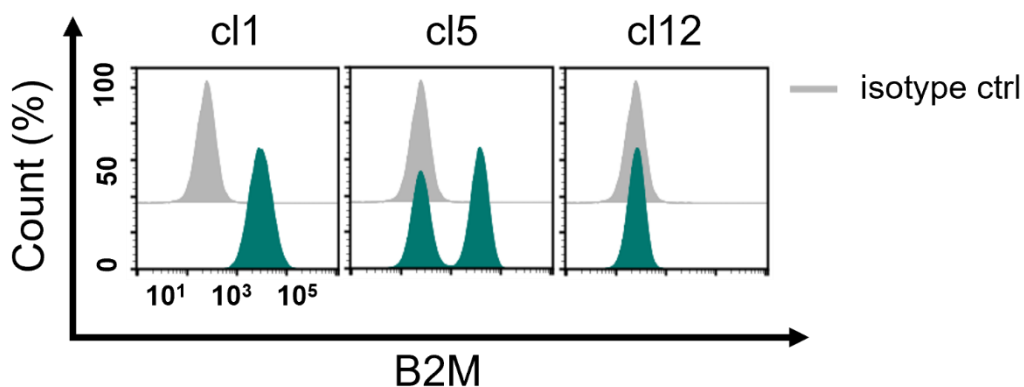


Рисунок 11. Репрезентативные результаты функционального скрининга клонов, отобранных после сортировки. Слева представлен неотредактированный клон cl1, все клетки которого экспрессируют B2M. В центре представлен клон cl5 с гетерогенной по экспрессии B2M популяцией клеток. Справа представлен отредактированный клон cl12, все клетки которого не экспрессируют B2M. Изотипический контроль отмечен серым.

Далее проводили секвенирование по Сэнгеру локуса гена *B2M* для точной характеристики мутаций, произошедших в результате геномного редактирования. Инактивация гена обычно происходит в результате образования инделов, которые приводят к сдвигу рамки считывания. В данной работе, в связи с особенностью дизайна направляющей РНК, мутации происходили строго в сигнальном пептиде белка B2M, поэтому независимо от последовательности мутации даже функциональный белок не мог быть транспортирован к клеточной мембране. Тем не менее, для дальнейшей работы мы отбирали линии ИПСК, в которых при редактировании были получены мутации сдвига рамки считывания, в результате чего формирование функционального белка маловероятно. Секвенирование не только позволяет точно определить изменения, которые произошли в интересующем белке, но и доказать клональное происхождение отобранных линий. В ходе секвенирования по Сэнгеру может быть получена гетерогенная хроматограмма, однако она не должна иметь более двух вариантов прочтений одного или нескольких нуклеотидов — как происходит в случае гетерозиготной мутации в исследуемом локусе. Если хроматограмма имеет более двух вариантов прочтения одного или нескольких нуклеотидов, это свидетельствует о возможном слиянии двух и более колоний на раннем

этапе клонирования ИПСК, что означает, что такие линии не имеют клонального происхождения.

Для дальнейшей работы и характеристики мы отобрали по одной линии ИПСК с инактивацией гена *B2M*. Линия ΔiPSC-A содержит гомозиготную делецию в гене *B2M*. В линии ΔiPSC-B произошли гетерозиготные мутации, поэтому для определения точных изменений в локусе гена *B2M* продукты ПЦР предварительно были клонированы в pAL2-TA-вектор. Последовательности образовавшихся мутаций в линиях ИПСК представлены на Рисунке 12.

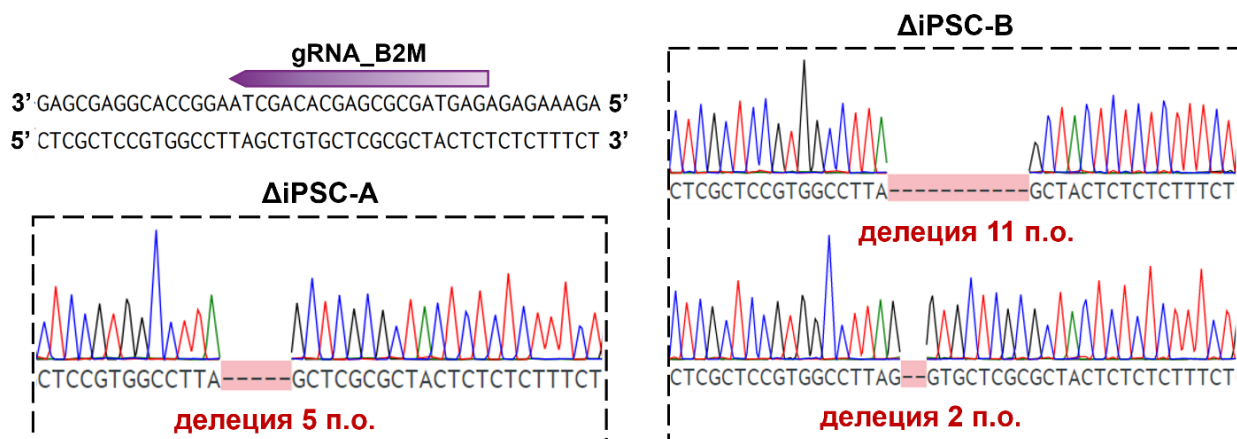


Рисунок 12. Делеции, образовавшиеся в аллелях гена *B2M* в процессе геномного редактирования в районе отжига гайдовой РНК в линиях ИПСК ΔiPSC-A и ΔiPSC-B.

Потенциальные офф-таргет эффекты, то есть мутации в неспецифических сайтах, являются одной из нежелательных проблем, которые могут возникнуть при использовании технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 (Hsu *et al.*, 2013). Поэтому важным этапом характеристики линий ИПСК, отредактированных с помощью системы CRISPR/Cas9, является проверка отсутствия мутаций в неспецифических сайтах. Возможные нецелевые сайты нуклеазы Cas9 для используемой в нашей работе направляющей РНК были подобраны при помощи онлайн-ресурса «Off-Spotter» (Pliatsika & Rigoutsos, 2015) и включают участки последовательностей следующих генов: *LIMCH1*, *SEMA5A*, *DNM2*, *PIK3R5*, *SLC9A2*, *GABRQ*. Мутации в офф-таргет сайтах в нокаутных линиях ИПСК обнаружены не были (Приложение 1).

Далее, в полученных нокаутных линиях ИПСК была проанализирована экспрессия молекул HLA I класса. *B2M* является легкой цепью димера HLA I класса и необходима для стабилизации экспрессии всего комплекса, в связи с чем его инактивация ведет к полной утрате экспрессии молекул HLA-I на поверхности клетки. На рисунке 13 представлены результаты цитофлуорометрического анализа экспрессии HLA-I в полученных нокаутных линиях, а также в соответствующих линиях дикого типа. Экспрессия HLA-I не была

детектирована даже после обработки провоспалительным цитокином $IFN\gamma$, что подтверждает функциональный нокаут гена *B2M*, который ведет к полной утрате белков HLA-I на поверхности клетки.

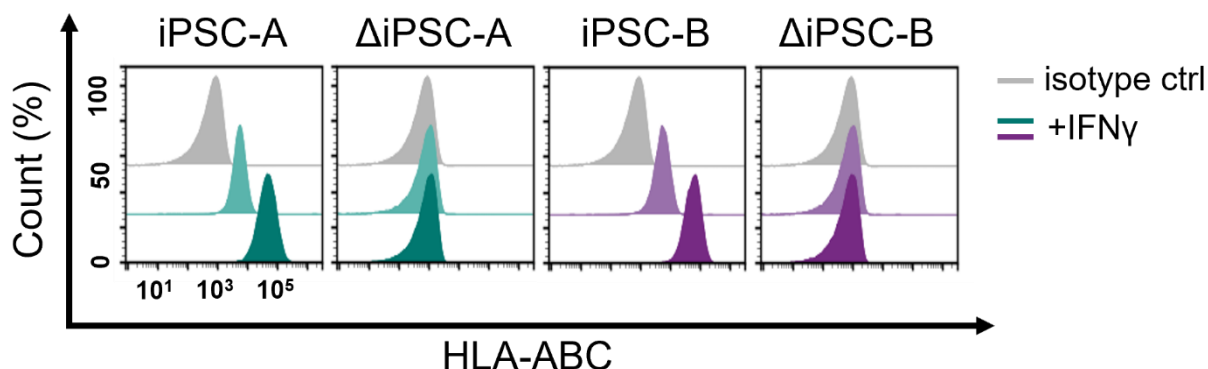


Рисунок 13. Анализ экспрессии HLA-ABC в клетках ИПСК дикого типа и изогенных ИПСК с нокаутом гена *B2M*. Образцы, предварительно обработанные $IFN\gamma$, отмечены темным цветом. Изотипический контроль отмечен серым.

Отобранные для дальнейшей работы нокаутные 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 эмбрионных тел и к спонтанной дифференцировке в производные трех зародышевых листков (Рис. 14). Детальная характеристика Δ iPSC-A опубликована ранее (Bogomiakova *et al.*, 2021).

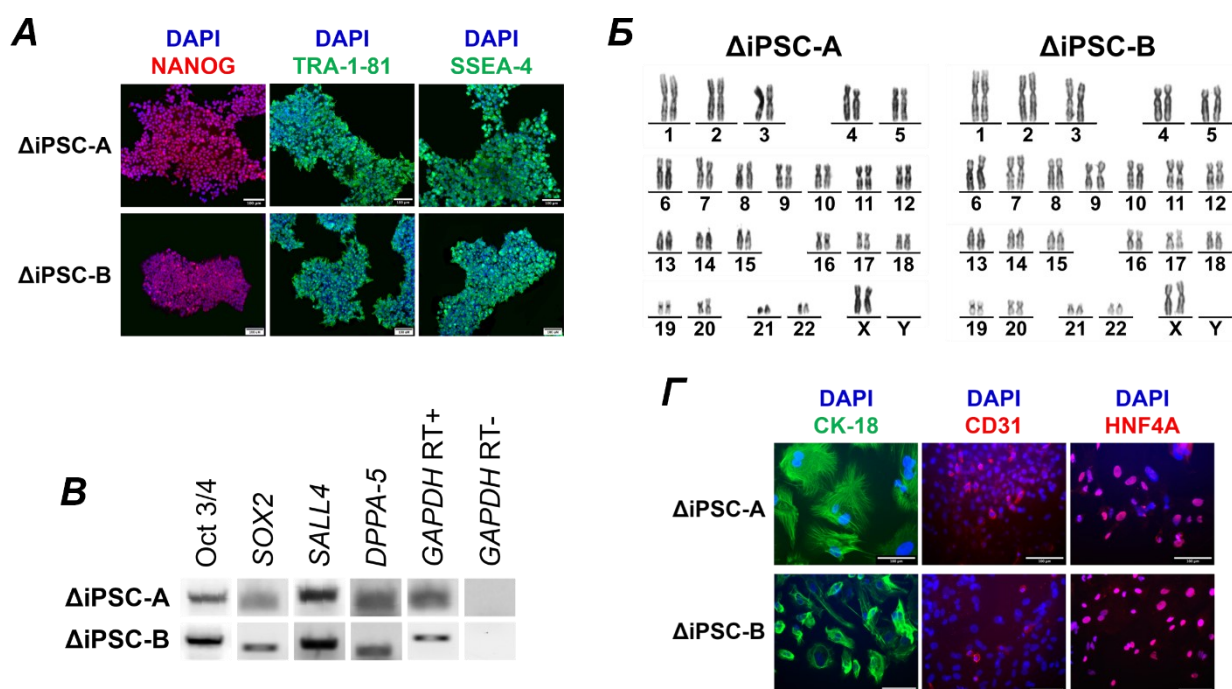


Рисунок 14. Характеристика линий ИПСК Δ iPSC-A и Δ iPSC-B. (А) Микрофотографии иммуоцитохимического выявления маркеров плюрипотентности (NANOG, красный; TRA-1-81 и SSEA-4, зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабная линейка – 100 мкм. (Б) Кариотип линий Δ iPSC-B и Δ iPSC-A. GTG-бэндинг. (В) Электрофореграмма амплифицированных фрагментов генов-маркеров плюрипотентности (OCT $\frac{3}{4}$, SOX2, SALL4, DPPA-5), полученных в ходе ОТ-ПЦР. GAPDH использован в качестве положительного контроля. (Г) Микрофотографии иммуоцитохимического 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 15А. Эффективность дифференцировки оценивали по морфологическому критерию (Рис. 15Б) и по уровню экспрессии следующих маркеров фибробластов: CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1), CD105 (эндоглин) методом проточной цитофлуорометрии (Рис. 15В). Как и в случае с плюрипотентными клетками, экспрессия *B2M* и HLA-ABC не была детектирована после дифференцировки нокаутных линий ИПСК в iPS-fibro (Рис. 15В).

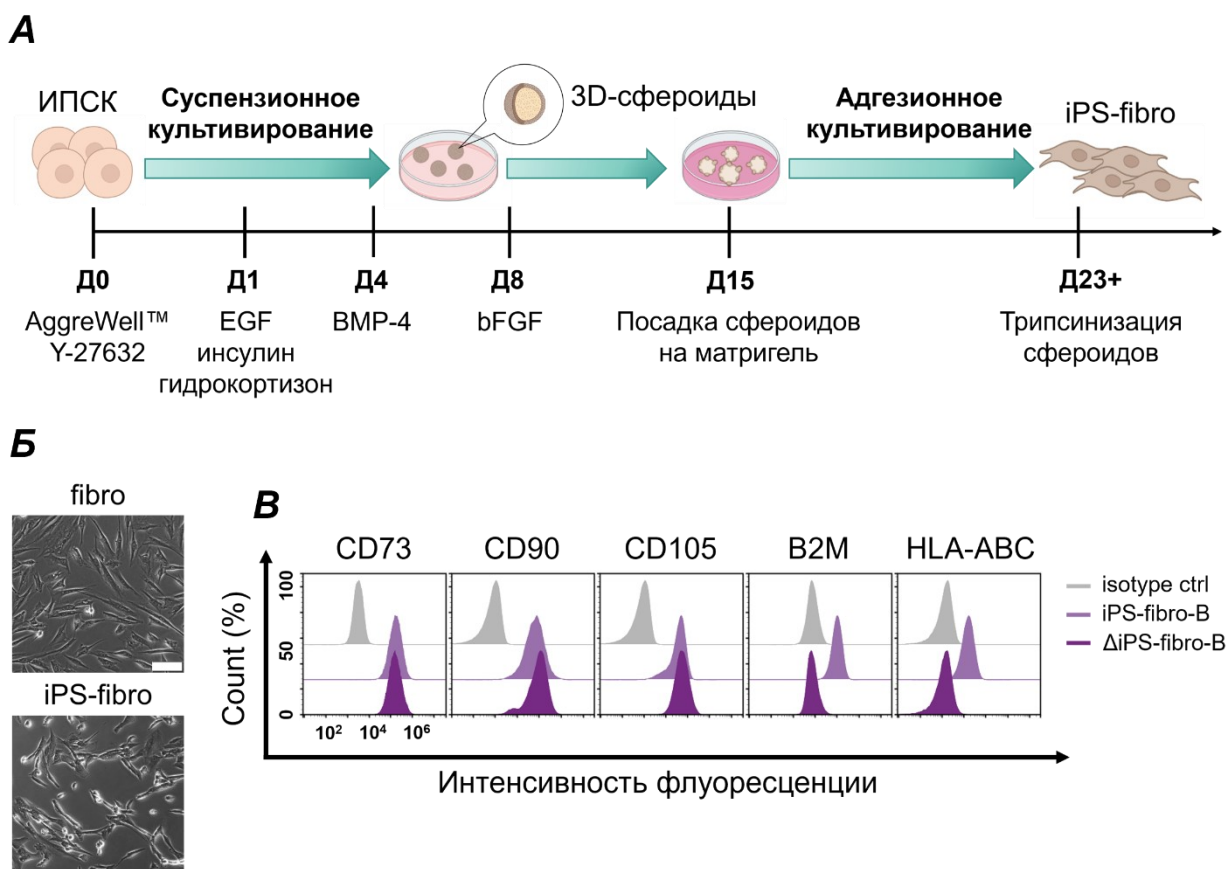


Рисунок 15. Получение и характеристика iPS-fibro. (А) Схема дифференцировки ИПСК в iPS-fibro. (Б) Сравнение морфологии iPS-fibro с исходными фибробластами,

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). Используя такую модель, представляется возможным сравнить *in vitro* активацию аллогенных и аутологичных иммунных клеток, то есть, оценить степень иммунотолерантности ΔiPS-fibro, а также ответить на вопрос, могут ли аутологичные производные ИПСК быть распознаны иммунной системой реципиента. Стоит подчеркнуть, что особенность и уникальность нашей клеточной коллекции заключается в доступе к аутологичным клеткам крови доноров фибробластов, что делает возможным проведение такого полномасштабного исследования иммуногенности производных ИПСК.

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

В данной работе иммуногенность клеток-мишеней по отношению к Т-лимфоцитам оценивали по степени активации эффекторных клеток. Для этого был использован метод, основанный на измерении экспрессии раннего маркера активации Т-клеток – молекулы CD69. Стоит отметить, что по данным литературы для оценки иммуногенности достаточно часто применяется лактат-дегидрогеназный (LDH) тест (Wang *et al.*, 2015). Данный тест основан на высвобождении лактатдегидрогеназы, цитоплазматического фермента, при разрыве мембраны и гибели клетки. Первоначально этот тест также был использован для оценки иммуногенности клеток-мишеней, однако LDH тест характеризуется крайне большим разбросом в оценке цитотоксичности Т-клеток, выделенных из периферической крови не только разных доноров, но и одного и того же донора в ограниченный период между донациями. Скорее всего, данный феномен может быть объяснен неспецифическими цитотоксическими функциями искусственно пре-активированных Т-клеток. В свою очередь, активационный тест подразумевает использование Т-клеток, которые пре-активируют сравнительно низкими концентрациями IL-2, ростового фактора Т-клеток. Сравнительно мягкая преактивация Т-клеток позволяет избежать неспецифической базальной активации Т-клеток, а также формирования LAK-клеток (lymphokine-activated killer cells), главной функцией которых является неспецифическая элиминация разных клеток, в том числе раковых.

