

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Стрельцова Мария Алексеевна

Получение долгоживущих популяций НК-клеток человека, обладающих заданными характеристиками

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

диссертационная работа на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

научный руководитель:
к.б.н. Коваленко Елена Ивановна

Москва – 2019 г.

Оглавление

Оглавление	2
Введение	5
<i>Цель и задачи исследования</i>	6
<i>Научная новизна</i>	7
<i>Теоретическая и практическая значимость</i>	7
<i>Апробация работы и публикации</i>	8
<i>Статьи</i>	8
<i>Тезисы докладов на конференциях (избранные)</i>	9
1 Обзор литературы	11
1.1 Этапы развития и формирование субпопуляций НК-клеток	11
1.1.1 Развитие НК-клеток	11
1.1.2 Типы зрелых НК-клеток	16
1.2 Рецепторы НК-клеток	19
1.2.1 Рецепторы натуральной цитотоксичности	19
1.2.2 Лектин-подобные рецепторы	20
1.2.3 Иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток KIR	22
1.2.4 Рецептор антитело-зависимой клеточной цитотоксичности CD16.	24
1.2.5 Взаимодействие активирующих и ингибирующих рецепторов	24
1.3 Функциональные характеристики НК-клеток	26
1.3.1 Продукция цитокинов	26
1.3.2 Цитотоксичность НК-клеток	26
1.3.3 «Обучение» НК-клеток как механизм развития толерантности к нормальным клеткам организма	28
1.4 Терминальная дифференцировка и старение НК-клеток	29
1.4.1 Дифференцировка зрелых НК-клеток	29
1.4.2 Развитие «адаптивных» НК-клеток	30
1.4.3 «Старение» НК-клеток	32
1.5 Подходы к использованию НК-клеток в противоопухолевой иммунотерапии	34
1.6 Методы культивирования НК-клеток	38
1.6.1 Активация НК-клеток	38
1.6.2 Влияние стимуляции на фенотипические характеристики НК-клеток ..	42
1.6.3 Культивирование единичных НК-клеток	43
1.7 Методы модификации НК-клеток	45

1.7.1	Методы генетической модификации НК-клеток.....	45
1.8	Заключение	47
2	Материалы и методы.....	49
2.1	Материалы	49
2.1.1	Клеточные линии	49
2.1.2	Растворы	49
2.1.3	Антитела	50
2.1.4	Прочие реагенты и материалы	50
2.2	Методы.....	51
2.2.1	Выделение, стимуляция и инкубирование клеток и клонов НК-клеток.....	51
2.2.2	Генетические манипуляции с клетками	58
3	Результаты.....	62
3.1	Выбор условий стимуляции, приводящих к увеличению продолжительности жизни НК-клеток.....	62
3.1.1	Подбор условий начальной стимуляции НК-клеток для клонирования.....	63
3.1.2	Влияние условий культивирования клонов НК-клеток на их продолжительность жизни и уровень клеточной экспансии.	65
3.2	Изучение эффективности образования, экспансии и выживаемости клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека	72
3.2.1	Анализ эффективности образования клонов, полученных из НК-клеток человека, различных по степени дифференцировки.....	72
3.2.2	Анализ эффективности образования клонов, из НК-клеток, различных по степени дифференцировки, активации либо по уровню экспрессии NKG2C.....	73
3.2.3	Изучение продолжительности жизни клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека.	75
3.2.4	Изучение экспансии долгоживущих клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека.	80
3.3	Фенотипические особенности полученных клонов	82
3.3.1	Оценка стабильности экспрессии определенных при сортировке маркеров клонов НК-клеток.....	82
3.3.2	Изучение экспрессии маркеров, влияющих на функциональную активность клонов	87
3.3.3	Оценка стабильности уровня экспрессии NKG2A	91
3.4	Функциональная активность полученных клонов НК-клеток	93
3.4.1	Исследование функциональной активности клонов, полученных из различных субпопуляций	93
3.4.2	Исследование функциональной активности долгоживущих клонов	94

3.4.3	Изучение функциональной активности клонов после заморозки/разморозки	95
3.5	Увеличение продолжительности жизни НК-клеток с использованием генетических манипуляций	97
3.5.1	Разработка метода трансдукции НК-клеток	97
3.5.2	Изучение эффективности трансдукции различных субпопуляций НК-клеток	99
3.5.3	Изучение продолжительности жизни, фенотипических и функциональных особенностей трансдуцированных НК-клеток	103
3.5.4	Трансдукция клонов НК-клеток.....	107
4	Обсуждение.....	111
5	Выводы	124
6	Благодарности.....	125
7	Список сокращений.....	126
8	Литература	128

Введение

Актуальность темы исследования

Натуральные киллеры (NK-клетки) представляют собой лимфоциты системы врожденного иммунитета и являются перспективным агентом для иммунотерапии, так как способны проявлять цитотоксичность против поврежденных или трансформированных клеток. Значительным преимуществом иммунотерапевтического применения NK-клеток является их слабая, по сравнению с Т-клетками, способность вызывать реакцию «трансплантат против хозяина», что позволяет использовать не только аутологичные, но и аллогенные NK-клетки. В настоящее время подходы к адоптивной иммунотерапии опухолевых заболеваний с использованием NK-клеток во всем мире находятся в стадии активной разработки, в процессе которой необходимо учитывать: 1) популяция NK-клеток, циркулирующая в крови человека, гетерогенна и содержит клетки, различающиеся по своей функциональной активности; 2) NK-клетки имеют короткий срок жизни, и их сложно наращивать в культуре. Показано, что предварительная стимуляция NK-клеток способствует более длительному сохранению их активности после введения в организм донора. Тем не менее, клиническое применение NK-клеток в ряде случаев оказывается малоэффективным по не всегда понятным причинам. Возможно это связано с тем, что фенотип NK-клеток существенно изменяется во время их дифференцировки и активации, образуя гетерогенные субпопуляции с различной экспрессией поверхностных рецепторов, эффекторных молекул, сигнальных белков. Механизмы дифференцировки NK-клеток не совсем ясны. Во время этого процесса из-за определенных эпигенетических изменений NK-клетки теряют экспрессию рецептора NKG2A/CD94 и начинают экспрессировать ингибирующие KIR-рецепторы и маркер созревания CD57. Иногда, часто связанные с цитомегаловирусной инфекцией, высокодифференцированные NK-клетки образуют подмножества адаптивно-подобных клеток, интенсивно экспрессирующие рецепторы KIR и NKG2C. Все это может привести к изменению пролиферативной и функциональной активности NK-клеток, включая цитотоксичность и продукцию цитокинов. Долгоживущие популяции NK-клеток с заданными характеристиками должны послужить полезным инструментом для выявления свойств NK-клеток, определяющих их противоопухолевую эффективность. Генерация и анализ отдельного потомства NK-клеток может помочь лучше охарактеризовать процессы дифференцировки и активации на клеточном уровне и изучить функциональные особенности NK-клеток на разных стадиях развития.

В последние годы для получения большого количества функционально-активных NK-клеток используются не только разнообразные способы стимуляции, но и

генетические манипуляции, повышающие уровень экспансии и функциональные характеристики НК-клеток. Однако проводимые на протяжении последних 20 лет исследования по генной инженерии НК-клеток наталкивались на технические и биологические проблемы, связанные с доставкой генов в эти клетки, препятствующие получению достаточного количества жизнеспособных, физиологически активных, генномодифицированных натуральных киллеров. В последнее время количество работ в этой области значительно возросло. Разработан ряд успешных подходов к генной модификации НК-клеток, получено более полное представление о том, как НК-клетки могут быть оптимизированы для индукции регрессии опухоли *in vivo*. Дальнейшая разработка эффективных методов модификации НК-клеток может позволить не только нарабатывать большое количество генетически-модифицированных НК-клеток, но и позволит лучше понять физиологические аспекты функционирования этих клеток, лежащие в основе резистентности к вирусам и противоопухолевой активности.

Селекция вариантов НК-клеток и генетическая модификация, используемые в данной работе в качестве методологической основы для получения долгоживущих популяций НК-клеток с заданными характеристиками, в перспективе может расширить возможности применения НК-клеток в терапевтических целях.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлась разработка подходов к получению цитотоксически-активных популяций НК-клеток человека, обладающих повышенной продолжительностью жизни и экспансией, с использованием методов клеточного клонирования и генно-инженерной модификации.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способ эффективного клонирования НК-клеток и проанализировать зависимость уровня выживаемости, экспансии и характеристик клонов от условий культивирования.
2. Оценить эффективность клонирования, экспансию и продолжительность жизни клонов, полученных из НК-клеток, отличных по степени дифференцировки, уровню активации и экспрессии рецептора NKG2C.
3. Изучить стабильность фенотипических характеристик и функциональные особенности клонов, полученных из разных субпопуляций НК-клеток.
4. Исследовать устойчивость НК-клеток, различающихся стадией дифференцировки и степенью активации, к генетической модификации с помощью ретровирусной трансдукции.

5. Осуществить внедрение гена теломеразы в человеческие НК-клетки и изучить влияние данной генетической модификации на продолжительность жизни полученных клеточных культур.

Научная новизна

В данной работе разработан новый способ получения клонов НК-клеток человека с использованием в качестве начальных стимулов IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21. Протестированы две модели культивирования клонов НК-клеток с разной схемой внесения в культуры фидерных клеток, и установлено, что продолжительность жизни и выживаемость клонов, их фенотипические и функциональные характеристики зависят от частоты рестимуляции клонов клетками K562-mbIL21. Показано, что эффективность образования и продолжительность жизни клонов зависит от стадии дифференцировки исходных НК-клеток. Наиболее долгоживущие клоны могут быть получены из неактивированных НК-клеток промежуточной стадии дифференцировки с фенотипом CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻. С использованием клональных культур уточнены представления о пластичности НК-клеток, в частности, установлено, что экспрессия рецептора NKG2A может возникать *de novo* в потомстве изначально NKG2A-негативных НК-клеток, а маркер CD57 может полностью исчезать с клеточной поверхности при культивировании в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21. С помощью ретровирусной трансдукции осуществлено внедрение гена каталитической субъединицы теломеразы (hTERT) в популяции и клоны НК-клеток человека. Показано, что эффективность ретровирусной генетической модификации зависит от степени дифференцировки НК-клеток. Выяснено, что гиперэкспрессия гена hTERT приводит к увеличению продолжительности жизни модифицированных НК-клеток, но не обеспечивает существенного роста пролиферативной активности и не влияет на жизнеспособность НК-клеток.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключена в разработке эффективного метода получения долгоживущего потомства единичных НК-клеток, находящихся на разных стадиях созревания. Такой подход позволит лучше охарактеризовать процессы активации и дифференцировки НК-клеток на клеточном уровне. Долгоживущие популяции НК-клеток с заданными характеристиками могут быть полезным инструментом для выявления и модулирования свойств НК-клеток, определяющих их противоопухолевую эффективность. Практическая значимость работы состоит в получении знаний о влиянии фенотипических особенностей НК-клеток на их выживаемость, экспансию и

функциональный потенциал, что может быть использовано при разработке методов селекции и наращивания НК-клеток для клинического применения. Детальное исследование противоопухолевых свойств НК-клеток на клональном уровне может расширить возможности применения НК-клеток в терапевтических целях. Кроме того, практическая значимость работы заключена в разработке эффективного способа ретровирусной трансдукции НК-клеток. Возможность модифицировать НК-клетки различными генами позволяет увеличить экспансию, продолжительность жизни и цитотоксическую активность НК-клеток, что имеет практическую значимость для применения НК-клеток в иммунотерапии.

Апробация работы и публикации

По основным материалам диссертации сделаны устные доклады на XXVII зимней молодежной научной школ "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" в 2015 г., 1-м Калининградском научном иммунологическом форуме, в 2016 г., и международном иммунологическом конгрессе в 2016 г.

По теме диссертационной работы опубликовано 9 статей в рецензируемых журналах.

Статьи

1. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2015, Новые возможности получения клонов НК-клеток человека с использованием модифицированных фидерных клеток. Российский иммунологический журнал, т. 9 (18), № 2 (1), 821-823.
2. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2015, Сравнительный анализ поверхностных маркеров клонов НК-клеток человека. Российский иммунологический журнал, т. 9 (18), № 3, 218-220.
3. **Стрельцова М. А.**, Бойко А. А., Коваленко Е. И. 2016, Преимущественное выживание NKG2C-позитивных клонов НК-клеток человека по сравнению с NKG2C-негативными. Российский иммунологический журнал, т. 10 (19), № 2(1), с. 545-547.
4. Kovalenko, E.I.; **Streltsova, M.A.**, 2016. Adaptive Features of Natural Killer Cells – Lymphocytes of Innate Immunity. Russ. J. Bioorganic Chem. 42, 649–667. doi:10.7868/S0132342316060063.
5. **Streltsova, M.A.**, Barsov, E., Erokhina, S.A., Kovalenko, E.I., 2017. Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. Journal of Immunological Methods, 450, 90-94. doi:10.1016/j.jim.2017.08.003.

6. Kovalenko, E.I., **Streltsova, M.A.**, Kanevskiy, L.M., Erokhina, S.A., Telford, W.G. 2017. Identification of human memory-like NK cells. *Current Protocol in Cytometry*. 79, 9.50.1-9.50.11.
7. **Streltsova, M.A.**, Barsov, E. V., Erokhina, S.A., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2018. Current approaches to engineering of NK cells for cancer immunotherapy. *Current Pharmaceutical Design*, 24. doi:10.2174/1381612824666180829113013.
8. **Streltsova M.A.**, Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., Lee D.A., Telford W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2018. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A. *PLOS ONE*, 13(12): e0208469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208469>.
9. **Streltsova, M.**; Erokhina, S.; Kanevskiy, L.; Grechikhina, M.; Kobyzeva, P.; Lee, D.; Telford, W.; Sapozhnikov, A.; Kovalenko, E., 2019. Recurrent stimulation of natural killer cell clones with K562 expressing membrane-bound interleukin-21 affects their phenotype, interferon- γ production, and lifespan. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 443, doi:10.3390/ijms20020443.

Тезисы докладов на конференциях (избранные)

1. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2014. Фенотипическое сравнение клонов натуральных киллеров человека, полученных с использованием фидерных клеток, экспрессирующих мембраносвязанную форму IL-21. XXVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 10-14 февраля, 2014. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 135.
2. **Streltsova M.A.**, Erokhina S.A., Kovalenko E.I. 2014. HLA-DR expression in NK cells stimulated with soluble IL-2 and (or) membrane-bound IL-21. *Natural Killer Cell Symposium, Hannover, Germany. Book of abstracts*, 116.
3. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2015. Разработка методов генно-инженерной модификации НК-клеток человека. «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2015», Санкт-Петербург, 1-4 июня 2015 г. *Медицинская иммунология*, том 17, спецвыпуск, с. 286.
4. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2015. НК-клетки с фенотипом CD56^{bright}HLA-DR⁺CD16⁺CD57⁻ обладают высокой пролиферативной способностью. XXVII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 41.