Вторым существенным преимуществом активационного теста является использование значительно меньшего количества клеточного материала – эффекторных клеток, так как для LDH теста используется последовательное разведение (убывающее соотношение эффекторные/таргетные клетки: например, 10/1; 5/1; 2,5/1 и т. д.). Для активационного же теста такое соотношение по протоколу должно равняться 1/1, исходя из принципа: чем больше антигена – тем больше распознавания и активации Т-клеток. Соответственно, данный подход позволяет экономить клеточный материал, выделенный из крови донора, и магнитных частиц для выделения желаемых популяций из мононуклеаров периферической крови.

На первом этапе выполнения работы был отработан протокол по изучению активации Т-клеток при сокультивировании с клетками-мишенями. Были подобраны и оптимизированы следующие параметры для проведения теста: минимальное количество клеток-мишеней и клеток-эффекторов, необходимое для анализа на проточном цитометре, а также длительность их сокультивирования (Рис. 16). Суммарно в исследовании приняли участие 9 здоровых доноров.

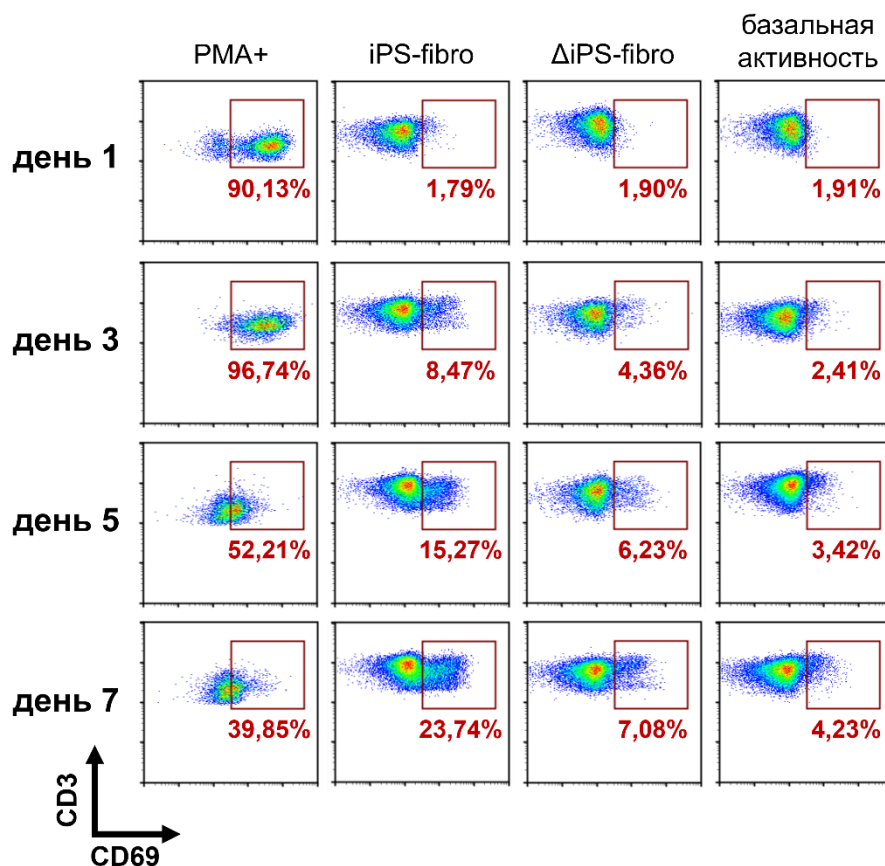


Рисунок 16. Оптимизация методики анализа активации Т-клеток при сокультивировании с различными клетками-мишенями. В качестве положительного контроля активации были использованы Т-клетки, обработанные РМА. В качестве отрицательного контроля (базальная активность) были использованы нестимулированные Т-клетки.

Как и ожидалось, процент аллогенных CD69⁺ Т-клеток, сокультивируемых с фибробластами и iPS-fibro, был значительно выше, чем в аутологичной модели (Рис. 17А). 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. 17А, 17Б). Таким образом, как аутологичные, так и аллогенные Т-клетки в одинаковой степени отвечали на сокультивирование как с изогенными фибробластами, так и с iPS-fibro.

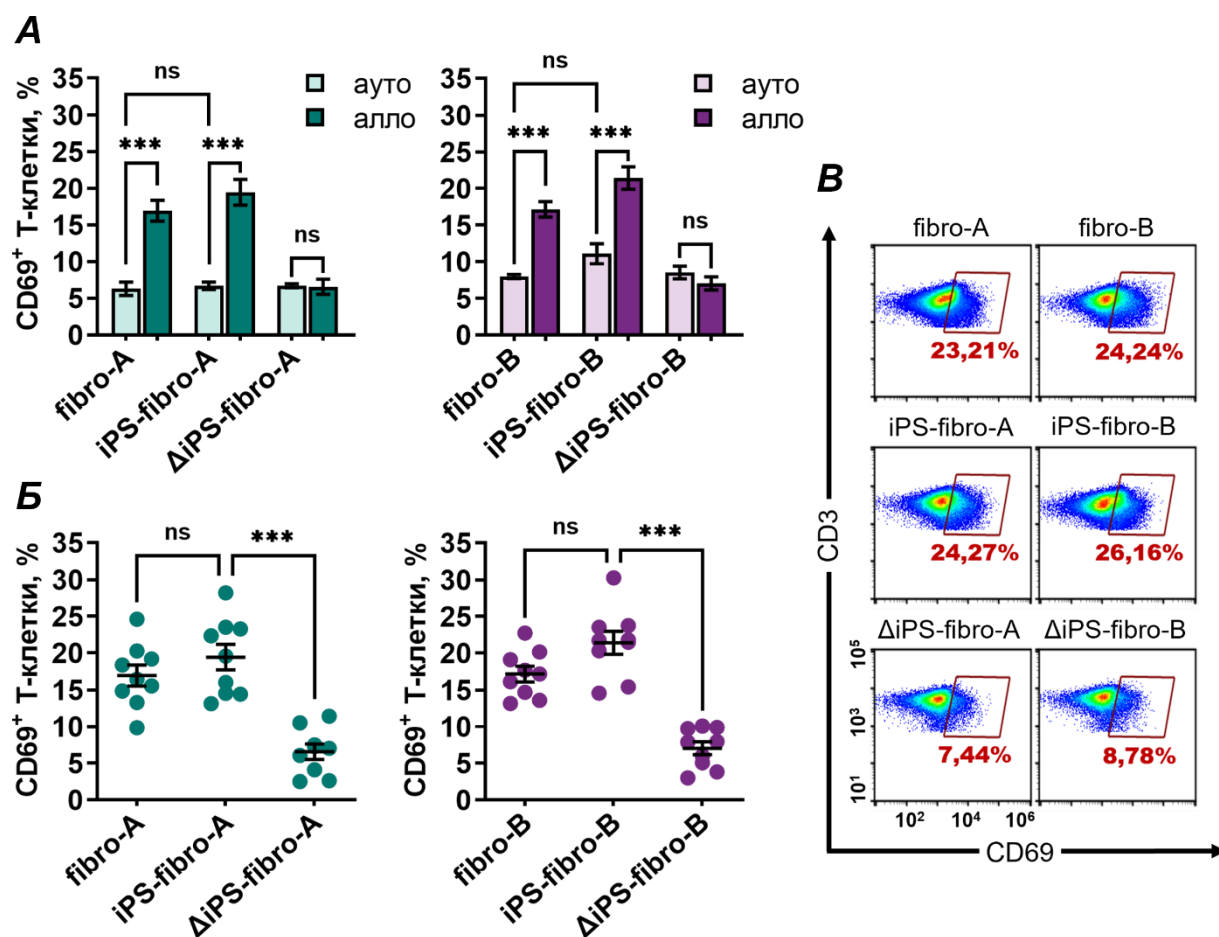


Рисунок 17. Иммуногенность производных ИПСК по отношению к Т-лимфоцитам. (А) Сравнение степени активации аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (выделено темным) Т-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и ΔiPS-fibro. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± 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 ± SEM. ***P < 0.001, ns – not significant, не обладающие статистической значимостью. (В) Репрезентативные графики проточной цитометрии, иллюстрирующие экспрессию CD69 Т-лимфоцитами аллогенного донора.

Известно, что основная роль Т-клеток заключается в распознавании чужеродных молекул, в том числе неоэпитопов. Следовательно, аномальная экспрессия генов или иммуногенные мутации могут индуцировать Т-клеточный иммунный ответ (de Almeida *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Теоретически, неоантигены могут потенциально возникнуть в процессе репрограммирования, длительного культивирования или дифференцировки ИПСК в желаемый тип клеток. Так, например, было показано, что *de novo* мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК) в ИПСК приводят к образованию иммуногенных неоэпитопов у мышей (Deuse *et al.*, 2019). 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. Тем не менее, не исключено, что это может быть характерным признаком, специфичным для конкретной линии ИПСК или их дифференцированных производных, и может требовать верификации для каждой новой линии ИПСК.

Также мы показали, что отсутствие “собственных” молекул HLA I класса не влияет на иммунный ответ аутологичных Т-лимфоцитов (Рис. 17А). 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. 17Б). Более того, для ΔiPS-fibro мы не наблюдали разницы в активации аутологичных или аллогенных эффекторных клеток (Рис. 17А). Эти данные доказывают, что манипулирование экспрессией HLA-I в ИПСК действительно приводит к иммунологической толерантности производных модифицированных ИПСК по отношению к аллогенным Т-клеткам.

3.3. Анализ иммуногенности производных ИПСК по отношению к НК-клеткам

Классическая гипотеза распознавания «отсутствие своего» гласит, что НК-клетки распознают и уничтожают все клетки, в которых отсутствуют молекулы HLA I класса (Ljunggren & Kaare., 1990). Согласно этой гипотезе, ожидается, что клетки с нокаутом гена *B2M* будут обладать чувствительностью к цитотоксическим свойствам НК-клеток. Поэтому следующим этапом работы стало изучение иммуногенности производных ИПСК по отношению к НК-клеткам. Иммуногенность клеток-мишеней по отношению к НК-клеткам оценивали по экспрессии маркера CD107a. CD107a, или LAMP-1 (Lysosome-associated membrane protein-1) – гликопротеин, который содержится внутри цитотоксических везикул НК-клеток. При встрече с мишенью НК-клетка активируется и происходит дегрануляция везикул, в результате чего мембрана гранул сливается с клеточной мембраной НК-клетки, и молекулы CD107a оказываются доступными для связывания с антителами для последующего анализа методом проточной цитометрии. Данная методика, по данным

литературы, коррелирует с цитотоксичностью, опосредованной действием НК-клеток, и секрецией провоспалительных цитокинов, а также широко применяется для анализа НК-клеточной активности против опухолевых клеток (Lorenzo-Herrero *et al.*, 2019).

При анализе активности Т-клеток наблюдалась сравнительно низкая вариабельность в экспрессии маркера активации CD69, характерная для разных аллогенных доноров (Рис. 17Б). Это позволило сравнивать результаты не в пределах одного эксперимента (то есть, для одного донора), а анализировать иммуногенность клеток-мишеней на расширенной выборке. Напротив, в тесте на дегрануляцию НК-клеток наблюдались существенные различия между разными донорами в количестве CD107a⁺ НК-клеток. Для одной и той же клеточной линии процент CD107⁺ НК-клеток, выделенных из крови разных доноров, мог колебаться от 5 до 60% (Рис. 18А). Более того, значительные различия наблюдались даже в независимых экспериментах с НК-клетками одного и того же донора (Рис. 18Б).

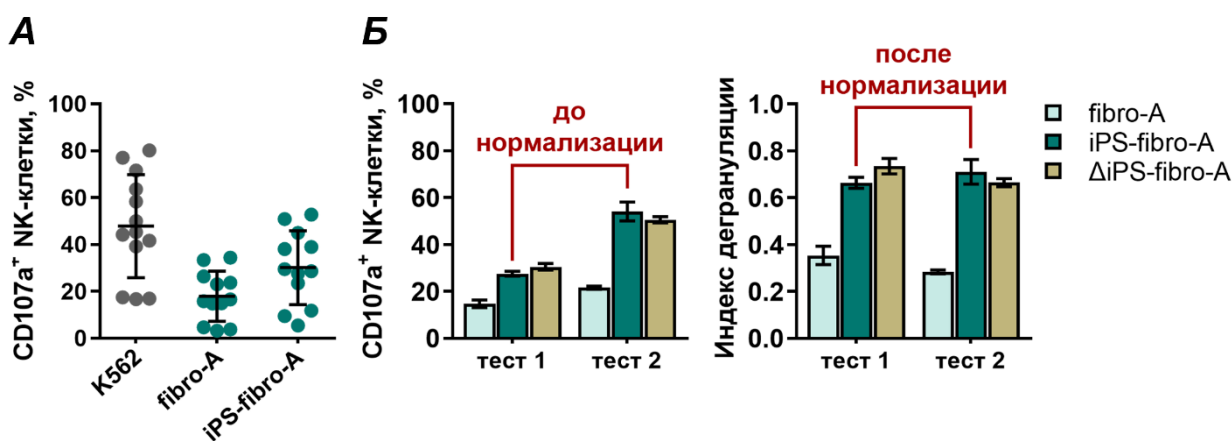


Рисунок 18. Вариабельность НК-клеточного ответа. (А) Процент CD107a⁺ НК-клеток при сокультивировании с клетками линии K562, fibro-A и iPS-fibro-A. Точки представляют собой независимые эксперименты с НК-клетками аллогенных доноров (N=12), выполненные в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± SD. (Б) Вариабельность НК-клеточного ответа одного аллогенного донора на клетки изогенной системы А до и после нормализации (введения индекса дегрануляции). Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± SEM.

Поэтому мы ввели индекс дегрануляции, который нормализует полученные результаты на количество CD107a⁺ НК-клеток, сокультивируемых с положительным контролем – клетками линии K562 (Рис. 18Б). Клетки линии K562 лишены экспрессии HLA I класса и очень часто применяются для анализа НК-клеточной активности, в связи с чем уровень дегрануляции НК-клеток на клетки линии K562 был принят за максимально возможный.

Индекс дегрануляции рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Индекс дегрануляции} = \frac{\% \text{ CD107a}^+ \text{ NK-клеток в исследуемых образцах}}{\% \text{ CD107a}^+ \text{ NK-клеток в положительном контроле}}$$

Как и ожидалось, и в аутологичной, и в аллогенной моделях активация NK-клеток против Δ iPS-fibro, лишенных молекул HLA-I, была высокой (Рис. 19А). Средний индекс дегрануляции для двух линий Δ iPS-fibro составил 0,52, т.е. более половины от максимально возможного количества дегранулировавших NK-клеток. Неожиданно мы обнаружили, что производные ИПСК дикого типа вызывали столь же высокую активацию аутологичных (Рис. 19А) и аллогенных (Рис. 19Б) NK-клеток. Между тем, мы наблюдали более низкую активность NK-клеток против исходных фибробластов по сравнению с iPS-fibro (Рис. 19А, 19Б). 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 на изогенные фибробласты кожи.

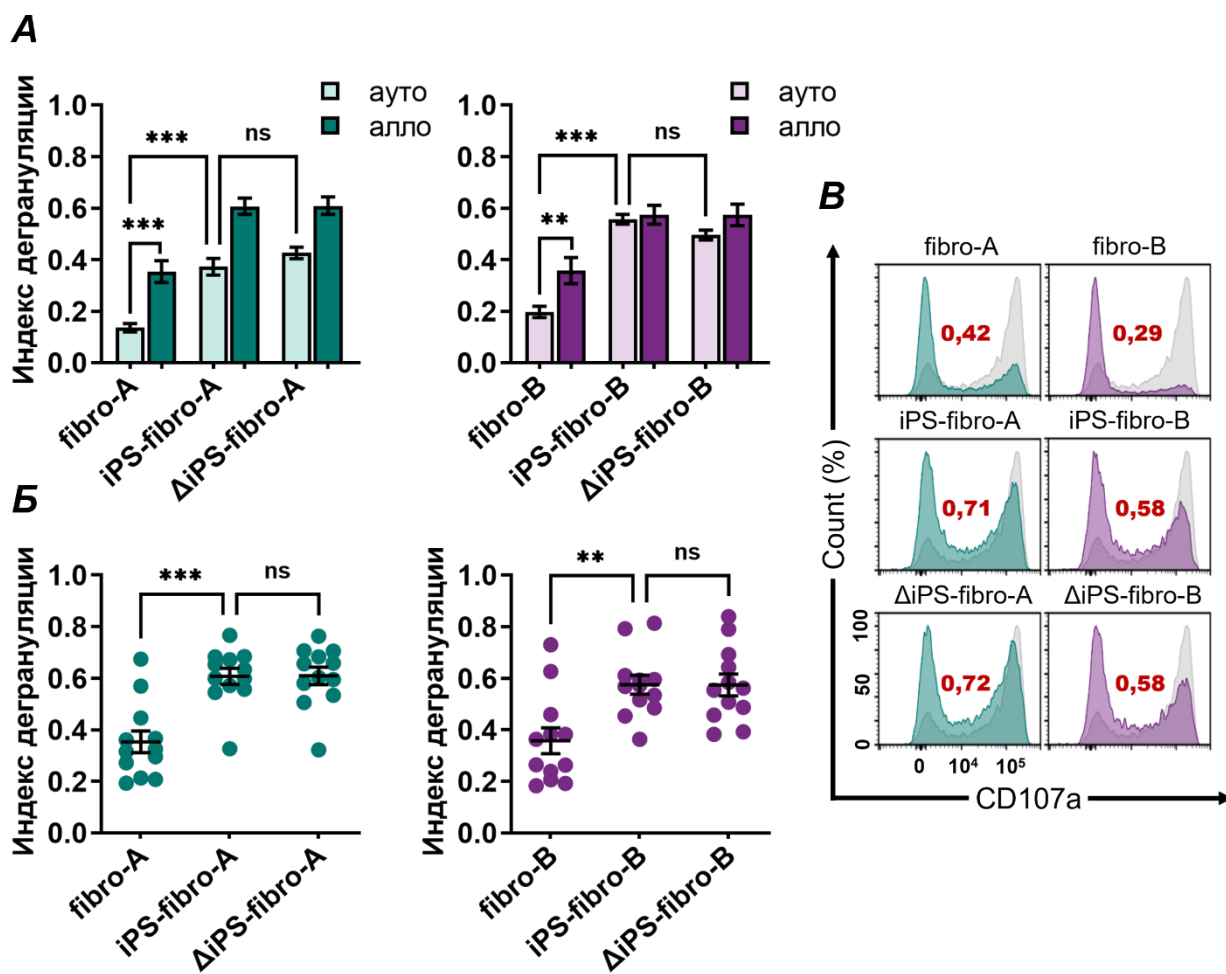


Рисунок 19. Иммуногенность производных ИПСК по отношению к NK-клеткам. (А) Сравнение степени дегрануляции аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (выделено темным) NK-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и Δ iPS-fibro. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. 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 НК-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.