5. **Streltsova M.A.**, Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. 2015. Phenotypic characteristics of NK cell clones obtained with soluble IL-2 and membrane-bound IL-21 stimulation Cell Symposium “Cancer. Inflammation and Immunity”, Sitges, Spain, Abstracts, P1.063.
6. **Streltsova M.A.**, Telford W.G., Kovalenko E.I. 2016. Clone generation in subsets of NK cells at different maturation stages using stimulation with IL-2 and modified K562 feeder cells. 16th Meeting of the Society for Natural Immunity NK2016 in Taormina. Abstract book, p. 48.
7. **Streltsova M.A.**, Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. 2016. Preparation of TERT-modified human NK cells. International Congress of Immunology, 21-26 August 2016, Melbourne, Australia. Eur. J. Immunol. 2016. 46 (Suppl.1), 90 (Abstracts of ICI).
8. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Муравьева А.В., Коваленко 2017. Е.И. IL-2 и мембраносвязанный IL-21 приводит к индукции пролиферации, изменению фенотипа и функций НК-клеток. VIII Российский Симпозиум «Белки И Пептиды», 18-22 сентября 2017, спецвыпуск Acta Naturae, стр. 57.
9. **Стрельцова М.А.**, Ерохина С.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. 2017. Характеристика популяций и клонов НК-клеток, полученных путем стимуляции интерлейкином-2 и генетически-модифицированными фидерными клетками K562, экспрессирующими мембраносвязанный интерлейкин-21. XVI всероссийский научный форум им. акад. В.И. Иоффе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 5-8 июня 2017 г. Медицинская иммунология, т. 19, с. 62-63.
10. **Streltsova M.A.**, Barsov E., Erokhina S.A., Kovalenko E.I. 2017. Retroviral transfer into IL-2/feeder-cell-activated human NK cells. Natural Killer Cell Symposium, Düsseldorf, p.49.
11. **Streltsova M.A.**, Barsov E., Erokhina S.A., Kovalenko E.I. 2018. Less differentiated CD57⁻ human NK cells expanded under stimulation with IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21 are highly susceptible to retroviral gene transduction. Natural Killer Cell Symposium, Hamburg Abstract booklet, p.12.
12. **Streltsova M.A.**, Erokhina S.A., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. 2018. Clones of adaptive NK cells can be obtained by stimulation with IL-2 and K562-mbIL21. Biomembranes 2018, Dolgoprudny. Book of abstracts, p. 344. Journal of Bioenergetics and Biomembranes.

1 Обзор литературы

1.1 Этапы развития и формирование субпопуляций NK-клеток

Натуральные киллеры (NK-клетки) представляют собой лимфоциты системы врожденного иммунитета, которые участвуют в распознавании инфицированных, поврежденных и подвергшихся злокачественному перерождению клеток. По классификации последнего десятилетия NK-клетки входят в группу 1 лимфоидных клеток врожденного иммунитета (innate lymphoid cells, ILC), для развития которых требуется транскрипционный фактор T-bet. Для этих клеток также характерна секреция ряда цитокинов, в том числе γ -интерферона (IFN- γ) (Montaldo et al., 2016). В отличие от ILC1, NK-клетки дополнительно экспрессируют транскрипционный фактор Eomes (Eomesodermin) и проявляют цитотоксичность (Chiossone et al., 2018). Недавно данная классификация была уточнена. Врожденные лимфоидные клетки были разделены на пять групп на основе экспрессии транскрипционных факторов, участвующих в их развитии, и разных вариантов продукции этими клетками цитокинов. В результате пересмотра классификации к уже существующим группам ILC1, ILC2, ILC3 была добавлена группа лимфоидных ткане-индуцируемых (LTi) клеток (Chiossone et al., 2018). NK-клетки были вынесены в отдельную группу ILC.

Одно из главных отличий NK-клеток от T- и B-лимфоцитов – отсутствие на их поверхности антигенспецифических рецепторов, кодируемых генами, перестраиваемыми в процессе дифференцировки. Однако, на различных стадиях развития и созревания NK-клетки экспрессируют разнообразные поверхностные молекулы и внутриклеточные сигнальные белки, типичные для клеток как миелоидного, так и лимфоидного происхождения, что приводит к формированию большой гетерогенности NK-клеток, циркулирующих в периферической крови (Kovalenko and Streltsova, 2016).

1.1.1 Развитие NK-клеток

Развитие NK-клеток детально изучено в мышинной модели. В отличие от мышинных клеток, гематопозитическая иерархия человеческих клеток охарактеризована менее четко (Scoville et al., 2019). Отсутствие аналога CD56 и экспрессия рецепторов Ly49 (killer cell lectin-like receptor subfamily A), функционально заменяющие рецепторы семейства KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) на поверхности мышинных NK-клеток (Lanier, 2003), препятствуют проведению точных аналогий с развитием натуральных киллеров у человека. Тем не менее, был достигнут существенный прогресс в понимании развития человеческих NK-клеток. Несмотря на различия в экспрессии антигенов между видами,

результаты анализов по дифференцировке человеческих предшественников *in vitro* выявили общие закономерности с данными, полученными в мышинной модели *in vivo*.

Ранее предполагалось, что костный мозг является основным местом развития как мышинных (Rosmaraki et al., 2001), так и человеческих NK-клеток (Renoux et al., 2015). Однако ранние лимфоидные предшественники человеческих NK-клеток, помимо костного мозга, были обнаружены в миндалинах (Freud et al., 2005), тимусе (McClory et al., 2012), печени (Moroso et al., 2011), пуповинной крови и тканях плода (Renoux et al., 2015) и лимфоузлах (Scoville et al., 2017), что говорит о возможности развития некоторых субпопуляций человеческих NK-клеток вне костного мозга.

Подобно дифференцировке мышинных NK-клеток, развитие человеческих NK-клеток связано с неслучайным, упорядоченным приобретением рецепторов (Freud et al., 2006). Было сделано предположение, что дифференцировка человеческих NK-клеток протекает дискретно. Однако, формирование предшественников NK-клеток осуществляется под контролем сложной комбинации транскрипционных факторов и цитокинов (Geiger and Sun, 2016). Из-за разной скорости потери либо приобретения экспрессии тех или иных маркеров, а также развития клеток в разных тканях и органах, стадии формирования натуральных киллеров трудно четко выделить (Scoville et al., 2019), поскольку могут образовываться NK-клетки с промежуточным фенотипом, которые можно отнести сразу к нескольким стадиям (Рис. 1).

Развитие NK-клеток, как и других лимфоцитов, начинается с гематопоэтической клетки-предшественника (HPC, hematopoietic progenitor cell), которая развивается в общий лимфоидный предшественник (CLP, common lymphoid progenitor). Затем происходит разделение путей развития лимфоцитов, и появляется предшественник NK-клеток (NKP, NK lineage restricted progenitor), который переходит в стадии незрелых NK-клеток (iNK, immature NK cell) и, впоследствии, в стадии зрелых NK-клеток (mNK, mature NK cell) (Рис. 1). Как у мыши, так и у человека формирование NKP из CLP происходит через промежуточную стадию предшественников NKP (pre-NKP), когда на поверхности клетки начинает экспрессироваться β -цепь рецептора к IL-2 и IL-15 (CD122, IL2R β , IL15R β) (Abel et al., 2018; Male et al., 2014). Развитие и поддержание человеческих NK-клеток требует передачи сигналов IL-15 через CD122 и общую γ -цепь рецептора (Diefenbach et al., 2014).

Ранее, процесс развития человеческих NK-клеток *in vivo* подразделяли на 4 стадии по уровню экспрессии CD34, CD117, CD94 и CD56 (Freud et al., 2006). Потом было выявлено, что первые две стадии в этой схеме относятся к ранним предшественникам ILC, развивающихся в миндалинах (Scoville et al., 2019). В одной из последних статей было описано шесть стадий развития человеческих NK-клеток. При этом стадии 2 и 4

дополнительно были разделены на две подстадии (Abel et al., 2018). В соответствии с этим делением pre-NKP образуют первую стадию развития (Рис. 1). На этой стадии клетки приобретают экспрессию CD244 (2B4), которая не исчезает в течение всего процесса развития. Вторая стадия развития характеризуется появлением экспрессии CD117 (c-Kit) и низкого уровня экспрессии рецептора к IL-1 β – IL1R1. При переходе клеток к стадии 2b формируются NKP. Далее экспрессия IL1R1 повышается и клетки переходят в стадию 3 – незрелых iNK. На этой стадии клетки начинают экспрессировать ряд рецепторов, таких как NKG2D, NKp46, NKp30 и CD161. Формирование стадии 4 сопровождается появлением экспрессии CD56. На этой стадии осуществляется превращение iNK в mNK. Фенотипические особенности NK-клеток на стадии 4a заключаются в высоком уровне экспрессии CD56 (CD56^{bright}), NKG2D, NKp46, NKp30, CD161 и NKG2A. Для стадии 4b характерно появление экспрессии NKp80. Клетки на стадии 5 и 6 относят к mNK. На стадии 5 происходит снижение экспрессии CD56 (CD56^{dim}) и появление экспрессии CD16 (Fc γ RIIA) и рецепторов KIR. Стадия 6 не является обязательной и формируется при образовании «адаптивных» NK-клеток после воздействия антигена. Стадии 5 и 6 подробно описаны в следующих главах.

Поиск и изучение транскрипционных факторов, влияющих на развитие NK-клеток, обычно проводят с помощью нокаутирования генов в мышинной модели. Поэтому большинство исследований содержат информацию о факторах, влияющих на развитие мышинных NK-клеток. Одним из основных транскрипционных факторов, определяющих развитие NK-клеток, является фактор Nfil3 (Nuclear factor, interleukin 3 regulated protein), известный также как E4BP4 (Kamizono et al., 2009). Первоначально он был идентифицирован как ген циркадных ритмов. В мышинной модели было показано, что при отсутствии экспрессии Nfil3 количество как iNK, так и mNK значительно снижается в периферической крови, а в костном мозге обнаруживаются только NKP (Gascoyne et al., 2009; Kamizono et al., 2009). После идентификации дополнительных фенотипических отличий между клетками CLP, pre-NKP и NKP было показано, что нокаутирование гена Nfil3 не оказывает влияния на количество CLP, тогда как абсолютное число клеток pre-NKP и NKP значительно снижается (Male et al., 2014). Оверэкспрессия этого фактора в клетках дикого типа приводит к увеличению количества NK-клеток (Gascoyne et al., 2009). С помощью лентивирусной модификации клеток CLP было показано, что фактор Nfil3 нужен для переключения развития CLP в сторону образования NK-клеток (Male et al., 2014). Эти результаты подтверждаются данными о том, что после переключения CLP на развитие NK-клеток, эти клетки уже не нуждаются в присутствии фактора Nfil3 (Firth et al., 2013). На основе этих данных сделано заключение, что, если транскрипционный

фактор, отличный от Nfil3, способен стимулировать образование НК-клеток из CLP в отсутствие Nfil3, это может указывать на то, что он действует на менее дифференцированные предшественники (Male et al., 2014).

Кроме Nfil3, на развитие НК-клеток влияют транскрипционные факторы Eomes, Id2 и T-bet и ряд других, которые начинают экспрессироваться уже после появления белка Nfil3 (Male et al., 2014). Более позднее появление факторов ДНК-связывающего ингибиторного белка 2 (Id2) и Eomes связано с тем, что фактор Nfil3 регулирует транскрипцию их генов (Male et al., 2014). При этом существует прямая связь между оверэкспрессией Nfil3 и увеличением экспрессии Eomes и Id2 (Male et al., 2014). Трансдукция Eomes и Id2 в Nfil3^{-/-} клетки костного мозга приводила к образованию НК-клеток, тогда как модификация клеток геном T-bet не приводила к развитию НК-клеток (Male et al., 2014.)

Фактор Id2 способствует образованию mNK, что подтверждено в Id2^{-/-} мышинной модели, где развитие клеток останавливается на стадии iNK и популяции mNK не образуются (Yokota et al., 1999). Транскрипционный фактор T-bet влияет на созревание НК-клеток. Он оказывает прямое действие на ряд промоторов, модифицирует эффекты других транскрипционных факторов и облегчает ремоделирование хроматина посредством регуляции активности гистон-метилтрансферазы. Ключевые гены, регулируемые T-bet в развитии и созревании НК-клеток, недостаточно четко определены (Jenne et al., 2009). T-bet стабилизирует состояние iNK-клеток. А потеря его экспрессии в мышинной модели приводит к увеличению экспрессии Eomes (Gordon et al., 2012). Основными факторами, приводящими к образованию mNK, являются Tox (thymocyte selection-associated high mobility group box protein) (Montaldo et al., 2016) и Eomes (Diefenbach et al., 2014). Eomes способствует дифференцировке mNK и ассоциирован с появлением на поверхности НК-клеток ингибирующих рецепторов (Gordon et al., 2012). Транскрипционный фактор Aiolos (IKZF3, IKAROS family zinc finger 3) изначально был обнаружен в В-клетках. Было описано его действие при формировании В-клеток памяти (Billot et al., 2010). Потом было выяснено, что человеческие mNK также экспрессируют этот фактор. При измерении уровня мРНК гена *AIOLOS* в субпопуляциях CD56^{bright} и CD56^{dim}, уровень экспрессии гена в клетках CD56^{dim} оказался значительно выше, чем в клетках CD56^{bright} (Billot et al., 2010). Поэтому было сделано предположение, что Aiolos может принимать участие в дифференцировке зрелых, циркулирующих НК-клеток человека.

Существует гипотеза, что отделение НК-клеток от линии ИЛС происходит на начальных стадиях развития при образовании NKP из CLP (Diefenbach et al., 2014). Таким

образом, развитие НК-клеток протекает независимо от клеток ILC. Одной из проблем изучения развития НК-клеток является фенотипическое сходство НК-клеток с ILC1, что затрудняет идентификацию клеток. В норме, в отличие от ILC, развитие НК-клеток не зависит от транскрипционного фактора GATA-3. Тем не менее, в некоторых статьях в мышинной модели было показано, что НК-клетки тимуса (Vosshenrich et al., 2006) и печени (Samson et al., 2003) развиваются по отличному от других НК-клеток пути развития, который характеризуется наличием транскрипционного фактора GATA-3, передачей сигналов через рецептор IL-7 (CD127), а также секрецией IFN- γ и гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в значительно более высоком количестве, чем в циркулирующих НК-клетках. Такие противоречивые данные могут быть связаны с тем, что при постановке экспериментов было невозможно эффективно отделить НК-клетки от ILC.

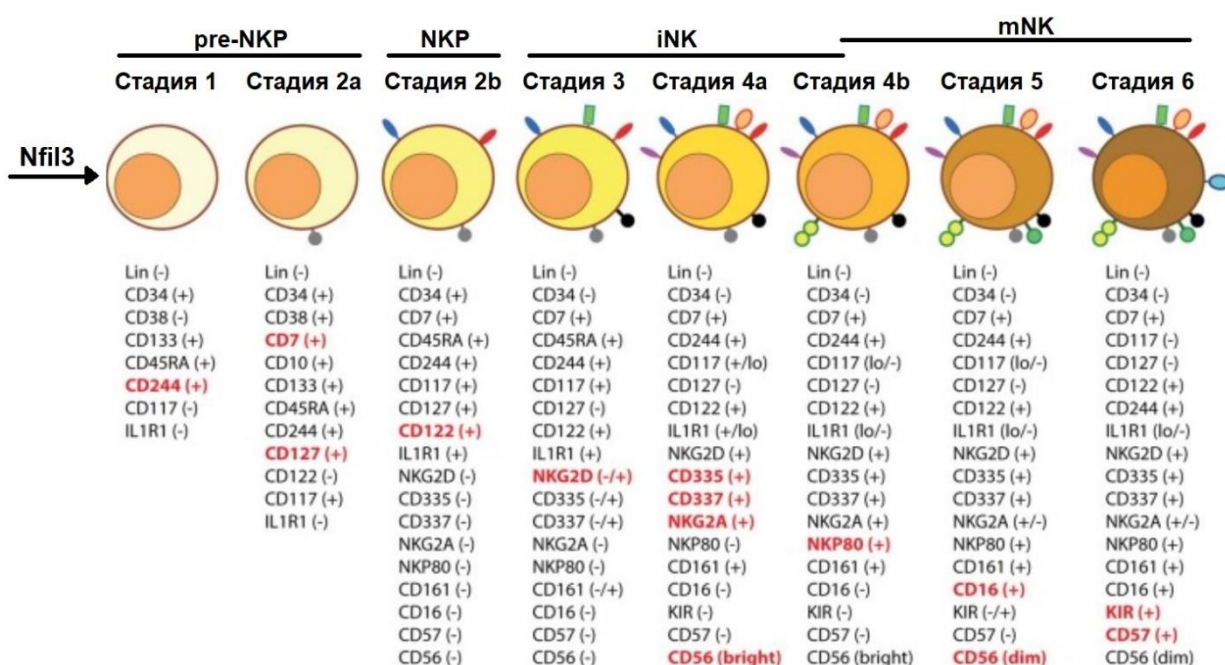


Рисунок 1. Стадии развития и дифференцировки НК-клеток по Abel с изменениями (Abel et al., 2018).