Стоит отметить, что индекс дегрануляции аллогенных НК-клеток был значимо выше, чем у аутологичных НК-клеток, что может быть связано с несовпадением KIR-лигандов. Так, все аллели HLA-C делятся на группы C1 и C2 по их способности связываться с рецепторами KIR2DL3 и KIR2DL1, соответственно (Moffett & Colucci, 2015). По данным одного из исследований, НК-клетки могут отвечать на несовпадение KIR-лиганда и проявлять цитотоксическое действие вследствие распознавания отсутствия экспрессии HLA-C (Ichise *et al.*, 2015). Согласно этому исследованию, предполагается, что НК-клетки, выделенные из крови гетерозиготных доноров, относящихся к группе C1/C2, будут активироваться на клетки-мишени гаплотипов C1/C1 или C2/C2 ввиду отсутствия ингибирующего сигнала, идущего от того или иного лиганда. Также повышенный ответ НК-клеток на аллогенные фибробласты может быть обусловлен физиологическими особенностями некоторых доноров, принимавших участие в нашем исследовании, что подтверждается вариабельностью индекса дегрануляции (Рис. 19Б).

Мы также протестировали другой способ анализа иммуногенности клеток-мишеней по отношению к НК-клеткам. 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. 20). Таким образом, результаты теста на дегрануляцию согласуются с результатами цитотоксического теста.

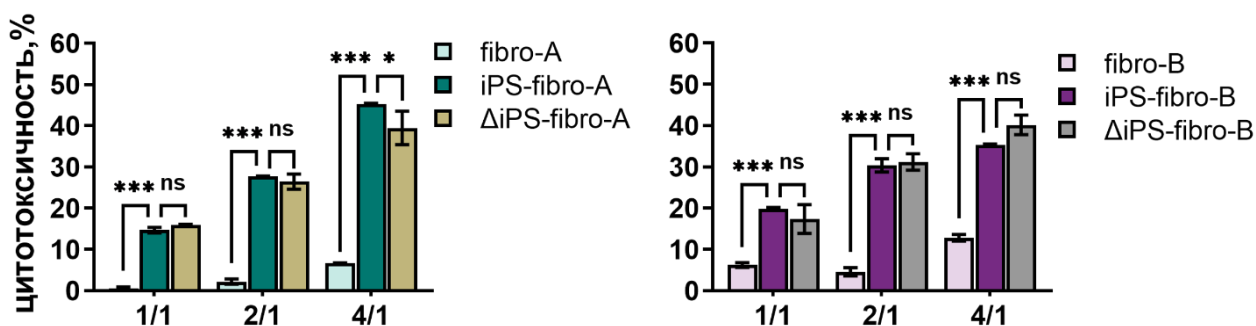


Рисунок 20. Цитотоксичность НК-клеток аллогенного донора, измеренная на разных соотношениях эффекторных/таргетных клеток, против исходных фибробластов, iPS-fibro и ΔiPS-fibro. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± SEM. *P <0.05; ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

Помимо iPS-fibro, мы также решили проанализировать ответ НК-клеток на другие типы дифференцированных производных ИПСК. Для этого клетки линии iPSC-A были дифференцированы в пигментный эпителий сетчатки (iPS-RPE), а клетки линии iPSC-B - в кардиомиоциты (iPS-CM). Мы показали, что данные типы дифференцированных производных ИПСК активируют аллогенные НК-клетки в той же степени, что и iPS-fibro (Рис. 21). Таким образом, мы продемонстрировали, что разные типы производных ИПСК чувствительны к цитотоксическим свойствам НК-клеток независимо от наличия экспрессии HLA I класса.

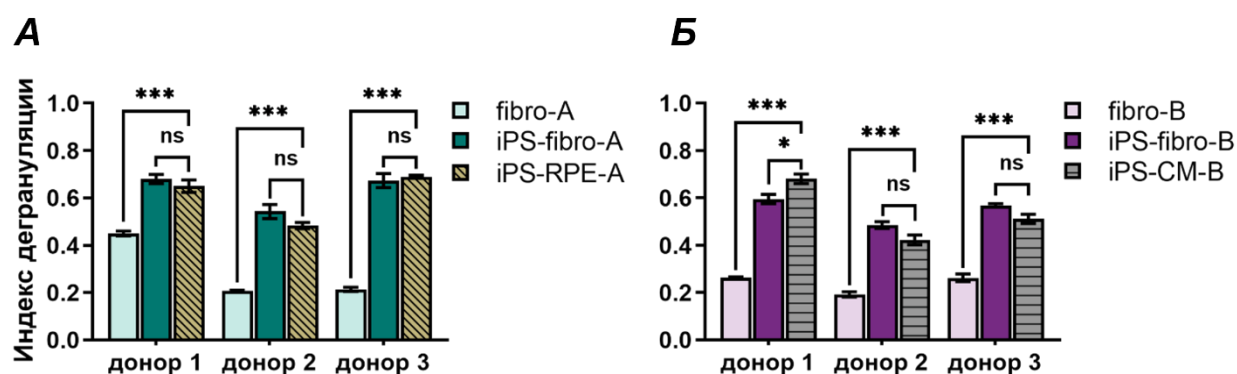


Рисунок 21. НК-клеточный ответ на исходные фибробласты и различные типы дифференцированных производных ИПСК. (А) Сравнение степени дегрануляции НК-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и iPS-RPE. Для каждого донора был проведен независимый эксперимент, выполненный в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± SEM. ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью. (Б) Сравнение степени дегрануляции НК-клеток при сокультивировании с изогенными фибробластами, iPS-fibro и iPS-CM. Для каждого донора был проведен независимый эксперимент, выполненный в трипликатах. Данные указаны как среднее значение ± SEM. *P <0.05; ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

Согласно литературным данным, активность НК-клеток против недифференцированных ПСК, в том числе и аутологических, ранее освещалась в ряде исследований (Dressel *et al.*, 2010; Kruse *et al.*, 2015; Gröschel *et al.*, 2017; Benabdallah *et al.*, 2019). При этом ответ НК-клеток на дифференцированные производные ИПСК изучен достаточно слабо. Так, сообщалось об эффекторных функциях НК-клеток против производных ИПСК мыши как в *in vitro* (Cisneros *et al.*, 2019), так в *in vivo* модели (Nakamura *et al.*, 2019). В то же время иммуногенность производные ПСК человека по отношению к

НК-клеткам изучалась главным образом в связи с созданием гипои иммуногенных линий ПСК. *A priori* эти исследования проводили на аллогенной модели. При этом некоторые авторы также не наблюдали различий в активации или цитотоксичности НК-клеток против производных ПСК дикого типа и клеток, не экспрессирующих HLA I класса. Например, такие результаты были получены на тромбоцитах (Suzuki *et al.*, 2020), ГМК кровеносных сосудов (Han *et al.*, 2019), клетках ПЭС (Petrus-Reurer *et al.*, 2020), кардиомиоцитах (Shi *et al.*, 2020), дифференцированных из ПСК. В вышеупомянутых исследованиях авторы не фокусировались на ответе НК-клеток против производных дикого типа, а скорее описали отсутствие гиперчувствительности к НК-клеткам для HLA-негативных клеток. В отличие от других авторов, мы использовали исходные фибробласты в качестве отрицательного контроля реакции НК-клеток. Это сравнение позволило нам обнаружить, что нокаутные производные ИПСК не отличаются от клеток дикого типа по чувствительности к действию НК-клеток не за счет низкого ответа НК-клеток на Δ iPS-fibro, а наоборот, за счет увеличенной дегрануляции НК-клеток против клеток дикого типа.

3.4. Профилирование экспрессии генов НК-клеточных лигандов в производных ИПСК

Известно, что НК-клеточный ответ регулируется балансом сигналов, поступающих от активирующих и ингибирующих рецепторов (Lanier, 2005). К запуску цитотоксической программы натуральных киллеров может привести как повышение сигналов, идущих от активирующих рецепторов, так и снижение сигналов, поступающих от ингибирующих рецепторов. Иными словами, правильный баланс между ингибирующими и активирующими лигандами может сделать клетку-мишень невидимой для НК-клеток (Pegram *et al.*, 2011), тогда как нарушенный баланс лигандов НК-клеток в iPS-fibro может быть причиной чрезмерной активации НК-клеток. В свою очередь манипуляция интенсивностью сигналов, поступающих от активирующих рецепторов НК-клеток, должна снижать иммунный ответ по отношению к клеткам-мишеням. Мы продемонстрировали, что блокирование некоторых активирующих рецепторов НК-клеток, таких как NKG2D и DNAM-1, уменьшает дегрануляцию НК-клеток как против iPS-fibro дикого типа, так и против производных ИПСК с инактивацией гена *B2M* (Рис. 22). В этой связи мы предположили, что неправильный баланс лигандов основных НК-клеточных рецепторов является причиной чувствительности производных ИПСК к эффекторным функциям НК-клеток.

Чтобы проверить вышеупомянутую гипотезу, 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

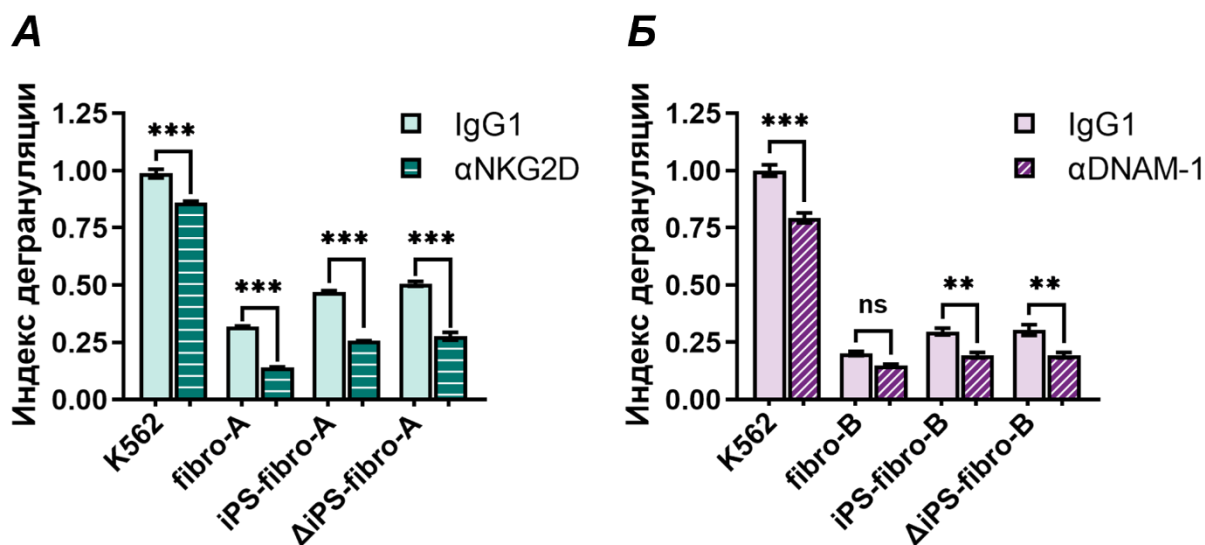


Рисунок 22. Блокирование ключевых активирующих рецепторов NK-клеток сокращает избыточную дегрануляцию против дифференцированных производных ИПСК. (А) Индекс дегрануляции NK-клеток, инкубированных с изотипическим контролем (IgG1) или антителами, блокирующими рецептор NKG2D (α NKG2D) в концентрации 10 мкг/мл (Б) Индекс дегрануляции NK-клеток, инкубированных с изотипическим контролем (IgG1) или антителами, блокирующими рецептор DNAM-1 (α DNAM-1) в концентрации 10 мкг/мл. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение \pm SEM. **P < 0.01; ***P < 0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

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. Сперва, используя данные секвенирования РНК одиночных клеток (Neavin *et al.*, 2021), мы идентифицировали ключевые маркеры фибробластов и ключевые маркеры недифференцированных клеток. Затем 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 (Ma *et al.*, 2015; Sacchiarelli *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016). Анализ данных РНК-секвенирования показал, что фибробласты кожи и iPS-fibro экспрессируют ключевые маркеры фибробластов, тогда как ИПСК иерархически кластеризуются по ключевым маркерам, характерным для недифференцированных клеток (Рис. 23).

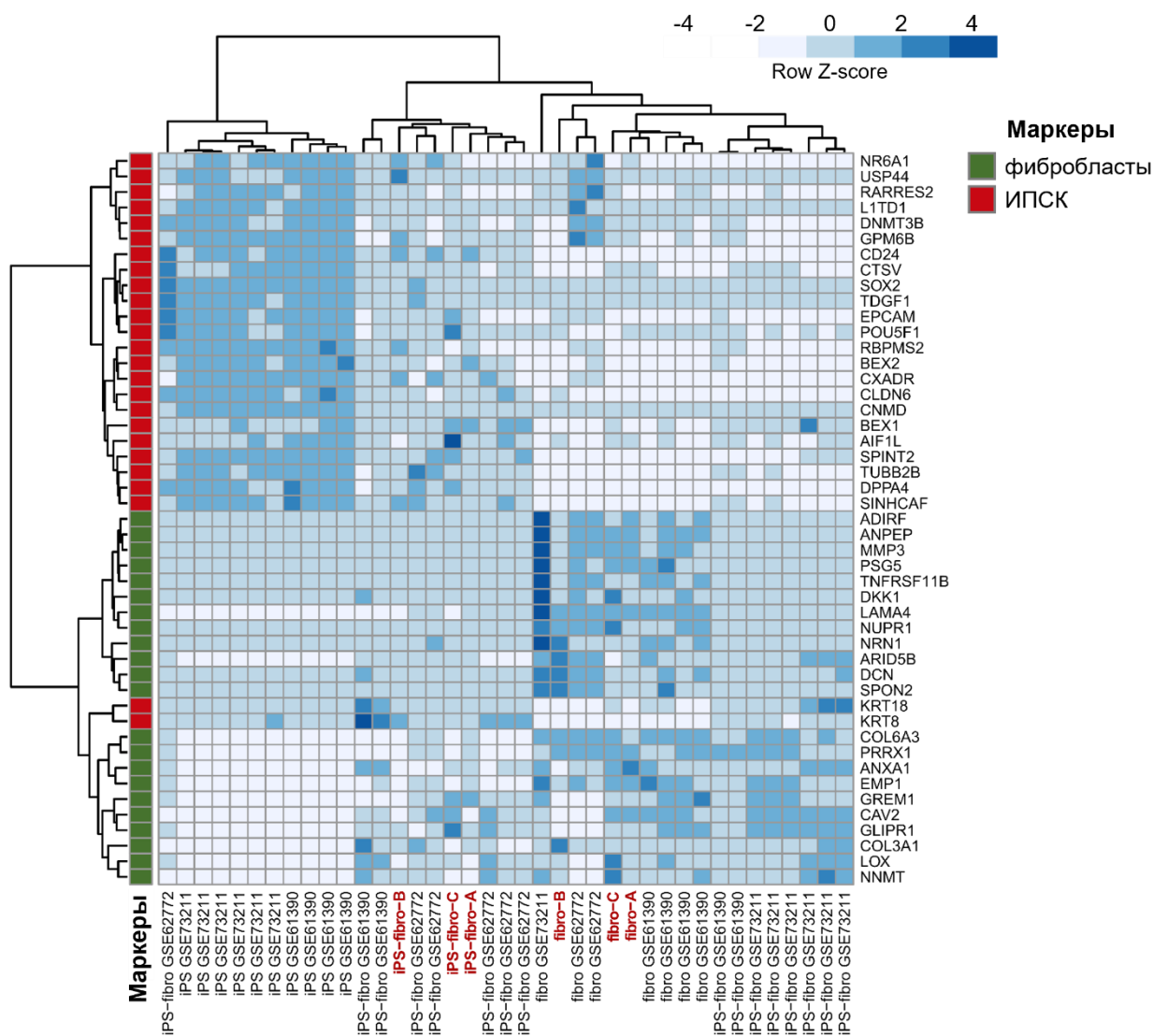


Рисунок 23. Иерархическая тепловая карта, иллюстрирующая экспрессию ключевых маркеров фибробластов (отмечены зеленым) и ИПСК (отмечены красным) в фибробластах кожи, iPS-fibro и недифференцированных ИПСК. Уровень экспрессии в TPM (transcripts-per-million) для каждого гена был нормализован с помощью row Z-score. Образцы, полученные в нашей лаборатории, отмечены красным.

Далее мы определили уровень корреляции между исследуемыми образцами. Анализ данных РНК-секвенирования показал, что iPS-fibro и Δ iPS-fibro по транскрипционному профилю были схожи с первичными фибробластами кожи человека (Рис. 24). 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.