НК-клетки можно найти во многих тканях и органах, таких как селезенка, костный мозг, печень, матка, кожа, слизистые оболочки, почки, тимус, а также в периферической крови (Lysakova-Devine and O'Farrelly, 2014; Peng and Tian, 2017). На основе локализации зрелые НК-клетки подразделяют на ткане-резидентные (trNK-клетки) и конвенциональные (или обычные) (cNK-клетки), циркулирующие внутри организма (Рис. 1). Они отличаются как фенотипически, так и по выполняемым ими функциям. Формирование данных групп НК-клеток может быть опосредовано действием различных транскрипционных факторов и влиянием микроокружения (Yokoyma et al., 2013).

1.1.2 Типы зрелых NK-клеток

Зрелые NK-клетки, как правило, имеют фенотип $CD3^{-}CD19^{-}CD14^{-}CD56^{+}$ и подразделяются по уровню экспрессии CD56 на $CD56^{\text{bright}}$ и $CD56^{\text{dim}}$. Они выполняют цитотоксическую и цитокин-продуцирующую функции и являются одним из важнейших компонентов клеточного врождённого иммунитета. Фенотипические и функциональные характеристики данных клеток гетерогенны. Большинство trNK- и cNK-клеток выделяют значительное количество IFN- γ , однако высокий уровень цитотоксической активности проявляют только cNK-клетки и trNK-клетки печени (Peng and Tian, 2017). В зависимости от локализации trNK-клеток в организме, они дополнительно выполняют специфические функции.

1.1.2.1 Тканерезидентные NK-клетки

TrNK-клетки можно обнаружить во многих органах человека. TrNK-клетки оболочки матки являются наиболее распространенным лейкоцитом в месте имплантации эмбрионов, где они могут регулировать васкуляризацию плаценты и влиять на результат беременности (Croy et al., 2006).

Ткани печени содержат большое количество цитотоксически-активных trNK-клеток, для которых характерен высокий уровень продукции таких цитокинов как IFN- γ , фактора некроза опухоли α (TNF- α) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Около половины этих клеток имеют фенотип $CD56^{\text{bright}}$. Эти клетки атакуют активированные звездчатые клетки печени (Radaeva et al., 2006), которые могут продуцировать большое количество белков внеклеточного матрикса и приводить к фиброзу печени. Активированные NK-клетки печени могут непосредственно убивать гепатоциты, что приводит к травме печени (Ochi et al., 2004). Функции ткане-резидентных NK-клеток печени до конца не ясны. Исследования в мышинной модели показали, что trNK-клетки печени экспрессируют высокий уровень NKG2A, что приводит к снижению продукции IFN- γ и, тем самым, уменьшению противовирусной активности $CD8^{+}$ -Т-клеток (Krueger et al., 2017). Таким образом trNK-клетки печени обладают иммуно-регуляторным потенциалом.

Несмотря на то, что развитие NK-клеток является тимус-независимым, недавние исследования показывают, что тимус содержит особую субпопуляцию NK-клеток, фенотипически отличную от селезеночных NK-клеток (Vosshenrich et al., 2006), что подтверждается отсутствием этой субпопуляции у бестимусных мышей (Foxn1 $^{-/-}$). Также было показано, что для их развития необходим функциональный тимус (Yokoyama et al., 2013). Физиологическая функция trNK-клеток тимуса остается неясной. TrNK-клетки тимуса, как правило, менее эффективно убивают мишени, но лучше продуцируют

цитокины (Vosshenrich et al., 2006), что делает их сходными с cNK-клетками CD56^{bright}. (Vosshenrich et al., 2006). Была высказана гипотеза о том, что одна из стадий развития cNK-клеток CD56^{bright} может проходить в тимусе (Yokooyama et al., 2013).

В отличие от других trNK-клеток, trNK-клетки слюнных желез обладают уникальным фенотипом CD49a⁺CD49b⁺ (Cortez et al., 2014). Вполне вероятно, что эти клетки могут иметь регуляторную функцию для поддержания местного гомеостаза.

Недавние исследования показали, что trNK-клетки жировой ткани участвуют в повышении резистентности клеток к инсулину в модели ожирения, основанной на диете. TrNK-клетки способны продуцировать самое большое количество IFN- γ , по сравнению с другими trNK-клетками. Эти клетки проявляют высокий уровень цитотоксической активности против макрофагов типа M2, что способствует метаболическому расстройству (Boulenouar et al., 2017), для которого характерно повышение уровня растворимых провоспалительных цитокинов, хемокинов и различных стрессовых молекул.

Субпопуляция trNK-клеток, имеющая фенотип NKp44⁺CD103⁺CD56⁺CD3⁻, была недавно обнаружена внутри слизистой оболочки полости рта и кишечника (Fuchs et al., 2013). Подобно cNK-клеткам, эти клетки могут продуцировать IFN- γ в ответ на IL-12 и IL-15 и экспрессировать CD160, перфорин и гранзимы, демонстрируя потенциальную цитотоксическую активность (Fuchs et al., 2013).

1.1.2.2 Циркулирующие NK-клетки

К cNK-клеткам относят NK-клетки селезенки и циркулирующие в периферической крови NK-клетки. NK-клетки CD56^{bright} (CD117^{+/-}CD94⁺CD16⁻) имеют высокую способность к продукции цитокинов, но относительно низкую цитотоксичность по сравнению с CD56^{dim}-NK-клетками (CD117⁻CD94^{+/-}CD16⁺) (Kovalenko and Streltsova, 2016). NK-клетки CD56^{bright} более распространены в тканях новорожденных и в пуповинной крови (Dulphy et al., 2008). Напротив, CD56^{dim} -NK-клетки накапливаются позже в жизни и имеют более короткие теломеры по сравнению с CD56^{bright} NK-клетками (Chan et al., 2007; Ouyang et al., 2007; Romagnani et al., 2007). Поэтому и некоторым другим признакам их считают более дифференцированными.

Популяция NK-клеток CD56^{bright}CD16⁻ в периферической крови взрослого человека составляет в среднем 5-15% от общего количества циркулирующих NK-клеток (Michel et al., 2016). Эта субпопуляция состоит в основном из слабодифференцированных зрелых NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы NKG2A/CD94 и NKG2D. На их поверхности практически не встречаются рецепторы семейства KIR и отсутствует маркер CD57, наличие которого связывают с терминальной стадией дифференцировки NK-клеток (Bjorkstrom et al., 2010). Без дополнительной стимуляции NK-клетки CD56^{bright}

обладают более слабой цитотоксичностью, по сравнению с CD56^{dim}-NK-клетками (Poli et al., 2009), но секретируют большее количество цитокинов в ответ на такие растворимые стимулы, как IL-12 и IL-18 (Cooper et al., 2001). После активации IL-2 или IL-12 NK-клетки CD56^{bright} проявляют сходную или усиленную цитотоксичность против стандартных мишеней, по сравнению с NK-клетками CD56^{dim} (Farag et al., 2002). Более дифференцированная субпопуляция CD56^{dim} обычно экспрессирует Fcγ-рецептор IIIA, CD16, что позволяет данным клеткам проявлять не только натуральную, но и антителозависимую клеточную цитотоксичность. Ранее считалось, что без предварительной активации NK-клетки CD56^{dim} хуже продуцируют IFN-γ, однако в работе Andrea De Maria было показано, что обе популяции продуцируют IFN-γ в ответ на стимуляцию IL-2+IL-12+IL-15, однако пик продукции IFN-γ в субпопуляциях приходится на разное время. NK-клетки CD56^{dim} продуцируют IFN-γ уже через 2-4 часа, однако, через 16 часов секрецию IFN-γ в данной субпопуляции уже невозможно обнаружить. Напротив, NK-клетки CD56^{bright} выделяют IFN-γ только в поздние интервалы времени (через 16 ч после стимуляции). Такой быстрый ответ CD56^{dim} NK-клеток связан с наличием в их цитоплазме мРНК к IFN-γ (De Maria et al., 2011). Взаимодействие активирующих рецепторов с лигандами клеток-мишеней вызывает в клетках CD56^{dim} более интенсивную продукцию цитокинов, чем в клетках CD56^{bright}. Таким образом, в отличие от CD56^{bright}-NK-клеток, которые хорошо активируются посредством цитокинов, CD56^{dim}-NK-клетки эффективнее стимулируются с помощью контактных взаимодействий с клетками-мишенями (Fauriat et al., 2010).

1.1.2.2.1 Механизмы формирования субпопуляций NK-клеток CD56^{bright} и CD56^{dim}

Точно не известно, являются ли клетки CD56^{bright} и CD56^{dim} разными стадиями созревания одной клетки. Отсутствие в мышинной модели гомолога молекулы CD56 делает невозможным сравнительные исследования. Поэтому гипотезы развития субпопуляций NK-клеток человека основаны на исследованиях *in vitro*. Было предложено три возможных варианта. Первая модель строилась на предположении о том, что NK-клетки CD56^{bright} являются незрелыми предшественниками NK-клеток CD56^{dim}. По второй гипотезе, незрелые NK-клетки могут дифференцироваться либо в CD56^{bright}, либо в CD56^{dim}. Третья возможность заключается в том, что эти субпопуляции могут превращаться друг в друга в зависимости от микросреды. Большинство публикаций содержит результаты в пользу первой гипотезы. Ученые из группы Caligiuri опубликовали данные, свидетельствующие о линейной дифференцировке NK-клеток CD56^{bright} в NK-клетки CD56^{dim} (Freud et al., 2014). Однако некоторые работы свидетельствуют в пользу третьей гипотезы, поскольку, в частности, активированные CD56^{dim}CD16^{bright}-клетки могут

увеличивать экспрессию CD56 и терять экспрессию CD16. Так что, по крайней мере, часть из NK-клеток CD56^{bright} может быть не предшественниками CD56^{dim}, а активированными NK-клетками (Freud et al., 2014). Одним из аргументов в пользу второй гипотезы является наблюдение, что у пациентов с мутациями GATA2 нет NK-клеток CD56^{bright}, в то же время субпопуляция CD56^{dim}-NK-клеток образуется (Mace et al., 2013). Это селективное отсутствие CD56^{bright} NK-клеток косвенно подтверждает онтогенную независимость двух субпопуляций. Однако количество CD56^{dim}-NK-клеток у пациентов уменьшается и их функциональная активность снижена. Таким образом, CD56^{dim}-NK-клетки могут напрямую или косвенно зависеть от CD56^{bright}-NK-клеток (Mace et al., 2013). Было показано, что экспрессия GATA2 выше в клетках CD56^{bright} по сравнению с CD56^{dim}-NK-клетками, но это не доказывает, что сама экспрессия CD56 зависит от этого фактора транскрипции (Mace et al., 2013). Кроме того, у некоторых пациентов с мутациями GATA2 все же детектируется крайне малое количество CD56^{bright}-NK-клеток. Возможно, они могут также присутствовать у других пациентов в количестве ниже пределов обнаружения. Последующие исследования подтвердили существование чрезвычайно низкого количества CD56^{bright}-NK-клеток у людей с дефицитом GATA2 (Maciejewski-Duval et al., 2016). При изучении частичного дефицита экспрессии белка MCM4, необходимого для инициации репликации эукариотического генома, наблюдается селективная потеря CD56^{dim}-NK-клеток и неспособность NK-клеток CD56^{bright} пролиферировать в ответ на IL-2 или IL-15 (Gineau et al., 2012).

1.2 Рецепторы NK-клеток

Зрелые натуральные киллеры экспрессируют широкий набор активирующих и ингибирующих рецепторов, сигналы от которых формируют функциональный ответ NK-клеток на стимул. В число активирующих рецепторов входят рецепторы натуральной цитотоксичности NCR (natural cytotoxicity receptors), лектин-подобные рецепторы группы NKG2 (natural killer group 2) – NKG2D, NKG2C/CD94, а также многие другие (Campbell and Hasegawa, 2013; Kovalenko and Streltsova, 2016). Из большого количества ингибирующих рецепторов наиболее важными считаются гетеродимерный лектиновый рецептор С-типа NKG2A/CD94 и иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток семейства KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors).

1.2.1 Рецепторы натуральной цитотоксичности

К рецепторам натуральной цитотоксичности NCR относят рецепторы NKp46 (NCR1), NKp44 (NCR2) и NKp30 (NCR3), принадлежащие к суперсемейству иммуноглобулинов. Они являются основными активирующими рецепторами NK-клеток,

которые обеспечивают распознавание вирус-инфицированных и опухолевых клеток (Glasner et al., 2012). Моноклональные антитела против рецепторов NCR могут блокировать NK-опосредованный лизис множества опухолевых клеточных линий (Byrd et al., 2007). Также было показано, что экспрессия рецепторов этого семейства коррелирует со способностью клонов NK-клеток человека лизировать опухолевые линии (Sivori et al., 1999). Это косвенно свидетельствует о том, что лиганды рецепторов NCR экспрессируются многими трансформированными клетками. В последнее время было обнаружено множество потенциальных лигандов рецепторов NCR, которые обычно не экспрессируются на поверхности нормальных клеток. Гемагглютинин-нейраминидаза вирусов гриппа и парагриппа может связываться и активировать рецептор NKp46 (Mandelboim et al., 2001). Один из белков HCMV – pp65 может связываться с рецептором NKp30 и ингибировать его функции (Arnon et al., 2005). Также лигандами NKp30 являются молекулы BAG6 и B7-H6 (Brandt et al., 2009). Мембранный белок малярийного плазмодия участвует в ингибировании NCR-опосредованного лизиса инфицированных эритроцитов NK-клетками (Mavoungou et al., 2007). Было показано, что такие патогены, как вирус коровьей оспы, вирус иммунодефицита человека или вирус простого герпеса стимулируют экспрессию клеточных лигандов NCR в инфицированных клетках (Byrd et al., 2007). Таким образом, активация NK-клеток с участием рецепторов NCR опосредована широким спектром молекул. Однако условия связанного с этими рецепторами распознавания в модели *in vivo* на данный момент не до конца изучены (Horton and Mathew, 2015).

1.2.2 Лектин-подобные рецепторы

1.2.2.1 Лектин-подобные рецепторы NKG2x/CD94

Лектин-подобные гетеродимерные рецепторы NKG2x/CD94 (где x – A, B, C, E, или H) являются группой NK-клеточных рецепторов, которые узнают антигены МНС. Последовательности этих рецепторов сходны на 81-94% по аминокислотной последовательности их лектинового домена.