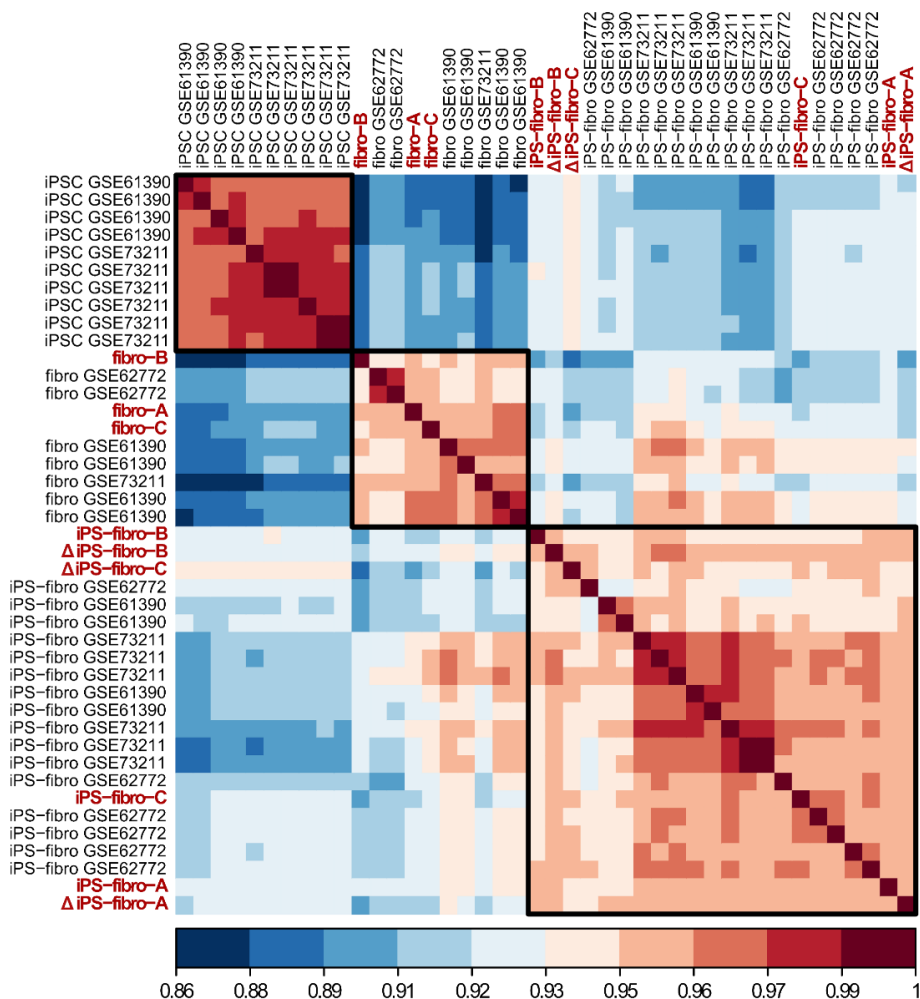


Рисунок 24. Корреляционный анализ (метод корреляции по Пирсону), определяющий степень сходства между фибробластами человека, ИПСК и фибробластоподобными производными ИПСК. Образцы, полученные в нашей лаборатории, отмечены красным.

Определив степень корреляции с независимо дифференцированными производными ИПСК, мы перешли к поиску дифференциально экспрессированных генов в iPS-fibro по сравнению с исходными фибробластами. Статистически значимые ($FDR < 0.05$) изменения были обнаружены в экспрессии более чем трёх тысяч генов (Рис. 25А). Транскриптомный анализ показал, что экспрессия 1670 генов в iPS-fibro оказалась сниженной. При этом среди них было 13 генов, которые кодируют лиганды рецепторов НК-клеток или других молекул, необходимых для активации НК-клеток (согласно GO:0030101). Аналогично, экспрессия 1597 генов была повышена в iPS-fibro, и 12 из них кодируют лиганды НК-клеточных рецепторов или другие молекулы, необходимые для активации НК-клеток (Рис. 25А). В свою очередь, статистически значимые различия ($FDR < 0.05$) практически не были обнаружены между нокаутными Δ iPS-fibro и iPS-fibro дикого типа. Суммарно изменения

затронули только 13 генов (Приложение 2), один из которых – инактивированный ген *B2M* (Рис. 25Б). В дополнение мы провели анализ функционального обогащения набора генов (Gene Ontology) в iPS-fibro по сравнению с исходными фибробластами (Рис. 25В). Было показано, что в iPS-fibro значительно подавлена экспрессия нескольких иммунологических путей, включая иммунный ответ (immune response), иммунные эффекторные процессы (immune effector process) и воспалительный ответ (inflammatory response).

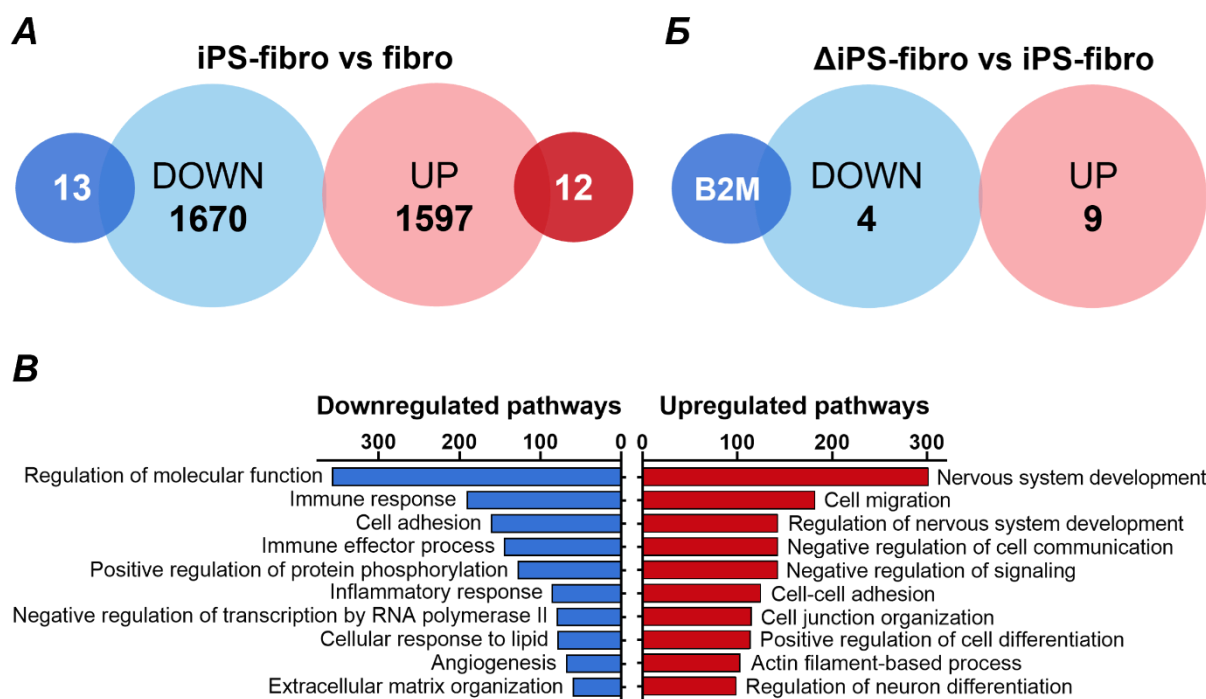


Рисунок 25. Дифференциально экспрессируемые гены в iPS-fibro. (А) Количество дифференциально экспрессируемых генов в iPS-fibro при уровне изменения экспрессии (fold change)>1,5 (FDR <0,05). Темные круги отражают количество дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих лиганды НК-клеточных рецепторов или молекул, необходимых для активации НК-клеток (согласно GO:0030101). (Б) Количество дифференциально экспрессируемых генов в ΔiPS-fibro при уровне изменения экспрессии (fold change)>1,5 (FDR <0,05). (В) Анализ функционального обогащения дифференциально-экспрессируемых генов (Gene Ontology) в iPS-fibro по сравнению с исходными фибробластами.

Далее был определен паттерн экспрессии НК-клеточных лигандов. Поскольку в иммунологических тестах исходные фибробласты не нарушали анергию аутологичных НК-клеток, их паттерн экспрессии был принят за «золотой стандарт». Многие гены, кодирующие лиганды ингибирующих и активирующих рецепторов НК-клеток, оказались дифференциально экспрессируемыми в производных ИПСК по сравнению с исходными фибробластами (Рис. 26А). Наряду с этим, наблюдалась согласованность в экспрессии лигандов рецепторов НК-клеток между iPS-fibro и ΔiPS-fibro (Рис. 26Б). Эти результаты

свидетельствуют о том, что инактивация гена *B2M* не влияет на сигнальные пути, связанные с регуляцией иммунного ответа НК-клеток.

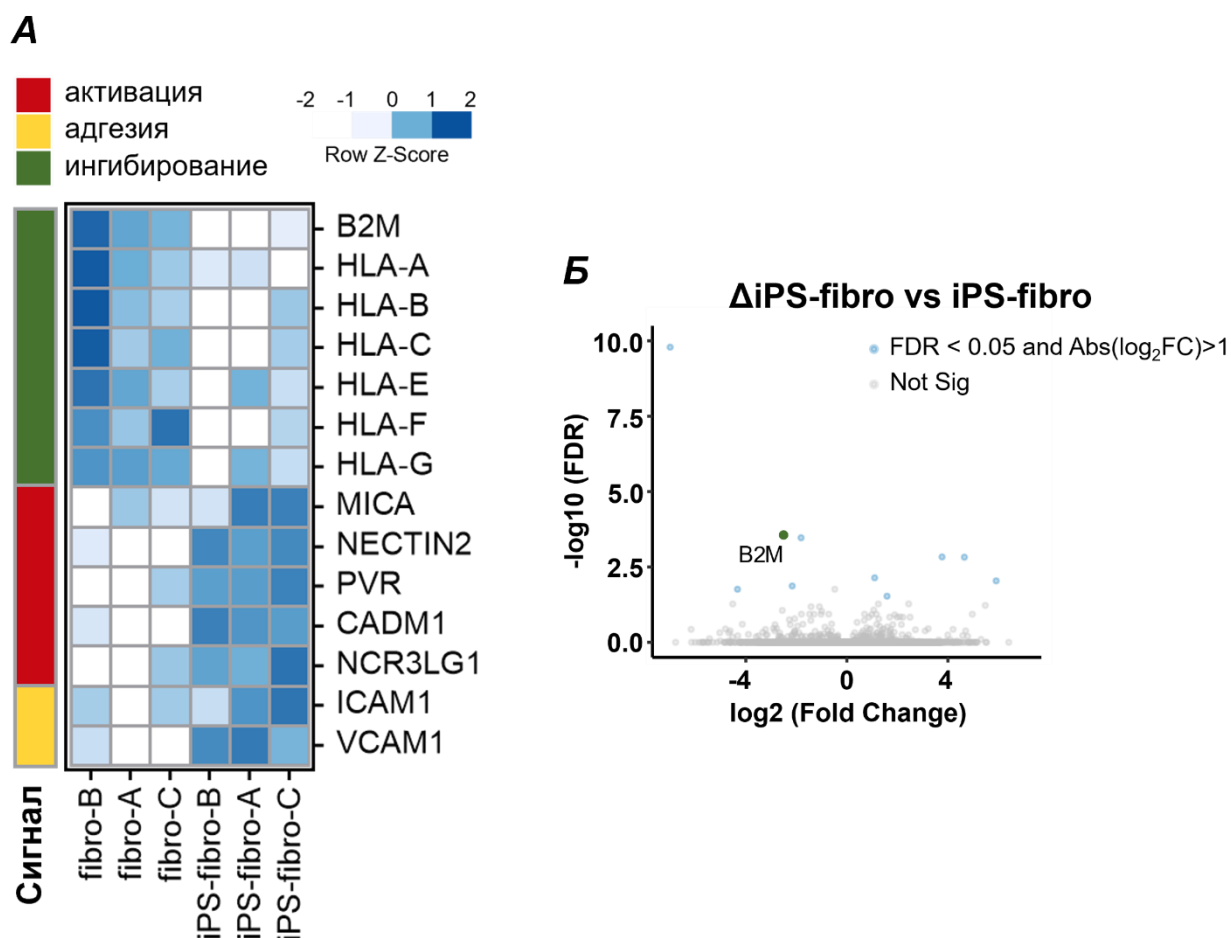


Рисунок 26. Анализ экспрессии основных НК-клеточных лигандов в фибробластах кожи и iPS-fibro. (А) Тепловая карта, демонстрирующая профиль экспрессии основных ингибирующих и активирующих НК-клеточных лигандов, а также некоторых молекул адгезии в исходных фибробластах и iPS-fibro. Уровень экспрессии в числе транскриптов на миллион картированных прочтений TPM для каждого гена был нормализован с помощью row Z-score. (Б) Точечная диаграмма, демонстрирующая дифференциально экспрессируемые гены в ΔiPS-fibro (выделены голубым).

Молекулы HLA I класса служат лигандами для двух основных классов ингибирующих рецепторов НК-клеток: семейства KIR (Killer-cell immunoglobulin-like receptors) и гетеродимера CD94-NKG2A. Это взаимодействие лежит в основе молекулярного принципа распознавания “отсутствие своего”. По сравнению с исходными фибробластами, экспрессия всех классических транскриптов HLA I класса (*HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*) была более чем в два раза понижена в iPS-fibro (Рис. 26А). Аналогично была подавлена экспрессия гена *B2M*, легкой цепи молекул HLA I класса, который обычно коррелирует с экспрессией гетеродимера HLA-I. Данные РНК-секвенирования для генов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* и *B2M* были подтверждены с помощью кПЦР (Рис. 27).

Примечательно, что различия между fibro-B и iPS-fibro-B были более выраженными, чем для двух других изогенных систем (доноров А и С). Это явление может быть объяснено сравнительно более высокой экспрессией молекул HLA-I для fibro-B, либо быть донор-специфичным признаком.

Лиганды основных ингибирующих рецепторов НК-клеток

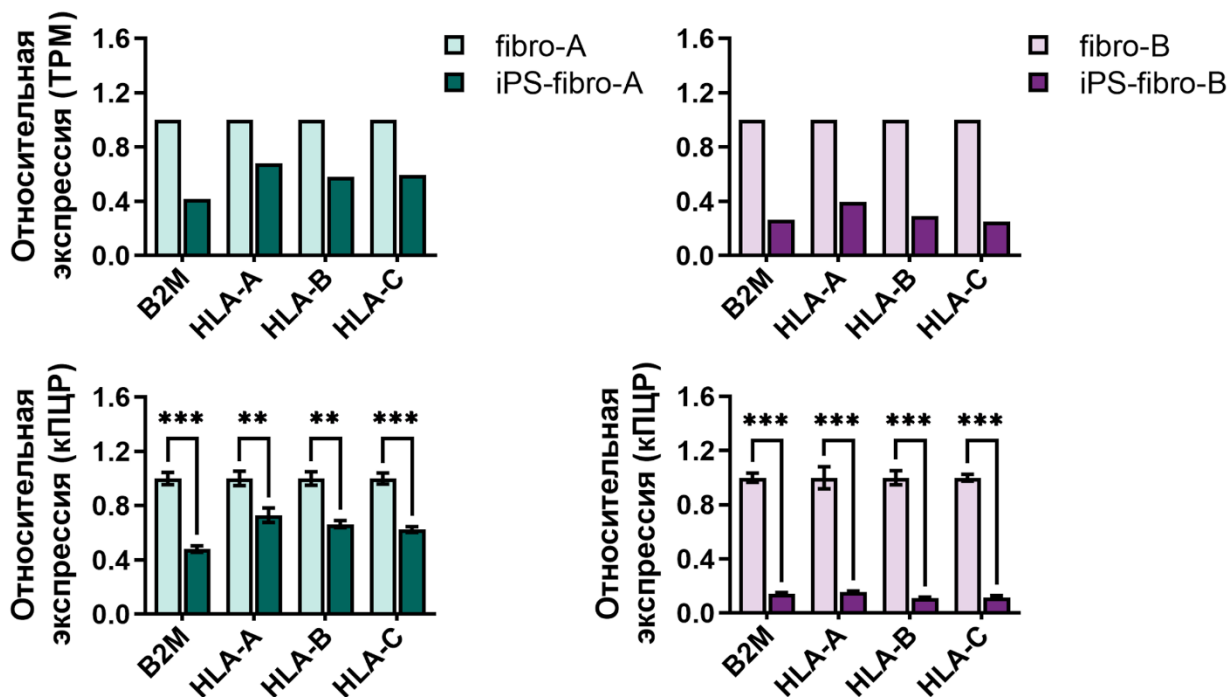


Рисунок 27. Сравнение относительного уровня экспрессии генов лигандов к основным ингибирующим рецепторам НК-клеток: данные РНК секвенирования (в TPM) расположены сверху, данные кПЦР – снизу. Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов. 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.

Уровень неклассических транскриптов HLA I класса также был снижен в iPS-fibro (Рис. 26А). К неклассическим молекулам HLA-I относятся HLA-E, HLA-G и HLA-F, которые обладают иммуномодулирующими свойствами по отношению к НК-клеткам. Соответственно, снижение их экспрессии также может способствовать проявлению цитотоксических функций НК-клеток. В дополнение был проанализирован паттерн экспрессии лигандов к минорным ингибирующим рецепторам НК-клеток (таких как PD-1, NKRP1A, CEACAM1, CD96, TIGIT, KLRG1 и TIM-3), среди которых не было обнаружено дифференциально экспрессируемых генов. Таким образом, относительно низкий уровень молекул HLA I класса в iPS-fibro ведет к дефициту ингибирующих сигналов, которые склоняют «чашу весов» в сторону активации цитотоксической программы НК-клеток.

Между тем, почти половина генов, кодирующих ключевые лиганды активирующих рецепторов НК-клеток, оказались выше экспрессированными в iPS-fibro (Рис. 26А). Гены с повышенной экспрессией относятся к лигандам основных активирующих рецепторов НК-клеток: NKG2D, DNAM-1 и NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors). Так, по сравнению с исходными фибробластами, экспрессия стресс-индуцированного гена *MICA* (лиганд NKG2D) была более чем в 1,5 раза выше в iPS-fibro. Лиганды DNAM-1, *NECTIN2* (CD112) и *PVR* (CD155), а также лиганд НКp30, *NCR3LG1* (B7-H6), были повышены более, чем в 3 раза в iPS-fibro. Данные РНК-секвенирования для генов *MICA*, *ULBP1*, *NECTIN2* и *PVR* были подтверждены с помощью кПЦР (Рис. 28). Наконец, экспрессия некоторых генов, таких как *CADMI* (лиганд CRTAM) и *CD70* (лиганд CD27), была обнаружена только в дифференцированных производных ИПСК, но не была детектирована в исходных фибробластах.