CD94-NKG2A – ингибирующий рецептор, который, как полагают, играет важную роль в предотвращении гиперактивации NK-клеток. CD94-NKG2C/E, активирующие рецепторы, присутствующие на NK-клетках и цитотоксических лимфоцитах, участвуют в узнавании опухолевых клеток (Beziat et al., 2011). Лигандами этих рецепторов являются неклассические молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA (human leukocyte antigen) HLA-E. В норме HLA-E связывается с пептидами, полученными из HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-G. Повышение экспрессии молекул HLA-E связано с различными

патологическими состояниями, которые приводят к подавлению экспрессии классических молекул HLA-I (Pegram et al., 2011). CD94/NKG2A связывается с ингибиторными мотивами на основе тирозина ITIM (Iwaszko and Bogunia-Kubik, 2011), тирозиновые фосфатазы дефосфорилируют окружающие тирозинкиназы и адаптерные белки, что и приводит к ингибированию NK-клеток. В противоположность этому, рецептор CD94-NKG2C, который также связывается с HLA-E, ассоциирован с активирующим адаптерным белком DAP12 – сигнальным полипептидом, который содержит иммунорецепторный мотив активации на основе тирозина (ITAM). Аффинность связывания активирующего рецептора NKG2C с HLA-E оказалась меньше, чем у ингибирующего рецептора NKG2A (Beziat et al., 2011). Причина, по которой рецепторы с противоположными функциями связываются с одинаковыми лигандами, остается не до конца ясной. Было показано, что в состоянии стресса клетка начинает представлять в составе HLA-E пептид, полученный из лидерной последовательности белка теплового шока 60 (hsp60). Молекулы HLA-E в комплексе с пептидом из hsp60 не распознаются ингибирующими рецепторами CD94/NKG2A, что приводит к снижению ингибирования NK-клеток (Michaëlsson et al., 2002). Это позволяет NK-клеткам, в том числе и адаптивным, лучше различать нормальные и измененные ткани (Michaëlsson et al., 2002). Повышенная экспрессия ингибирующего рецептора NKG2A в NK-клетках наблюдается при раке молочной железы и колоректальном раке. Наличие высокого уровня NKG2A ассоциируется с плохим прогнозом развития заболевания (Konjević et al., 2016). С другой стороны, снижение экспрессии активирующего рецептора NKG2C наблюдается при остром миелоидном лейкозе (Sanchez-Correa et al., 2011).

1.2.2.2 Активирующий рецептор NKG2D

Рецептор NKG2D – это гомодимер, являющийся трансмембранным гликопротеином типа II из семейства лектиноподобных белков. NKG2D является одним из наиболее значимых рецепторов, который узнает опухолевые клетки-мишени, экспрессирующие стресс-индуцируемые белки MICA/MICB и UL16-связывающие белки ULBP1-4 (Stern-Ginossar and Mandelboim, 2009). Эти стресс-индуцируемые белки могут быть обнаружены на клетках при злокачественной трансформации, в частности, при генотоксическом стрессе, однако могут появляться на клеточной поверхности и в здоровых тканях (López-Larrea et al., 2008). Экспрессия этих лигандов жестко контролируется как на транскрипционном, так и/или посттранскрипционных уровнях. Несбалансированная экспрессия лигандов может вызвать активацию иммунной системы и аутоиммунные реакции (Zafirova et al., 2011).

Рецептор NKG2D связан с трансмембранным белком DAP10. Короткий цитоплазматический домен DAP10 содержит мотив YxxM (где x обозначает любую аминокислоту), который после фосфорилирования связывается с p85-субъединицей фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3-киназа) и адаптерным белком Grb2. Было показано, что стимуляция человеческих NK-клеток растворимыми лигандами NKG2D приводит к активации тирозинкиназ JAK2, ERK, MAPK, фактора STAT5 и сингального пути PI3K/Akt (Sutherland et al., 2002). Хотя активация PI3K/Akt объясняется наличием мотива YxxM в DAP10, механизм, с помощью которого привлекаются другие сигнальные пути, требует дальнейшего изучения.

Снижение активности рецептора NKG2D может быть связано с развитием некоторых типов рака, например, рака молочной железы, рака легких, колоректального рака, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, рака желудка и меланомы (Konjević et al., 2016). Подавление рецептора NKG2D вызывают TGF- β и IL-10, экспрессируемые опухолевыми и иммуносупрессивными иммунными клетками, которые находятся в микроокружении опухоли: ассоциированными с опухолью макрофагами, супрессорными клетками миелоидного происхождения, регуляторными T-клетками (Treg) (Schiavoni et al., 2013). Кроме того, постоянная стимуляция рецептора NKG2D клеточно-ассоциированными лигандами, а также растворимыми лигандами, срезаемыми металлопротеиназами матрикса клеток-мишеней или в форме экзосом, может привести к функциональному истощению NK-клеток (Chitadze et al., 2013). Было также показано, что можно добиться подавления экспрессии NKG2D *in vitro* на NK-клетках, выделенных не только из периферической крови здоровых доноров, но и пациентов с метастатической меланомой. При добавлении к NK-клеткам опухолевых клеток K562 или FemX (Mirjačić Martinović et al., 2011) происходило уменьшение экспрессии рецептора NKG2D на поверхности клеток. Это указывает на то, что контакт NKG2D со своими лигандами, особенно у пациентов с меланомой, отвечает за уменьшение экспрессии данного активирующего рецептора.

1.2.3 Иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток KIR

1.2.3.1 Рецепторы семейства KIR

Рецепторы KIR представляют большое семейство NK-клеточных рецепторов, которое включает в себя 15 генов. Гены KIR2DL2/KIR2DL3 и KIR3DL1/KIR3DS1, ранее считавшиеся самостоятельными, в настоящее время рассматриваются как две пары аллелей (Varbanova et al., 2016). Рецепторы KIR различаются по специфичности к молекулам HLA за счет разной аффинности связывания различных вариантов HLA-I.

Продукты генов KIR представляют собой трансмембранные гликопротеины типа I, экспрессируемые на поверхности большинства NK-клеток и некоторых Т-клеток. Существуют две функционально разные группы рецепторов: ингибирующие (iKIR) и активирующие (aKIR). KIR состоят из двух (2D) или трех (3D) внеклеточных иммуноглобулин (Ig)-подобных доменов и различной по длине цитоплазматической части – длинной (L) или короткой (S) (Varbanova et al., 2016). Длина внутрицитоплазматической части определяет функцию соответствующего рецептора с некоторыми исключениями, в частности, KIR2DL4. Наличие длинного цитоплазматического хвоста с одним или двумя ITIM, с которыми взаимодействуют фосфатазы SHP, позволяет запустить сигнал, тормозящий активацию, и определяет их ингибирующую функцию в запуске клеточной цитотоксичности. Рецепторы с короткими цитоплазматическими участками не содержат ITIM, но имеют положительно заряженный остаток лизина в трансмембранном домене, что позволяет им связываться с активирующим адаптерным белком DAP12 (Lanier et al., 1998). KIR2DL4 содержит длинный цитоплазматический участок, который содержит мотив ITIM, на основе чего он был классифицирован в группу ингибирующих рецепторов. Однако этот рецептор способен связываться с активационной адаптерной молекулой FcεRIγ и, следовательно, может передавать активационные сигналы (Kikuchi-Maki et al., 2005; Rajagopalan et al., 2001).

У людей гены KIR образуют два гаплотипа – гаплотипы А и В, которые различаются по количеству и типам генов (Uhrberg et al., 1997). Гаплотипы группы А содержат до 7 генов (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DL4, KIR2DS4), большинство из которых кодируют ингибирующие рецепторы, а KIR2DS4 и KIR2DL4 являются единственными активирующими рецепторами в этой группе. Кроме того, они характеризуются небольшими вариациями в количестве генов, однако для них характерен аллельный полиморфизм. Интересно отметить, что многие организмы с гаплотипом А несут нулевые варианты KIR2DS4 и KIR2DL4, которые не экспрессированы на поверхности клетки (Rajagopalan et al., 2001). Теоретически у таких людей не должно быть активирующих рецепторов KIR. Гаплотипы группы В характеризуются большим разнообразием как количества, так и аллельных вариаций генов. В дополнение к основным генам (KIR2DL4, KIR3DL2, KIR3DL3), люди с данным генотипом имеют один или несколько активирующих (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS5, KIR3DS1) и ингибирующих (KIR2DL2, KIR2DL5A, KIR2DL5B) генов.