Лиганды основных активирующих рецепторов НК-клеток

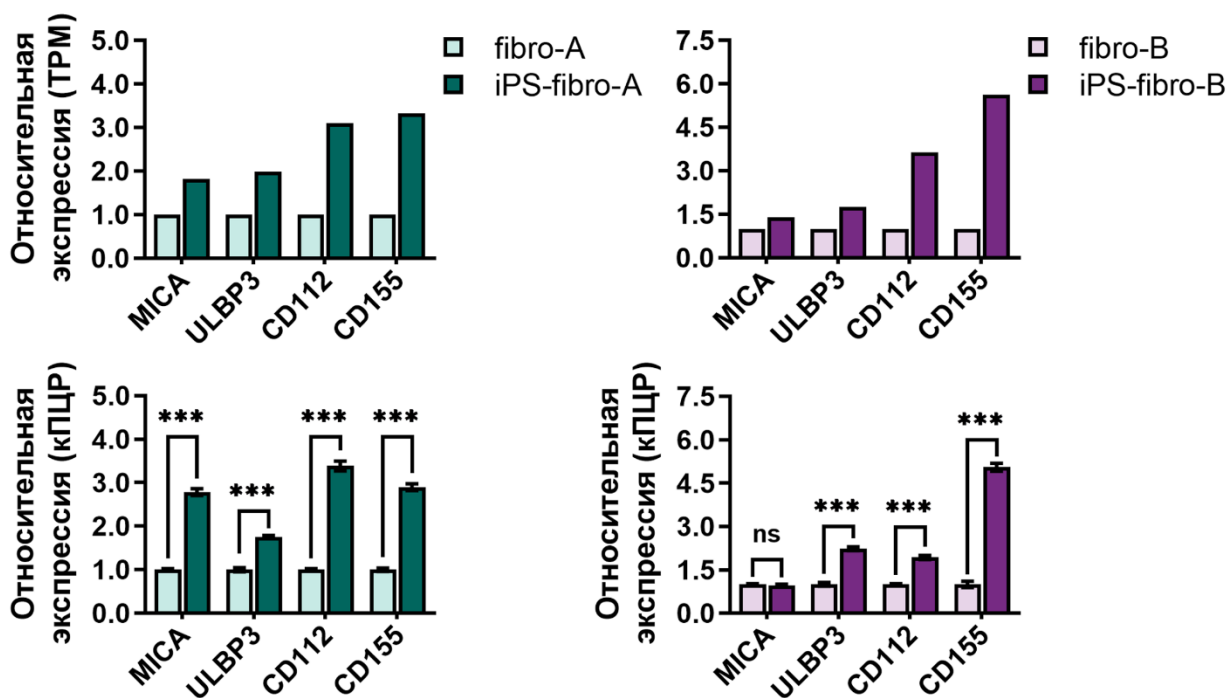


Рисунок 28. Сравнение относительного уровня экспрессии генов лигандов к основным активирующим рецепторам НК-клеток: данные РНК секвенирования (в TPM) расположены сверху, данные кПЦР – снизу. Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов. 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.

Стоит отметить, что дисбаланс в экспрессии лигандов для некоторых активирующих рецепторов НК-клеток также наблюдался в общедоступных наборах данных РНК-секвенирования. В частности, экспрессия генов *NECTIN2*, *PVR*, *CADMI* и *CD70* была

повышена в независимо полученных фибробластоподобных клетках. В связи с высоким уровнем корреляции между нашими iPS-fibro, включая ΔiPS-fibro, и сторонними фибробластоподобными производными ИПСК, мы предполагаем, что несовершенное микроокружение во время *in vitro* дифференцировки может влиять на правильный баланс НК-клеточных лигандов в данном типе производных ИПСК. Поскольку каждый тип клеток экспрессирует свой собственный набор белков, для применения в клинической практике необходимо будет определять паттерн экспрессии лигандов рецепторов НК-клеток.

В дополнение была проанализирована экспрессия основных молекул адгезии. Взаимодействие молекул адгезии с соответствующими рецепторами на поверхности НК-клеток способствует образованию плотных клеточных контактов между НК-клеткой и клеткой-мишенью, что приводит к формированию иммунологических синапсов, которые необходимы для проявления цитотоксических функций НК-клеток (Netter *et al.*, 2017). Гены *ICAM-1* (лиганд LFA-1) и *VCAM-1* (лиганд VLA-4, или интегрин $\alpha 4\beta 1$) были повышены в производных ИПСК (Рис. 26А). Такой же паттерн экспрессии наблюдался в общедоступных наборах РНК-секвенирования. В свою очередь, повышенная экспрессия молекул адгезии может также способствовать повышенной цитотоксичности, опосредованной НК-клетками, в отношении дифференцированных производных ИПСК.

Таким образом, одновременно несколько факторов являлись причиной повышенного НК-клеточного ответа на iPS-fibro. Во-первых, относительно низкая экспрессия генов молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов, в iPS-fibro. Во-вторых, повышенная экспрессия генов лигандов основных активирующих рецепторов НК-клеток. В-третьих, повышенная экспрессия некоторых молекул адгезии. Тем самым, в iPS-fibro наблюдалась одновременно низкая интенсивность ингибирующих сигналов и повышенная интенсивность активирующих сигналов.

3.5. Возможная причина дисбаланса НК-клеточных лигандов в iPS-fibro

Возможной причиной нарушения баланса лигандов НК-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.

Мы оценили экспрессию HLA-ABC и B2M в исходных фибробластах и iPS-fibro на разных пассажах. iPS-fibro на ранних пассажах сохраняли относительно низкую экспрессию молекул HLA I класса, что типично для недифференцированных клеток (Рис. 29). При этом наиболее выраженная 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. 29). Рост экспрессии HLA-I по мере созревания также наблюдался в клетках ПЭС, дифференцированных из ЭСК (Petrus-Reuter *et al.*, 2020).

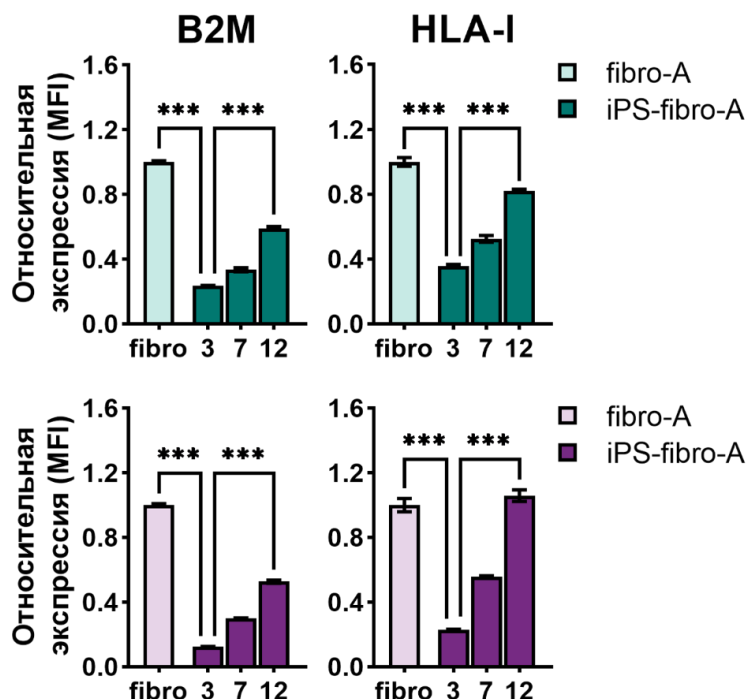


Рисунок 29. Анализ экспрессии молекул B2M и HLA-I в исходных фибробластах и iPS-fibro на разных пассажах. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение \pm SEM. ***P < 0.001. Экспрессия нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов.

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. 30). И «молодые», и более «зрелые» iPS-fibro активировали сходный процент NK-клеток.

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. 31). В более «зрелых» производных ИПСК также сохранялась повышенная экспрессия лигандов к NKG2D и DNAM-1 рецепторам (Рис. 31).

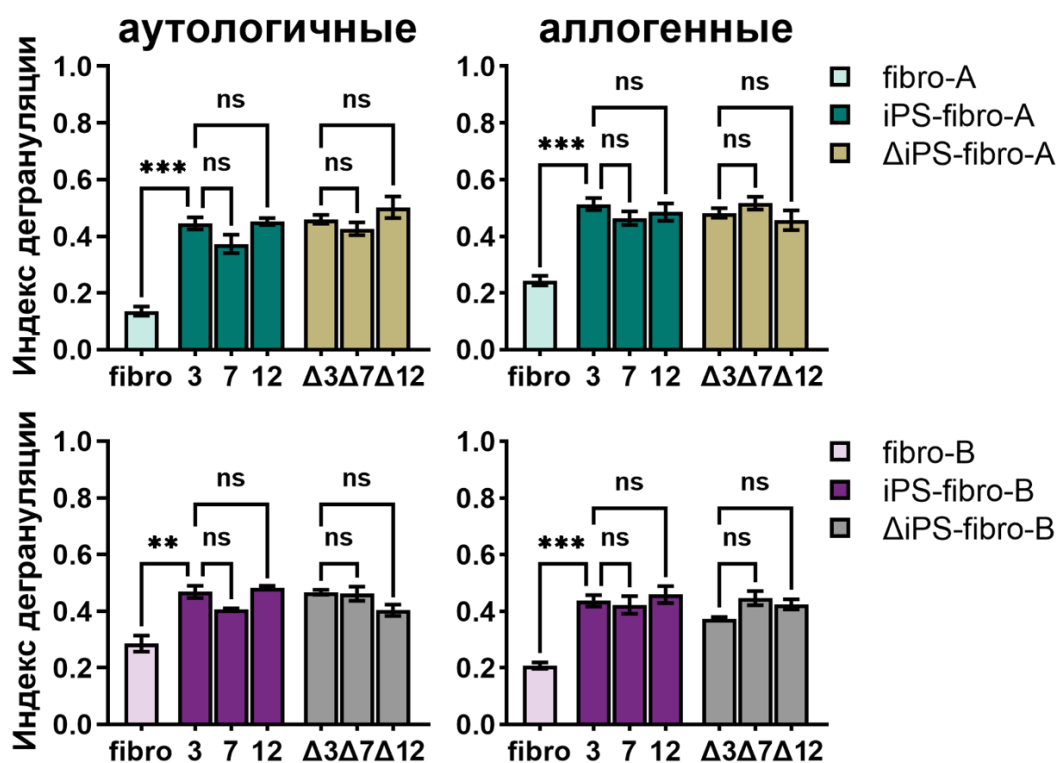


Рисунок 30. Дегрануляция аутологичных и аллогенных (N=9) NK-клеток при сокультивировании с iPS-fibro на разных пассажах. Каждый независимый эксперимент выполнен в трипликатах. Данные указаны как среднее значение \pm SEM. **P < 0.01; ***P < 0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

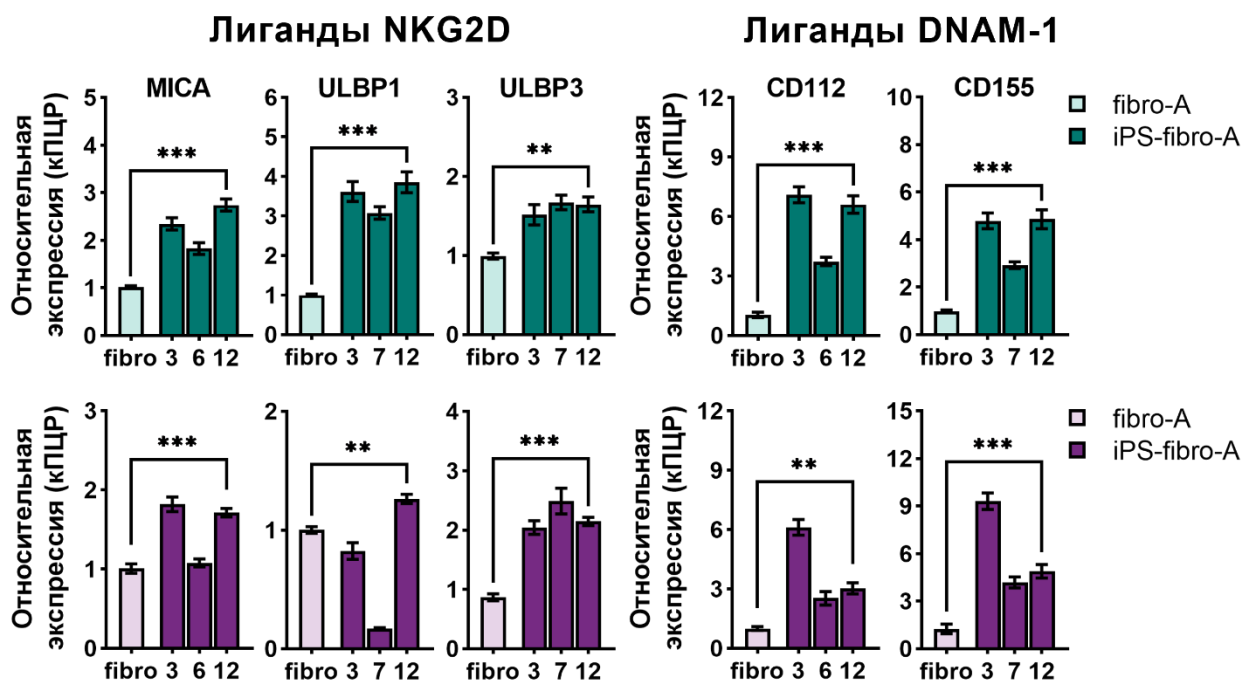


Рисунок 31. Анализ экспрессии лигандов к основным активирующим рецепторам NK-клеток в исходных фибробластах и iPS-fibro на разных пассажах. Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов. Каждый независимый эксперимент (N=3) выполнен в

трипликатах. Данные указаны как среднее значение \pm SEM. **P <0.01, ***P <0.001, ns – not significant: различия, не обладающие статистической значимостью.

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.

3.6. 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. И хотя восполнение дефицита ингибирующих лигандов в более «зрелых» производных ИПСК не влияло на степень НК-клеточного ответа, мы предполагаем, что более существенное усиление ингибирующих сигналов должно снизить активацию и цитотоксичность НК-клеток, то есть привести баланс НК-клеточных лигандов в равновесное состояние. Поэтому на следующем этапе работы мы проанализировали, возможно ли искусственно скорректировать количество ингибирующих сигналов, идущих от iPS-fibro.

IFN γ является важным провоспалительным цитокином, который вырабатывается в основном активированными Т-клетками и НК-клетками и оказывает комплексное воздействие на иммунные и неиммунные клетки, в том числе и при трансплантации органов и тканей (Hidalgo & Halloran, 2002). Уникальной особенностью это цитокина считается его способность усиливать экспрессию HLA I класса (Drukker *et al.*, 2002). В связи с важной биологической ролью IFN γ , он 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 B2M и HLA-I как на уровне мРНК, так и на уровне белка (Рис. 32). Мы наблюдали более чем двукратное увеличение экспрессии B2M и HLA-I в исходных фибробластах, и более чем пятикратное увеличение в iPS-fibro (Рис. 32). При этом, стоит отметить, при анализе транскриптомных данных мы не выявили статистических различий в экспрессии гена рецептора IFN γ (*IFNRI*) между исходными фибробластами и производными ИПСК. Дополнительно мы также показали, что стимуляция IFN γ не влияет на экспрессию HLA-I в нокаутных Δ iPS-fibro (Рис. 33).

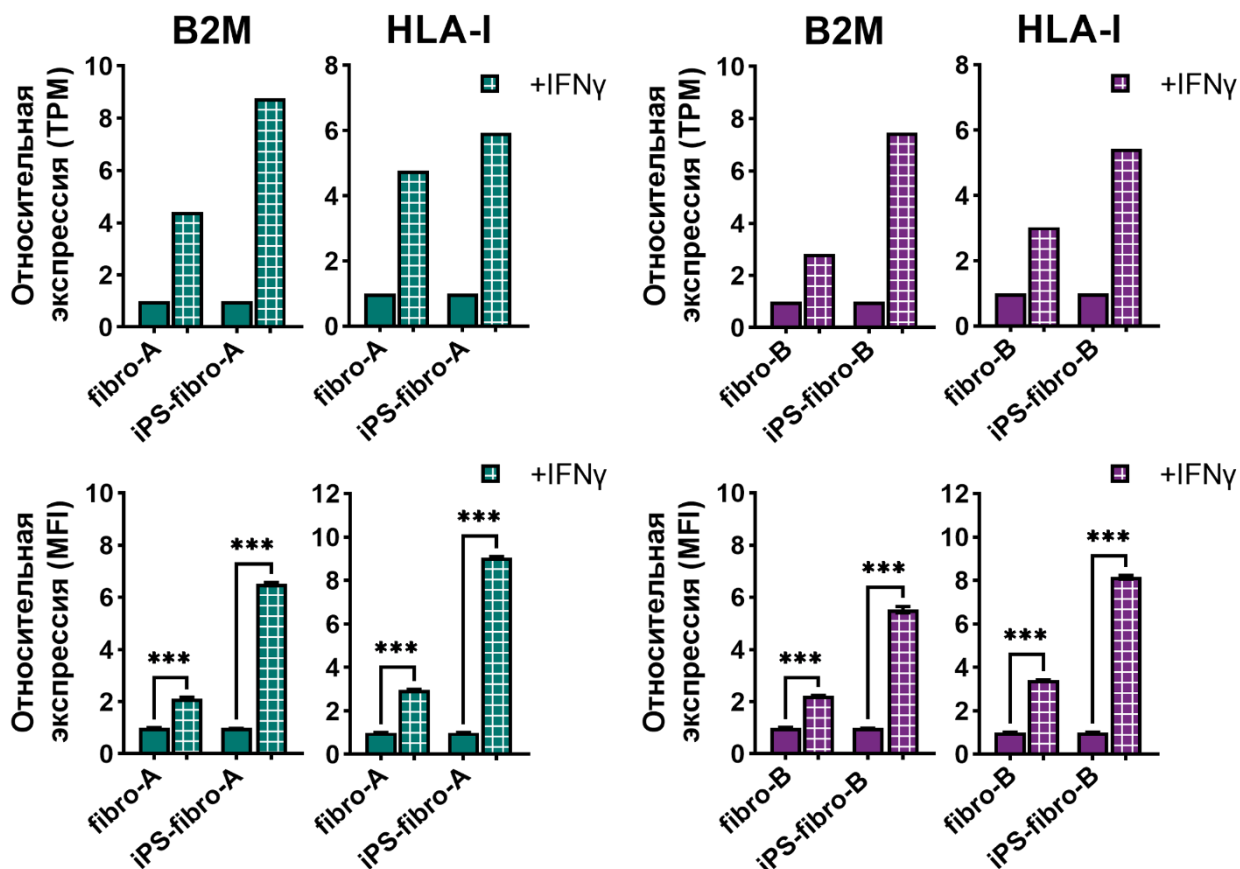


Рисунок 32. Сравнение относительного уровня экспрессии B2M и HLA I класса после обработки клеток IFN γ : данные РНК секвенирования (в TPM) расположены сверху, данные проточной цитометрии – снизу. Экспрессия всех анализируемых генов в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных интактных 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.

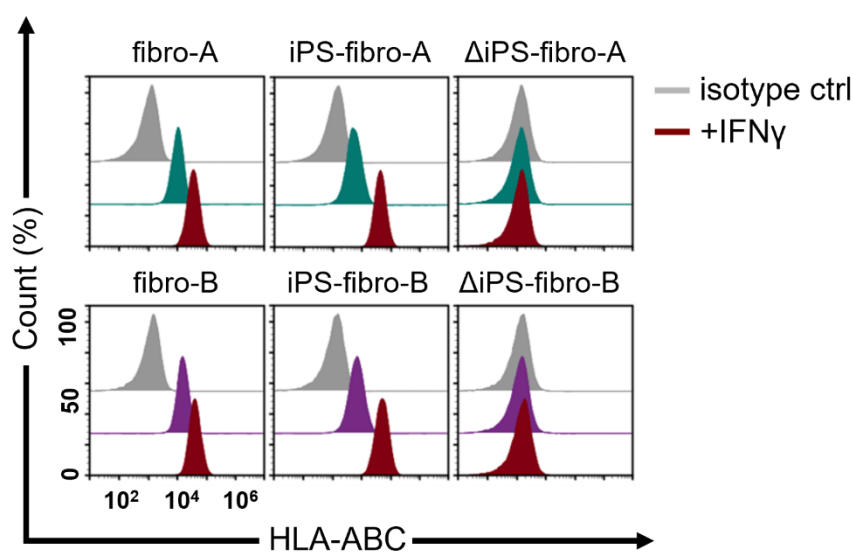


Рисунок 33. Анализ экспрессии HLA-ABC в исходных фибробластах, iPS-fibro дикого типа и нокаутных Δ iPS-fibro. Образцы, предварительно обработанные IFN γ , отмечены темно-красным цветом. Изотипический контроль отмечен серым.

Стоит отметить, что после стимуляции $IFN\gamma$ экспрессия HLA-ABC в iPS-fibro более чем в 3,5 раза превышала значение, характерное для исходных фибробластов (Рис. 34). В то же время в ходе длительного культивирования iPS-fibro 12 пассажа только достигали этого уровня.

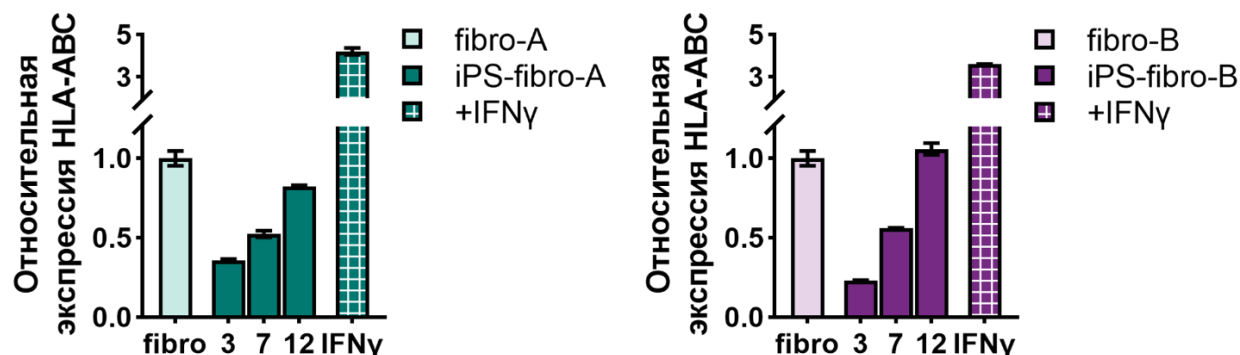


Рисунок 34. Сравнение уровня экспрессии HLA I класса в процессе пассирования iPS-fibro и после обработки клеток $IFN\gamma$. Экспрессия HLA-I в iPS-fibro нормализована на уровень, характерный для изогенных интактных исходных фибробластов. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Данные указаны как среднее значение \pm SEM.

Мы также провели профилирование экспрессии генов после стимуляции $IFN\gamma$ (Рис. 35). Мы показали, что помимо молекул главного комплекса гистосовместимости, $IFN\gamma$ также увеличивает экспрессию генов минорных ингибирующих лигандов НК-клеток, в частности *CEACAM1* и *LGALS9*, а также других молекул, способных оказывать ингибирующее действие на НК-клетки, таких как CD274, или PD-L1 (Oyer *et al.*, 2018) и IDO (Park *et al.*, 2019).

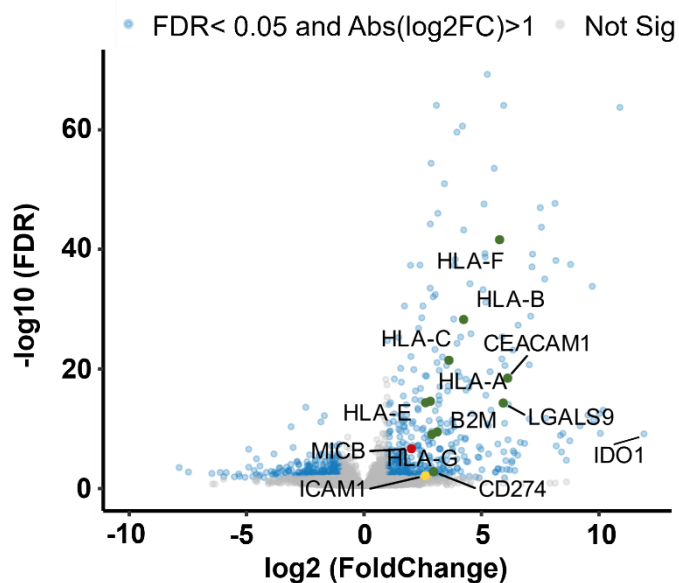


Рисунок 35. Точечная диаграмма, демонстрирующая дифференциально экспрессируемые гены в iPS-fibro после обработки клеток $IFN\gamma$. Гены, кодирующие лиганды ингибирующих НК-клеточных рецепторов, обозначены зеленым цветом; гены, кодирующие лиганды

активирующих НК-клеточных рецепторов, обозначены красным цветом; молекулы адгезии обозначены желтым. Серым цветом обозначены гены, не изменившие экспрессию после обработки $IFN\gamma$.

Между тем, $IFN\gamma$ 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. 35). В совокупности, полученные результаты показывают, что $IFN\gamma$ является значительно более эффективным стимулом для корректировки баланса НК-клеточных лигандов, чем длительное культивирование.

Далее мы оценили, как влияет обработка $IFN\gamma$ на НК-клеточный ответ. Мы показали, что степень дегрануляции аутологичных и аллогенных НК-клеток против производных ИПСК сократилась примерно вдвое после их предварительной стимуляции $IFN\gamma$ (Рис. 36А). Более того, не только интенсивность дегрануляции, но и цитотоксичность НК-клеток против стимулированных iPS-fibro снижалась практически до значений, характерных для исходных фибробластов (Рис. 36Б). Напротив, $IFN\gamma$ не влиял на степень иммунного ответа НК-клеток при их сокультивировании с Δ iPS-fibro. Как индекс дегрануляции (Рис. 36А), так и цитотоксичность (Рис. 36Б) оставались на уровне, сопоставимом с необработанными образцами.

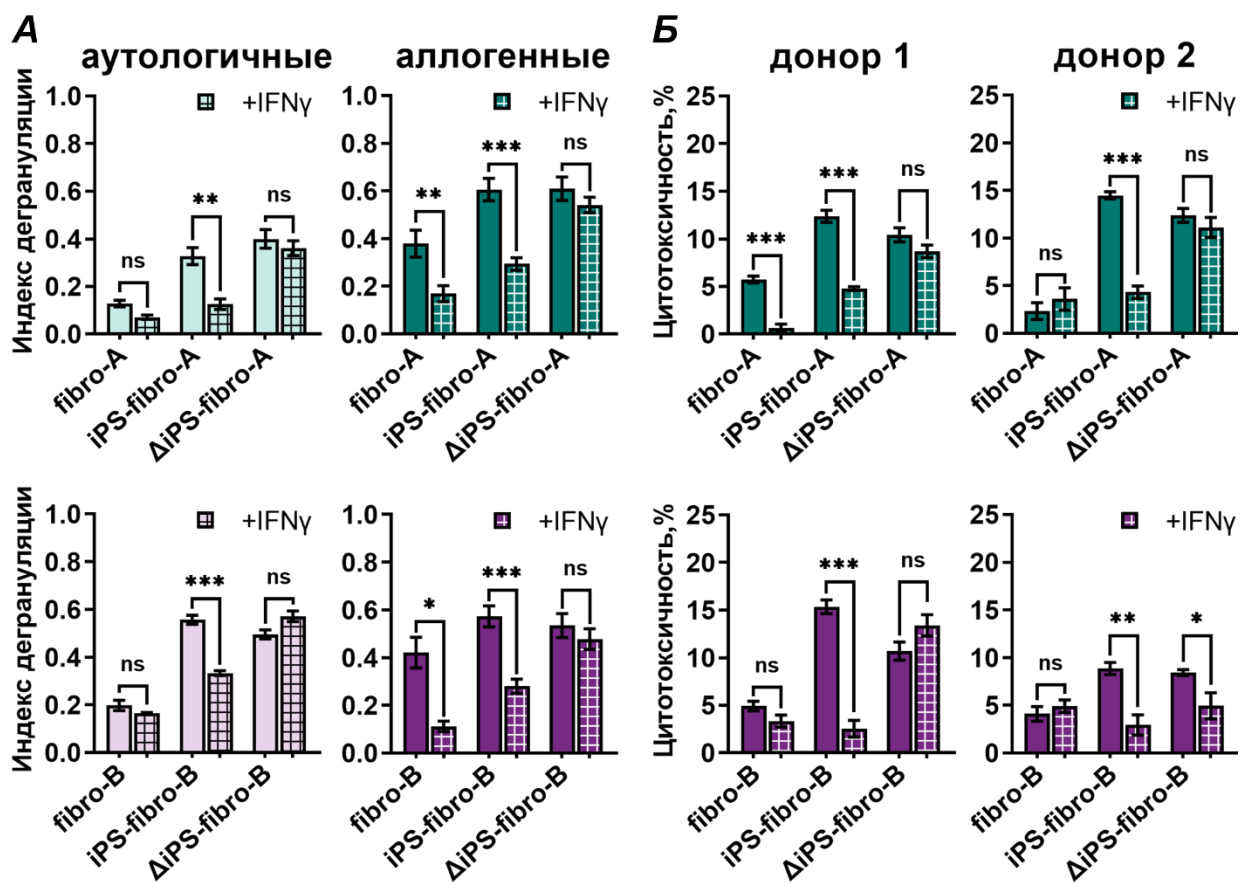


Рисунок 36. Предварительная обработка iPS-fibro $IFN\gamma$ снижает уровень дегрануляции и

цитотоксичность NK-клеток. (А) Дегрануляция аутологичных (выделено светлым) и аллогенных (N=7, выделено темным) NK-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 NK-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 NK-клеток на исходные фибробласты (Рис. 36А), что является свидетельством «правильного» баланса NK-клеточных лигандов в соматических клетках. Между тем аллогенные NK-клетки в значительной степени снижали степень дегрануляции против стимулированных фибробластов. В то же время снижение цитотоксичности наблюдалось только при сокультивировании fibro-A с NK-клетками донора 1 (Рис. 36Б). Несколько повышенный ответ NK-клеток в аллогенной модели и его модуляция с помощью IFN γ могут быть связаны как с физиологическим состоянием некоторых доноров NK-клеток, принимавших участие в нашем исследовании, так и с несовпадением KIR-лигандов, что уже упоминалось ранее.

Таким образом, мы показали, что стимуляция IFN γ способна восстановить баланс NK-клеточных лигандов в производных ИПСК. В то время как IFN γ оказывает слабое влияние на лиганды активирующих рецепторов NK-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 NK-клеточного ответа на дифференцированные производные ИПСК.

В дополнение мы оценили, как долго iPS-fibro сохраняют повышенную экспрессию молекул HLA-I после однократной стимуляции IFN γ . В течение первых 72 часов после стимуляции уровень экспрессии HLA-ABC практически не менялся (Рис. 37). Далее, начиная с четвертого дня наблюдалось постепенное снижение экспрессии молекул гистосовместимости. Примерно с 11–12 дня это снижение замедлялось, практически выйдя на плато (Рис. 37). Стоит отметить, что даже спустя три недели после однократной стимуляции уровень экспрессии HLA-ABC в iPS-fibro обоих доноров был почти в 1,5 раза выше по сравнению с интактным контролем. Полученные данные могут иметь важное значение для применения IFN γ в качестве терапевтического агента.

HLA-ABC

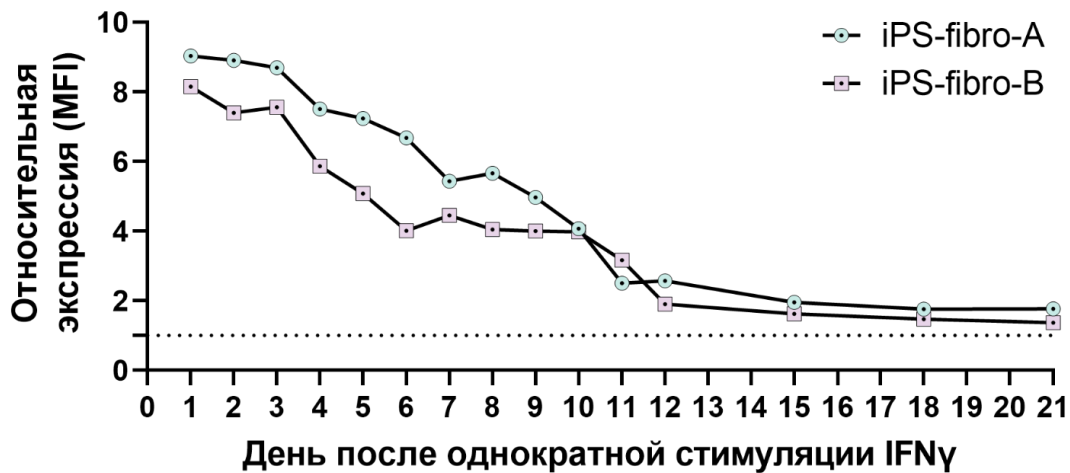


Рисунок 37. Анализ экспрессии молекул HLA-ABC после однократной стимуляции IFN γ iPS-fibro-A и iPS-fibro-B. Данные указаны как среднее значение. Каждое независимое измерение выполнено в трипликатах. Экспрессия HLA-I нормализована на уровень, характерный для изогенных исходных фибробластов.

Таким образом, в этой работе мы показали, что аллогенные и даже аутологичные НК-клетки проявляют свои прямые эффекторные функции против клеток, дифференцированных из ИПСК. При этом степень активации НК-клеток не зависела от статуса молекул гистосовместимости в производных ИПСК: клетки с нокаутом гена *B2M*, то есть полностью лишённые молекул HLA-I, активировали сопоставимый процент НК-клеток, что и клетки дикого типа. Мы показали, что повышенная чувствительность iPS-fibro к НК-клеточному ответу определяется сразу двумя факторами: дефицитом отрицательных сигналов, поступающих от ингибирующих рецепторов НК-клеток, и избытком положительных сигналов, поступающих от активирующих рецепторов. В этой связи баланс лигандов к основным рецепторам НК-клеток должен приниматься во внимание при использовании клеточного продукта, дифференцированного из ИПСК, в целях регенеративной медицины.

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 “своё” 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 НК-клеток при трансплантации солидных органов остается довольно противоречивой (Villard *et al.*, 2011). Существуют свидетельства того, что некоторые субпопуляции НК-клеток могут играть роль в регуляции толерантности к аллотрансплантату, однако чаще НК-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 НК-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 аутологичных производных ИПСК в клинической практике. К настоящему моменту опубликованы первичные результаты трёх трансплантаций

аутологичных клеток, полученных из ИПСК (Mandai *et al.*, 2017; Takagi *et al.*, 2019; Schweitzer *et al.*, 2020). 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 аутологичных производных ИПСК без применения иммуносупрессии. В связи с этим различные типы производных ИПСК должны быть протестированы на надлежащий баланс лигандов рецепторов НК-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 аутологичных Т-лимфоцитов.
- 3) Впервые показана высокая чувствительность производных ИПСК к цитотоксическим свойствам аутологичных НК-клеток, сопоставимая с клетками, которые не экспрессируют молекулы HLA I класса.
- 4) Повышенный ответ НК-клеток при сокультивировании с дифференцированными производными ИПСК обусловлен дисбалансом лигандов к активирующим и ингибирующим рецепторам НК-клеток.
- 5) Недостаток экспрессии молекул HLA I класса может быть компенсирован в ходе длительного культивирования и пассирования производных ИПСК, однако эти процессы не влияют на экспрессию активирующих НК-клеточных лигандов.
- 6) Баланс НК-клеточных лигандов в дифференцированных производных ИПСК может быть восстановлен за счет предварительной обработки клеточных культур IFN γ .

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить благодарность ряду людей, без которых представленная работа не случилась.

Во-первых, я искренне благодарю моего научного руководителя, Марию Андреевну Лагарькову, за чёткую постановку задач, мудрые советы и особенно терпение к моим недостаткам и моему порой сварливому характеру. Спасибо Вам за то, что предложили заняться этим проектом и создали все условия для его реализации. Также я благодарю Александру Никитичну Богомазову, заведующую лабораторией клеточной биологии, за неоценимую помощь и полезные советы на всех этапах выполнения данной работы.

Во-вторых, я признательна всему большому и дружному коллективу лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России за благоприятную рабочую атмосферу, Вашу отзывчивость и техническую помощь в проведении экспериментов. Отдельную признательность хочется выразить моей бывшей студентке Елизавете Секретовой, без которой выполнить данное исследование было бы во сто крат сложнее. Также я хотела бы отметить Ольгу Сергеевну Лебедеву, человека, который много лет назад научил меня базовым экспериментальным навыкам, которыми я продолжаю пользоваться до сих пор. Спасибо тебе за ценные методические и научные указания, участие в научных и ненаучных дискуссиях и за то, что всегда была рядом во время моих научных «взлетов» и «падений» и готова была подставить своё хрупкое плечо.

В-третьих, я хотела бы выразить благодарность коллегам из других лабораторий, в частности, Павлу Бобровскому, Ксении Ануфриевой, Анастасии Казаковой, Татьяне Николаевне Григорьевой, которые согласились принять участие в нашем исследовании. Благодаря их усердному труду представленный проект оказался наполнен разносторонними результатами и смог раскрыться в полной мере.

Отдельно хочется выразить благодарность всем сотрудникам кафедры иммунологии биологического факультета МГУ за приобретенные глубокие фундаментальные знания и интерес к науке.

Наконец, я хочу поблагодарить мою семью за поддержку во всех моих начинаниях. Благодарю моих родителей за то, что смогли воспитать меня амбициозным и целеустремленным человеком. Без этих качеств мне было бы тяжелее идти по выбранному мною научному пути. Также благодарю своего мужа за крепкий и надёжный семейный тыл, постоянную мотивацию и моральную поддержку.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Богомякова МЕ, Еремеев АВ, Лагарькова МА. “Свой среди чужих”: можно ли создать гипои иммуногенные линии плюрипотентных столовых клеток? *Молекулярная Биология*. 2019;53(5):725-740.
- 2) Еремеев АВ, Воловиков ЕА, Шувалова ЛД и др. «Голь на выдумки хитра», или дешевый, надежный и воспроизводимый способ получения органоидов. *Биохимия*. 2019;84(3):448-456.
- 3) Дмитриев ВК, Бобровский ПА, Богомякова МЕ. Нокаут гена бета-микроглобулина в линии клеток НЕК 293. Материалы XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Москва, Россия. 10–14 апреля 2017 г.
- 4) Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М. ГЭОТАР-Медиа. 2010. 752 с.: ил.
- 5) Adenugba A. NK Cells in Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(10):2262-2264.
- 6) Alexa A, Rahnenfuhrer J (2022). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.50.0.
- 7) Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, et al. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. *Stem Cell Reports*. 2015;5(4):597-608.
- 8) Angell TE, Lechner MG, Jang JK, LoPresti JS, Epstein AL. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin Cancer Res*. 2014;20(23):6034-6044.
- 9) Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-104.
- 10) Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res*. 2010;70(2):481-489.
- 11) Azcutia V, Stefanidakis M, Tsuboi N, et al. Endothelial CD47 promotes vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation and participates in T cell recruitment at sites of inflammation in vivo. *J Immunol*. 2012;189(5):2553-2562.
- 12) Barrilleaux B, Knoepfler PS. Inducing iPSCs to escape the dish. *Cell Stem Cell*. 2011;9(2):103-111.
- 13) Bassett AR. Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mamm Genome*. 2017;28(7-8):348-364.
- 14) Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism [published correction appears in *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):367]. *Nat Med*. 2005;11(10):1059-1065.
- 15) Benabdallah B, Désaulniers-Langevin C, Colas C, et al. Natural Killer Cells Prevent the Formation of Teratomas Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Immunol*. 2019;10:2580.
- 16) Benabdallah B, Désaulniers-Langevin C, Goyer ML, et al. Myogenic progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cell are immune-tolerated in humanized mice. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(2):267-277.

- 17) Benichou G, Yamada Y, Yun SH, Lin C, Fray M, Tocco G. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy*. 2011;3(6):757-770.
- 18) Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1359-1371.
- 19) Bhutani K, Nazor KL, Williams R, et al. Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. *Nat Commun*. 2016;7:10536.
- 20) Bogomiakova ME, Bobrovsky PA, Zhukova YN, et al. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells lines with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing. *FEBS Open Bio*. 2018;8(S1):152-153.
- 21) Bogomiakova ME, Sekretova EK, Ereemeev AV, et al. 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 Res*. 2021;55:102451.
- 22) Bohaciakova D, Renzova T, Fedorova V, et al. An Efficient Method for Generation of Knockout Human Embryonic Stem Cells Using CRISPR/Cas9 System. *Stem Cells Dev*. 2017;26(21):1521-1527.
- 23) Bolton EM, Bradley JA. Avoiding immunological rejection in regenerative medicine. *Regen Med*. 2015;10(3):287-304.
- 24) Brandl C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2019;1834:87-94.
- 25) Byrne SM, Mali P, Church GM. Genome editing in human stem cells. *Methods Enzymol*. 2014;546:119-138.
- 26) Cacchiarelli D, Trapnell C, Ziller MJ, et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell*. 2015;162(2):412-424.
- 27) Caillat-Zucman S, Le Deist F, Haddad E, et al. Impact of HLA matching on outcome of hematopoietic stem cell transplantation in children with inherited diseases: a single-center comparative analysis of genoidentical, haploidentical or unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2004;33(11):1089-1095.
- 28) Chao MP, Tang C, Pachynski RK, Chin R, Majeti R, Weissman IL. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood*. 2011;118(18):4890-4901.
- 29) Chao MP, Weissman IL, Majeti R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):225-232.
- 30) Chen H, Li Y, Lin X, et al. Functional disruption of human leukocyte antigen II in human embryonic stem cell. *Biol Res*. 2015;48:59.
- 31) Chen YH, Pruett-Miller SM. Improving single-cell cloning workflow for gene editing in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2018;31:186-192.
- 32) Cheng L, Hansen NF, Zhao L, et al. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell*. 2012;10(3):337-344.
- 33) Chin MH, Mason MJ, Xie W, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):111-123.

- 34) Choi J, Lee S, Mallard W, et al. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol.* 2015;33(11):1173-1181.
- 35) Chong AS, Rothstein DM, Safa K, Riella LV. Outstanding questions in transplantation: B cells, alloantibodies, and humoral rejection. *Am J Transplant.* 2019;19(8):2155-2163.
- 36) Chong AS. B cells as antigen-presenting cells in transplantation rejection and tolerance. *Cell Immunol.* 2020;349:104061.
- 37) Chung TL, Turner JP, Thaker NY, et al. Ascorbate promotes epigenetic activation of CD30 in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(10):1782-1793.
- 38) Cisneros T, Dillard DW, Qu X, et al. Differential role of natural killer group 2D in recognition and cytotoxicity of hepatocyte-like cells derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Am J Transplant.* 2019;19(6):1652-1662.
- 39) Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W242-W245.
- 40) Crook JM, Hei D, Stacey G. The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2010;46(3-4):169-172.
- 41) Cui D, Wang J, Zeng Y, et al. Generating hESCs with reduced immunogenicity by disrupting TAP1 or TAPBP. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016;80(8):1484-1491.
- 42) D'Antonio M, Benaglio P, Jakubosky D, et al. Insights into the Mutational Burden of Human Induced Pluripotent Stem Cells from an Integrative Multi-Omics Approach. *Cell Rep.* 2018;24(4):883-894.
- 43) de Almeida PE, Meyer EH, Kooreman NG, et al. Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun.* 2014;5:3903.
- 44) de Charette M, Houot R. Hide or defend, the two strategies of lymphoma immune evasion: potential implications for immunotherapy. *Haematologica.* 2018;103(8):1256-1268.
- 45) Deuse T, Hu X, Agbor-Enoh S, et al. De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nat Biotechnol.* 2019;37(10):1137-1144.
- 46) Deuse T, Hu X, Gravina A, et al. Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients. *Nat Biotechnol.* 2019;37(3):252-258.
- 47) Deuse T, Seifert M, Tyan D, et al. Immunobiology of naïve and genetically modified HLA-class-I-knockdown human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 17):3029-3037.
- 48) Dhodapkar KM, Feldman D, Matthews P, et al. Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(19):8718-8723.
- 49) Dierselhuis M, Goulmy E. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009;14(4):419-425.
- 50) Ding Q, Regan SN, Xia Y, Ostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. *Cell Stem Cell.* 2013;12(4):393-394.
- 51) Doss MX, Sachinidis A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells.* 2019;8(5):403.

- 52) Dressel R, Nolte J, Elsner L, et al. Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J*. 2010;24(7):2164-2177.
- 53) Drukker M, Katz G, Urbach A, et al. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9864-9869.
- 54) Duygu B, Olieslagers TI, Groeneweg M, Voorter CEM, Wieten L. HLA Class I Molecules as Immune Checkpoints for NK Cell Alloreactivity and Anti-Viral Immunity in Kidney Transplantation. *Front Immunol*. 2021;12:680480.
- 55) Edo A, Sugita S, Futatsugi Y, et al. Capacity of Retinal Ganglion Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells to Suppress T-Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):7831.
- 56) Edris B, Weiskopf K, Volkmer AK, et al. Antibody therapy targeting the CD47 protein is effective in a model of aggressive metastatic leiomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(17):6656-6661.
- 57) Emborg ME, Liu Y, Xi J, et al. Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain. *Cell Rep*. 2013;3(3):646-650.
- 58) Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem*. 2010;285(12):8543-8551.
- 59) Fons P, Chabot S, Cartwright JE, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006;108(8):2608-2615.
- 60) Frantz S. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nat Biotechnol*. 2012;30(1):12-13.
- 61) Fujii S, Yoshida S, Inagaki E, et al. Immunological Properties of Neural Crest Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2019;28(1):28-43.
- 62) Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):348-362.
- 63) Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487.
- 64) Gökmen MR, Lombardi G, Lechler RI. The importance of the indirect pathway of allorecognition in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(5):568-574.
- 65) González A, Rebmann V, LeMaout J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012;49(3):63-84.
- 66) González BJ, Creusot RJ, Sykes M, Egli D. How Safe Are Universal Pluripotent Stem Cells? *Cell Stem Cell*. 2020;26(3):307-308.
- 67) González F, Zhu Z, Shi ZD, et al. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):215-226.
- 68) Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):63-67.
- 69) Gornalusse GG, Hirata RK, Funk SE, et al. HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat Biotechnol*. 2017;35(8):765-772.

- 70) Gourraud PA, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2012;30(2):180-186.
- 71) Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002;419(6908):734-738.
- 72) Gröschel C, Hübscher D, Nolte J, et al. Efficient Killing of Murine Pluripotent Stem Cells by Natural Killer (NK) Cells Requires Activation by Cytokines and Partly Depends on the Activating NK Receptor NKG2D. *Front Immunol*. 2017;8:870.
- 73) Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, Rodrigues NP, Boyd AS. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):407-412.
- 74) Han X, Wang M, Duan S, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(21):10441-10446.
- 75) Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143(4):508-525.
- 76) Hanna S, Etzioni A. MHC class I and II deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134(2):269-275.
- 77) Hara A, Aoki H, Taguchi A, et al. Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. *Stem Cells Dev*. 2008;17(4):619-627.
- 78) Harding J, Vintersten-Nagy K, Shutova M, et al. Induction of long-term allogeneic cell acceptance and formation of immune privileged tissue in immunocompetent hosts. *bioRxiv*. 2019;716571.
- 79) Hidalgo LG, Halloran PF. Role of IFN-gamma in allograft rejection. *Crit Rev Immunol*. 2002;22(4):317-349.
- 80) Holt CD. Overview of Immunosuppressive Therapy in Solid Organ Transplantation. *Anesthesiol Clin*. 2017;35(3):365-380.
- 81) Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-899.
- 82) Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;31(9):827-832.
- 83) Huang CY, Liu CL, Ting CY, et al. Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J Biomed Sci*. 2019;26(1):87.
- 84) Ichise H, Nagano S, Maeda T, et al. NK Cell Alloreactivity against KIR-Ligand-Mismatched HLA-Haploidentical Tissue Derived from HLA Haplotype-Homozygous iPSCs. *Stem Cell Reports*. 2017;9(3):853-867.
- 85) Idelson M, Alper R, Obolensky A, et al. Immunological Properties of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells. *Stem Cell Reports*. 2018;11(3):681-695.
- 86) Itakura G, Ozaki M, Nagoshi N, et al. Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):12996.
- 87) Ji J, Ng SH, Sharma V, et al. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(3):435-440.

- 88) Jiang X, Kojo S, Harada M, Ohkohchi N, Taniguchi M, Seino KI. Mechanism of NKT cell-mediated transplant tolerance. *Am J Transplant.* 2007;7(6):1482-1490.
- 89) Jin P, Wang E. Polymorphism in clinical immunology – From HLA typing to immunogenetic profiling. *J Transl Med.* 2003;1(1):8.
- 90) Kaneko S, Yamanaka S. To be immunogenic, or not to be: that's the iPSC question. *Cell Stem Cell.* 2013;12(4):385-386.
- 91) Kang E, Wang X, Tippner-Hedges R, et al. Age-Related Accumulation of Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Adult-Derived Human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2016;18(5):625-636.
- 92) Kang X, Yu Q, Huang Y, et al. Effects of Integrating and Non-Integrating Reprogramming Methods on Copy Number Variation and Genomic Stability of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PloS One.* 2015;10(7):e0131128.
- 93) Kawagishi N, Satomi S. ABO-incompatible living donor liver transplantation: new insights into clinical relevance. *Transplantation.* 2008;85(11):1523-1525.
- 94) Kawahara T, Yagita H, Kasai S, et al. Allogeneic hepatocyte transplantation: contribution of Fas-Fas ligand interaction to allogeneic hepatocyte rejection. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13 Suppl:S119-S123.
- 95) Kim A, Lee KG, Kwon Y, et al. Off-the-Shelf, Immune-Compatible Human Embryonic Stem Cells Generated Via CRISPR-Mediated Genome Editing. *Stem Cell Rev Rep.* 2021;17(3):1053-1067.
- 96) Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4(6):472-476.
- 97) Kim MJ, Lee JC, Lee JJ, et al. Association of CD47 with natural killer cell-mediated cytotoxicity of head-and-neck squamous cell carcinoma lines. *Tumour Biol.* 2008;29(1):28-34.
- 98) Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N. Limited Immunogenicity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilages. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(23-24):1367-1375.
- 99) Kobold S, Guhr A, Mah N, et al. A Manually Curated Database on Clinical Studies Involving Cell Products Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2020;15(2):546-555.
- 100) Koga K, Wang B, Kaneko S. Current status and future perspectives of HLA-edited induced pluripotent stem cells. *Inflamm Regen.* 2020;40:23.
- 101) Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008;14(5):504-506.
- 102) Kosanke M, Davenport C, Szepes M, et al. iPSC culture expansion selects against putatively actionable mutations in the mitochondrial genome. *Stem Cell Reports.* 2021;16(10):2488-2502.
- 103) Kosanke M, Osetek K, Haase A, et al. Reprogramming enriches for somatic cell clones with small-scale mutations in cancer-associated genes. *Mol Ther.* 2021;29(8):2535-2553.
- 104) Kruse V, Hamann C, Monecke S, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Are Targets for Allogeneic and Autologous Natural Killer (NK) Cells and Killing Is Partly Mediated by the Activating NK Receptor DNAM-1. *PLoS One.* 2015;10(5):e0125544.

- 105) Kwon EM, Connelly JP, Hansen NF, et al. iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8):1964-1969.
- 106) Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:225-274.
- 107) Lanza R, Russell DW, Nagy A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(12):723-733.
- 108) Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*. 2011;8(1):106-118.
- 109) Le Bouteiller P. HLA-G in human early pregnancy: control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling. *Biomed J*. 2015;38(1):32-38.
- 110) Le Page ME, Goodridge JP, John E, Christiansen FT, Witt CS. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol*. 2014;192(2):732-740.
- 111) Lê S, Josse J, Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. 2008;25 (1):1–18.
- 112) Lee N, Llano M, Carretero M, et al. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5199-5204.
- 113) Lewis A, Koukoura A, Tsianos GI, Gargavanis AA, Nielsen AA, Vassiliadis E. Organ donation in the US and Europe: The supply vs demand imbalance. *Transplant Rev (Orlando)*. 2021;35(2):100585.
- 114) Li L, Dong M, Wang XG. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(4):448-455.
- 115) Li W, Xiang AP. Safeguarding clinical translation of pluripotent stem cells with suicide genes. *Organogenesis*. 2013;9(1):34-39.
- 116) Li XC. The significance of non-T-cell pathways in graft rejection: implications for transplant tolerance. *Transplantation*. 2010;90(10):1043-1047.
- 117) Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):3-32.
- 118) Liu J, Götherström C, Forsberg M, et al. Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials in vitro. *Stem Cell Res*. 2013;10(3):325-337.
- 119) Liu P, Chen S, Li X, et al. Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells. *PLoS One*. 2013;8(7):e69617.
- 120) Liu P, Kaplan A, Yuan B, Hanna JH, Lupski JR, Reiner O. Passage number is a major contributor to genomic structural variations in mouse iPSCs. *Stem Cells*. 2014;32(10):2657-2667.
- 121) Liu X, Li W, Fu X, Xu Y. The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Front Immunol*. 2017;8:645.
- 122) Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-244.

- 123) Lo Sardo V, Ferguson W, Erikson GA, Topol EJ, Baldwin KK, Torkamani A. Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2017;35(1):69-74.
- 124) Lorenzo-Herrero S, Sordo-Bahamonde C, Gonzalez S, López-Soto A. CD107a Degranulation Assay to Evaluate Immune Cell Antitumor Activity. *Methods Mol Biol.* 2019;1884:119-130.
- 125) Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
- 126) Lu P, Chen J, He L, et al. Generating hypoimmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin. *Stem Cell Rev Rep.* 2013;9(6):806-813.
- 127) Ma H, Folmes CD, Wu J, et al. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature.* 2015;524(7564):234-238.
- 128) Madrid M, Sumen C, Aivio S, Saklayen N. Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Curr Protoc.* 2021;1(3):e88.
- 129) Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med.* 2017;376(11):1038-1046.
- 130) Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med.* 2005;11(2):228-232.
- 131) Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, et al. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science.* 2015;348(6237):880-886.
- 132) Matheus F, Raveh T, Oro AE, Wernig M, Drukker M. Is hypoimmunogenic stem cell therapy safe in times of pandemics? *Stem Cell Reports.* 2022;17(4):711-714.
- 133) Matlung HL, Szilagyi K, Barclay NA, van den Berg TK. The CD47-SIRP α signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol Rev.* 2017;276(1):145-164.
- 134) Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):119-125.
- 135) Mattapally S, Pawlik KM, Fast VG, et al. Human Leukocyte Antigen Class I and II Knockout Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells: Universal Donor for Cell Therapy. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(23):e010239.
- 136) Mehler VJ, Burns CJ, Stauss H, Francis RJ, Moore ML. Human iPSC-Derived Neural Crest Stem Cells Exhibit Low Immunogenicity. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Jan 13;16:161-171.
- 137) Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, et al. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med.* 2008;14(5):507-509.
- 138) Menter T, Tzankov A. Mechanisms of Immune Evasion and Immune Modulation by Lymphoma Cells. *Front Oncol.* 2018;8:54.
- 139) Miller LW. Trial of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitor Cells: An Encouraging Start. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(4):439-442.
- 140) Moffett A, Colucci F. Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction. *Immunol Rev.* 2015;267(1):283-297.

- 141) Morandi F, Rizzo R, Fainardi E, Rouas-Freiss N, Pistoia V. Recent Advances in Our Understanding of HLA-G Biology: Lessons from a Wide Spectrum of Human Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:4326495.
- 142) Moreau A, Varey E, Anegon I, Cuturi MC. Effector mechanisms of rejection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11):a015461.
- 143) Morizane A, Doi D, Kikuchi T, et al. Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Reports.* 2013;1(4):283-292.
- 144) Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature.* 2003;425(6960):805-811.
- 145) Nakajima H, Asai A, Okada A, et al. Transcriptional regulation of ILT family receptors. *J Immunol.* 2003;171(12):6611-6620.
- 146) Nakamura Y, Miyagawa S, Yoshida S, et al. Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model. *Sci Rep.* 2019;9(1):10840.
- 147) Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol.* 2008;26(7):739-740.
- 148) Neavin D, Nguyen Q, Daniszewski MS, et al. Single cell eQTL analysis identifies cell type-specific genetic control of gene expression in fibroblasts and reprogrammed induced pluripotent stem cells. *Genome Biol.* 2021;22(1):76.
- 149) Netter P, Anft M, Watzl C. Termination of the Activating NK Cell Immunological Synapse Is an Active and Regulated Process. *J Immunol.* 2017;199(7):2528-2535.
- 150) Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T cell-mediated immunity. *J Clin Immunol.* 2005;25(6):534-540.
- 151) Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell.* 2006;126(4):659-662.
- 152) Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods.* 2011;8(5):409-412.
- 153) Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008;322(5903):949-953.
- 154) Orlando G, Soker S, Stratta RJ, Atala A. Will regenerative medicine replace transplantation? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8):a015693.
- 155) Oualla-Bachiri W, Fernández-González A, Quiñones-Vico MI, Arias-Santiago S. From Grafts to Human Bioengineered Vascularized Skin Substitutes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8197.
- 156) Oyer JL, Gitto SB, Altomare DA, Copik AJ. PD-L1 blockade enhances anti-tumor efficacy of NK cells. *Oncoimmunology.* 2018;7(11):e1509819.
- 157) Ozaki M, Iwanami A, Nagoshi N, et al. Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells in vitro. *Stem Cell Res.* 2017;19:128-138.
- 158) Park A, Yang Y, Lee Y, et al. Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Thyroid Cancer Cells Suppresses Natural Killer Cell Function by Inhibiting NKG2D and NKp46 Expression via STAT Signaling Pathways. *J Clin Med.* 2019;8(6):842.

- 159) Parlakpinar H, Gunata M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2021;43(6):651-665.
- 160) Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):216-224.
- 161) Petrus-Reurer S, Winblad N, Kumar P, et al. Generation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Lacking Human Leukocyte Antigen Class I and II. *Stem Cell Reports.* 2020;14(4):648-662.
- 162) Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant?. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(6):469-479.
- 163) Pliatsika V, Rigoutsos I. "Off-Spotter": very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biol Direct.* 2015;10:4.
- 164) Poetsch MS, Strano A, Guan K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells.* 2022;40(6):546-555.
- 165) Pontrelli P, Rascio F, Castellano G, Grandaliano G, Gesualdo L, Stallone G. The Role of Natural Killer Cells in the Immune Response in Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2020;11:1454.
- 166) Popp B, Krumbiegel M, Grosch J, et al. Need for high-resolution Genetic Analysis in iPSC: Results and Lessons from the ForIPS Consortium. *Sci Rep.* 2018;8(1):17201.
- 167) Rami F, Beni SN, Kahnarooi MM, Rahimmanesh I, Salehi AR, Salehi R. Recent Advances in Therapeutic Applications of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Reprogram.* 2017;19(2):65-74.
- 168) Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308.
- 169) Rehakova D, Souralova T, Koutna I. Clinical-Grade Human Pluripotent Stem Cells for Cell Therapy: Characterization Strategy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2435. Published 2020 Mar 31.
- 170) Riolobos L, Hirata RK, Turtle CJ, et al. HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther.* 2013;21(6):1232-1241.
- 171) Robinson J, Guethlein LA, Cereb N, et al. Distinguishing functional polymorphism from random variation in the sequences of >10,000 HLA-A, -B and -C alleles. *PLoS Genet.* 2017;13(6):e1006862.
- 172) Robinson J, Halliwell JA, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D1222-D1227.
- 173) Robinson J, Soormally AR, Hayhurst JD, Marsh SGE. The IPD-IMGT/HLA Database - New developments in reporting HLA variation. *Hum Immunol.* 2016;77(3):233-237.
- 174) Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, et al. Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells.* 2010;28(1):36-44.
- 175) Rong Z, Wang M, Hu Z, et al. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell Stem Cell.* 2014;14(1):121-130.
- 176) Rouas-Freiss N, Moreau P, LeMaoult J, Carosella ED. The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res.* 2014;2014:359748.

- 177) Rouhani FJ, Zou X, Danecek P, et al. Substantial somatic genomic variation and selection for BCOR mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet.* 2022;54(9):1406-1416. doi:10.1038/s41588-022-01147-3
- 178) Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* 2002;295(5562):2097-2100.
- 179) Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol.* 2006;67(3):188-195.
- 180) Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002;169(8):4098-4102.
- 181) Scheiner ZS, Talib S, Feigal EG. The potential for immunogenicity of autologous induced pluripotent stem cell-derived therapies. *J Biol Chem.* 2014;289(8):4571-4577.
- 182) Schmiedel D, Mandelboim O. NKG2D Ligands-Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:2040.
- 183) Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet.* 2015;385(9967):509-516.
- 184) Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2020;382(20):1926-1932.
- 185) Scott DM, Ehrmann IE, Ellis PS, Chandler PR, Simpson E. Why do some females reject males? The molecular basis for male-specific graft rejection. *J Mol Med (Berl).* 1997;75(2):103-114.
- 186) Scozzi D, Ibrahim M, Menna C, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. The Role of Neutrophils in Transplanted Organs. *Am J Transplant.* 2017;17(2):328-335.
- 187) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(1):11-14.
- 188) Shahan TA, Fawzi A, Bellon G, Monboisse JC, Kefalides NA. Regulation of tumor cell chemotaxis by type IV collagen is mediated by a Ca(2+)-dependent mechanism requiring CD47 and the integrin alpha(V)beta(3). *J Biol Chem.* 2000;275(7):4796-4802.
- 189) Sharifi Tabar M, Hesaraki M, Esfandiari F, Sahraneshin Samani F, Vakilian H, Baharvand H. Evaluating Electroporation and Lipofectamine Approaches for Transient and Stable Transgene Expressions in Human Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *Cell J.* 2015;17(3):438-450.
- 190) Shi L, Li W, Liu Y, et al. Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells via expression of membrane-bound and secreted β 2m-HLA-G fusion proteins. *Stem Cells.* 2020;38(11):1423-1437.
- 191) Sick E, Jeanne A, Schneider C, Dedieu S, Takeda K, Martiny L. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest. *Br J Pharmacol.* 2012;167(7):1415-1430.
- 192) Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(8):615-625.
- 193) Siu JHY, Surendrakumar V, Richards JA, Pettigrew GJ. T cell Allorecognition Pathways in Solid Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2018;9:2548.

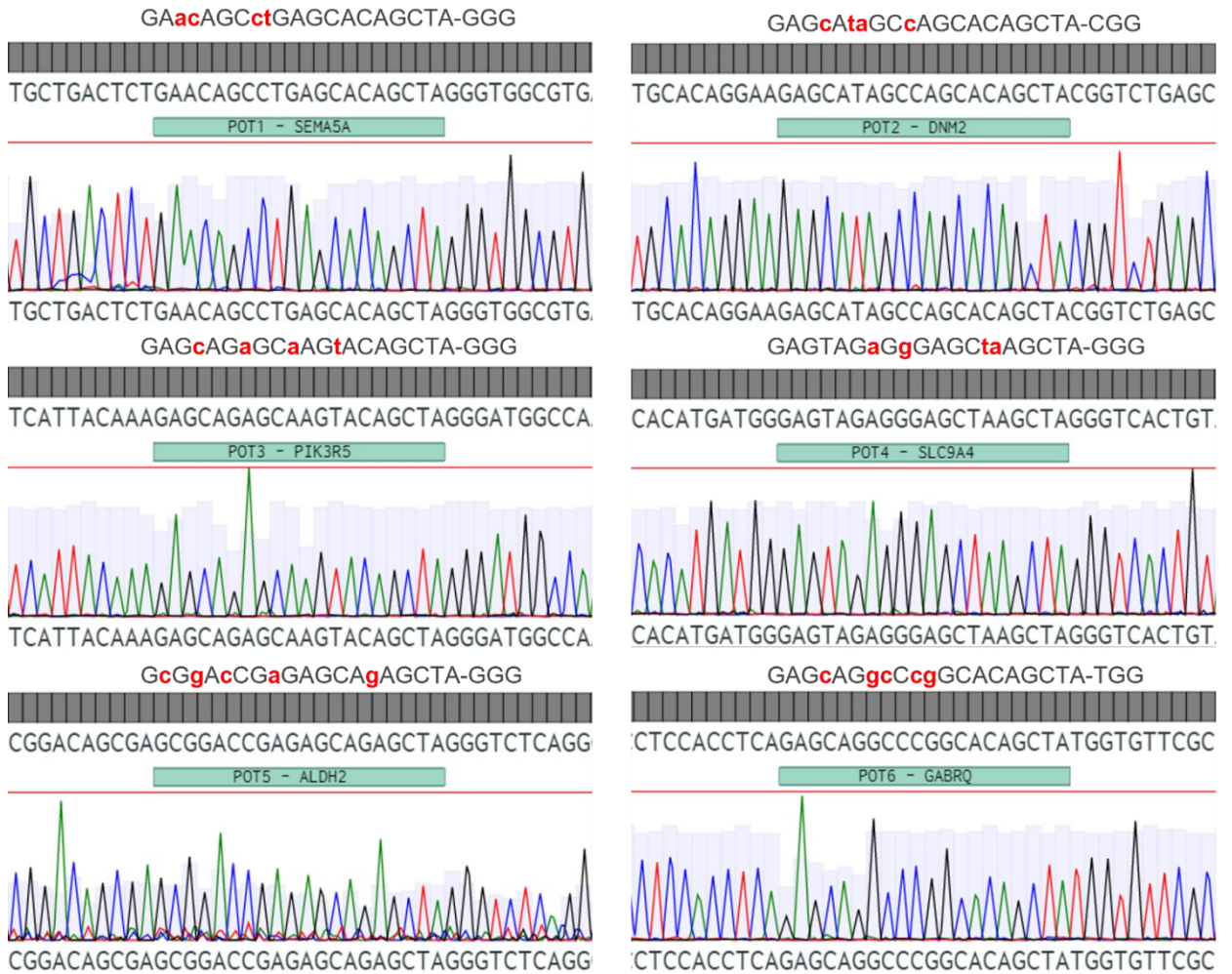
- 194) Solomon S, Pitossi F, Rao MS. Banking on iPSC--is it doable and is it worthwhile. *Stem Cell Rev Rep*. 2015;11(1):1-10.
- 195) Song C, Wang L, Li Q, et al. Generation of individualized immunocompatible endothelial cells from HLA-I-matched human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):48.
- 196) Soto-Pantoja DR, Terabe M, Ghosh A, et al. CD47 in the tumor microenvironment limits cooperation between antitumor T-cell immunity and radiotherapy. *Cancer Res*. 2014;74(23):6771-6783.
- 197) Spahn JH, Li W, Kreisel D. Innate immune cells in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(1):14-19.
- 198) Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*. 2014;84(4).
- 199) Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev*. 2010;24(20):2239-2263.
- 200) Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008;322(5903):945-949.
- 201) Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471(7338):377-381.
- 202) Stewart TJ, Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene*. 2008;27(45):5894-5903.
- 203) Sugiura M, Kasama Y, Araki R, et al. Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(1):52-63.
- 204) Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, et al. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen Med*. 2018;13(7):859-866.
- 205) Süsal C, Opelz G. Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(4):438-444.
- 206) Suzuki D, Flahou C, Yoshikawa N, et al. iPSC-Derived Platelets Depleted of HLA Class I Are Inert to Anti-HLA Class I and Natural Killer Cell Immunity. *Stem Cell Reports*. 2020;14(1):49-59.
- 207) Swistowski A, Peng J, Liu Q, et al. Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells*. 2010;28(10):1893-1904.
- 208) Takagi S, Mandai M, Gocho K, et al. Evaluation of Transplanted Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2019;3(10):850-859.
- 209) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872.
- 210) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
- 211) Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12045-12050.

- 212) Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell*. 2012;11(2):147-152.
- 213) Thorgersen EB, Barratt-Due A, Haugaa H, et al. The Role of Complement in Liver Injury, Regeneration, and Transplantation. *Hepatology*. 2019;70(2):725-736.
- 214) Torikai H, Reik A, Soldner F, et al. Toward eliminating HLA class I expression to generate universal cells from allogeneic donors. *Blood*. 2013;122(8):1341-1349.
- 215) Tseng D, Volkmer JP, Willingham SB, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11103-11108.
- 216) Uluçkan O, Becker SN, Deng H, et al. CD47 regulates bone mass and tumor metastasis to bone. *Cancer Res*. 2009;69(7):3196-3204.
- 217) Unanue ER. Perspectives on anti-CD47 antibody treatment for experimental cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):10886-10887.
- 218) van Kooten C, Lombardi G, Gelderman KA, et al. Dendritic cells as a tool to induce transplantation tolerance: obstacles and opportunities. *Transplantation*. 2011;91(1):2-7.
- 219) Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells. *Blood*. 2004;103(8):3065-3072.
- 220) Vigont VA, Grekhnev DA, Lebedeva OS, et al. STIM2 Mediates Excessive Store-Operated Calcium Entry in Patient-Specific iPSC-Derived Neurons Modeling a Juvenile Form of Huntington's Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:625231.
- 221) Villanueva J, Nishimura T, Nakauchi H. Using the Inducible Caspase-9 Suicide-Safeguard System with iPSC and Bioluminescent Tracking. *Methods Mol Biol*. 2019;2048:259-264.
- 222) Villard J. The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation. *J Innate Immun*. 2011;3(4):395-402.
- 223) Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*. 2006;66(5):2520-2526.
- 224) Wang B, Iriguchi S, Waseda M, et al. Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(5):429-440.
- 225) Wang D, Quan Y, Yan Q, Morales JE, Wetsel RA. Targeted Disruption of the β 2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(10):1234-1245.
- 226) Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-918.
- 227) Wang X, Qin J, Zhao RC, Zenke M. Reduced immunogenicity of induced pluripotent stem cells derived from Sertoli cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e106110.
- 228) Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618-630.
- 229) Wei W, Gaffney DJ, Chinnery PF. Cell reprogramming shapes the mitochondrial DNA landscape. *Nat Commun*. 2021;12(1):5241.

- 230) Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans.* 2013;41(1):245-251.
- 231) Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag, New York, 2016.
- 232) Willingham SB, Volkmer JP, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(17):6662-6667.
- 233) Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):766-770.
- 234) Wu J, Song Y, Bakker AB, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 1999;285(5428):730-732.
- 235) Wu Y, Shu J, He C, et al. ROCK inhibitor Y27632 promotes proliferation and diminishes apoptosis of marmoset induced pluripotent stem cells by suppressing expression and activity of caspase 3. *Theriogenology.* 2016;85(2):302-314.
- 236) Xu H, Wang B, Ono M, et al. Targeted Disruption of HLA Genes via CRISPR-Cas9 Generates iPSCs with Enhanced Immune Compatibility. *Cell Stem Cell.* 2019;24(4):566-578.e7.
- 237) Yamasaki S, Sugita S, Horiuchi M, et al. Low Immunogenicity and Immunosuppressive Properties of Human ESC- and iPSC-Derived Retinas. *Stem Cell Reports.* 2021;16(4):851-867.
- 238) Yoshihara M, Araki R, Kasama Y, et al. Hotspots of De Novo Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 2017;21(2):308-315. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.060
- 239) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917-1920.
- 240) Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods.* 2009;6(5):363-369.
- 241) Zhang J, Basher F, Wu JD. NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. *Front Immunol.* 2015;6:97.
- 242) Zhao L, Teklemariam T, Hantash BM. Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of human embryonic stem cells and their epidermal derivatives. *Stem Cell Res.* 2014;13(2):342-354.
- 243) Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;474(7350):212-215.
- 244) Zhao T, Zhang ZN, Westenskow PD, et al. Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2015;17(3):353-359.
- 245) Zhao W, Lei A, Tian L, et al. Strategies for Genetically Engineering Hypoimmunogenic Universal Pluripotent Stem Cells. *iScience.* 2020;23(6):101162.
- 246) Zheng D, Wang X, Xu RH. Concise Review: One Stone for Multiple Birds: Generating Universally Compatible Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 2016;34(9):2269-2275.
- 247) Zimmer J, Andrès E, Donato L, Hanau D, Hentges F, de la Salle H. Clinical and immunological aspects of HLA class I deficiency. *QJM.* 2005;98(10):719-727.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Секвенирование потенциальных нецелевых сайтов нуклеазы Cas9 в линии ИПСК ΔiPSC-A. Несоответствие с последовательностью направляющей РНК для редактирования гена B2M обозначено красным.



ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Дифференциально экспрессированные гены в ΔiPS-fibro по сравнению с iPS-fibro дикого типа.

Ген	Статус	log FC	FDR	TPM A	TPM ΔA	TPM B	TPM ΔB	TPM C	TPM ΔC
APOL1	UP	1,6	0,029503	1,0	2,1	0,5	2,1	0,8	3,1
APOL6	UP	1,1	0,007261	1,0	1,2	1,0	2,5	0,9	2,8
B2M	DOWN	-2,5	0,000276	946,1	132,4	996,7	73,2	1029,4	399,7
GDF10	UP	4,7	0,001501	0,2	4,8	0,1	0,7	1,1	92,8
HIST1H4H	DOWN	-2,2	0,013542	4,6	0,7	2,4	0,4	4,5	2,1
HIST2H2AA3	UP	23,8	0,007261	0,0	0,0	0,0	15,2	0,0	0,0
INHBE	UP	3,8	0,001471	0,3	10,1	1,1	2,3	2,1	41,9
RGS13	UP	35,9	0,000000	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
RPTOR	DOWN	-0,5	0,017405	24,3	14,6	26,8	19,5	22,1	19,1
SFRP5	UP	25,0	0,004326	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
TMEM132C	UP	25,1	0,004326	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
TNFRSF14	UP	5,9	0,009137	0,0	0,1	0,0	0,5	0,0	1,1
TRMT9B	DOWN	-1,8	0,000340	3,1	0,8	1,8	0,4	1,4	0,6