Молекулы HLA-C являются основными представителями HLA-I, влияющими на активность NK-клеток, путем связывания с ингибирующими рецепторами KIR2D. Существует два варианта эпитопов, связывающихся с HLA-C – C1 и C2, обладающих

диморфизмом в положениях 77 и 80 в α 1-спирали тяжелой цепи HLA-I. Лиганды HLA-C группы 1 (C1) содержат серин и аспарагин в 77 и 80 положениях (Ser77 и Asn80), тогда как лиганды группы 2 HLA-C (C2) как правило имеют в этих положениях аспарагин и лизин (Asn77 и Lys80) (Mandelboim et al., 1996). Эпитопы группы C1 специфически связываются с ингибирующими рецепторами KIR2DL2/3, тогда как молекул из группы C2 являются лигандами ингибирующего рецептора KIR2DL1 (Winter and Long, 1997). Недавние данные исследований *in vitro* показали, что KIR2DL2/2DL3 также может связывать определенные эпитопы HLA-C2 и некоторые HLA-B аллотипы, но с очень низким сродством (Moesta et al., 2008). Существует иерархия в силе ингибирующих сигналов, индуцируемых взаимодействиями между рецепторами KIR и их лигандами HLA-C. Связывание лигандов C2 с KIR2DL1 приводит к сильному ингибированию, тогда как взаимодействие C1 с KIR2DL2 и KIR2DL3 генерирует промежуточные и слабые ингибирующие сигналы соответственно (Moesta et al., 2008).

1.2.4 Рецептор антитело-зависимой клеточной цитотоксичности CD16.

Рецептор CD16 (Fc γ RIII) распознает константный участок (Fc-фрагмент) молекулы IgG, связанной с антигеном на поверхности клетки-мишени. CD16 в основном представлен на поверхности CD56^{dim}-NK-клеток (Cooper et al., 2001) и является единственным рецептором, способным инициировать активацию NK-клеток самостоятельно (Yenan T. Bryceson et al., 2006). Этот рецептор запускает антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC – antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) NK-клеток в отношении опухолевых клеток, а также участвует в вовлечении последних в апоптоз после цитотоксической реакции (Konjević et al., 2016). При взаимодействии с Fc-фрагментом антитела происходит димеризация Fc γ RIII, приводящая к фосфорилированию последовательности ITAM в его цитоплазматической части, что обуславливает активацию Src-киназ. Эти киназы фосфорилируют ζ - или Fc ϵ RI γ -цепи, что приводит к активации PI3K (Ochoa et al., 2017). Плотность опсонизации клетки-мишени антителами является критическим фактором в этом процессе. Полиморфизм Fc γ RIIIA может повлиять на реакцию ADCC. NK-клетки, гомозиготные по аллелю CD16-158V, демонстрируют более высокое сродство к Fc части антитела IgG1, что приводит к более сильной антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (Cartron et al., 2002).

1.2.5 Взаимодействие активирующих и ингибирующих рецепторов

Формирование цитотоксического ответа зависит от комбинации активирующих и ингибирующих рецепторов, расположенных на поверхности NK-клетки. При контакте с клетками-мишенями может активироваться множество разнообразных рецепторов, что

требует согласованности различных сигналов между собой. До недавнего времени не было известно, существует ли избыточность или иерархия среди рецепторов активации НК-клеток, и действуют ли рецепторы независимо друг от друга. В настоящий момент принята гипотеза о том, что сигналы от активирующих рецепторов не доминируют друг над другом. Вместо того, чтобы формировать иерархию, активирующие рецепторы объединяются в синергические пары. Например, часть активирующих рецепторов (2B2, CD16, NKG2D и DNAM-1) запускают внутриклеточные каскады, которые в итоге приводят к активации одного и того же адаптерный белок – SLP-76 (Long et al., 2013).

Данные, полученные с помощью первичных не стимулированных НК-клеток показали, что кроме CD16, другие рецепторы, включая NKp46, 2B4, NKG2D, DNAM-1 и CD2, не могут вызывать ответ самостоятельно (Bryceson et al., 2006). Например, стимуляция первичных покоящихся НК-клеток антителами к NKp46 была недостаточной для активации дегрануляции (Y T Bryceson et al., 2006). Однако, в сочетании с сигналами от любого из рецепторов (2B4, DNAM-1, NKG2D или CD2), NKp46 индуцировал дегрануляцию. Требование нескольких сигналов активации может служить защитой от гиперактивации НК-клеток. Например, активация через 2B4 является достаточной для индукции секреции IFN- γ самостоятельно. В сочетании с синергическим рецептором-партнером 2B4 подает сигнал к более высокой секреции IFN- γ , а также сигнал для продукции дополнительных цитокинов и хемокинов (Fauriat et al., 2010).

Контроль реактивности НК-клеток осуществляется с помощью ингибирующих рецепторов, специфичных для основных молекул HLA-I. Они содержат участки ITIM, которые фосфорилируются при контакте с рецепторами и взаимодействуют с тирозинфосфатазами SHP-1 и SHP-2. Отрицательные сигналы от ингибирующих рецепторов доминируют над активирующими сигналами. В результате, функциональный результат взаимодействия как активирующих, так и ингибирующих рецепторов смещен в пользу ингибирования. Но, вместо того, чтобы блокировать последствия от сигналов активации, ингибирующие рецепторы полностью предотвращают появление сигналов активации. Торможение действует локально, так как блок распространяется только на включенные рецепторы активации и не влияет на реакции НК-клеток на другие раздражители (Eriksson et al., 1999). Крайне любопытным исключением является хемокиновый рецептор CX3CR1, который не только передает сигналы в присутствии активации ингибирующих рецепторов, но также преодолевает ингибирование других сигналов активации НК-клеток (Pallandre et al., 2008). Причина такого необычного свойства CX3CR1 неизвестна.

1.3 Функциональные характеристики НК-клеток

Важнейшими функциями НК-клеток в организме является секреция цитокинов и хемокинов, способных регулировать иммунные реакции как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и цитотоксическая активность по отношению к клеткам, лишенным экспрессии HLA-I или гиперэкспрессирующим активизирующие лиганды.

1.3.1 Продукция цитокинов

НК-клетки способны продуцировать значительные количества цитокинов, таких как IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10, IL-5 и IL-13 и хемокинов, таких как MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8 и RANTES (Fauriat et al., 2010). IFN- γ – это один из наиболее важных цитокинов, секретируемых НК-клетками, и играет решающую роль в противовирусной, антибактериальной и противоопухолевой активности. Натуральные киллеры являются основными производителями IFN- γ на ранних стадиях иммунного ответа (Biron et al., 1999). Выделение IFN- γ может быть инициировано в НК-клетках в результате контакта и распознавания клеток-мишеней после активации взаимодействиями с другими иммунными клетками, в частности, с дендритными клетками (DC) и макрофагами, или под действием различных цитокинов, в частности, IL-12, IL-18 и IL-2, продуцируемых на разных стадиях инфекции и воспаления (Wang et al., 2000). Также существует множество данных о том, что активированные с помощью IL-2, IL-21 или их комбинации НК-клетки продуцируют значительный уровень IFN- γ (de Rham et al., 2007; Denman et al., 2012; Li et al., 2015).

1.3.2 Цитотоксичность НК-клеток

Способность НК-клеток распознавать опухолевые или инфицированные вирусом клетки обусловлена экспрессией различных активирующих и ингибирующих рецепторов (Lanier, 2005). Основными рецепторами-ингибиторами цитотоксической активности НК-клеток являются рецепторы KIR и гетеродимер CD94/NKG2A. Рецепторы KIR распознают HLA-B и HLA-C, экспрессирующиеся на поверхности неизмененных клеток человека. Гетеродимер CD94/NKG2A распознает молекулы HLA-E. Интересно, что в организме человека существуют клетки с низким или полным отсутствием экспрессии HLA-I. Например, человеческие эритроциты не экспрессируют HLA-I, однако НК-клетки не проявляют цитотоксической активности в отношении последних. Это происходит из-за отсутствия на поверхности эритроцитов активирующих лигандов для НК-клеток (Lanier, 2005).

Активирующие рецепторы НК-клеток включают в себя NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D, NKG2C, DNAM-1 и Fc γ RIIIA/CD16A (Ochoa et al., 2017).

НК-клетки используют различные механизмы для киллинга измененных клеток. Механизм грануло-опосредованной цитотоксичности реализуется путем выделения цитоплазматических гранул с перфорином и гранзимами при непосредственном контакте с клеткой-мишенью (Wallin et al., 2003). Так как НК-клетки содержат готовые гранулы с гранзимами и перфорином, секреция последних осуществляется в считанные минуты после распознавания (Lanier, 2005). Изучение уровня дегрануляции НК-клеток используется для косвенного измерения цитотоксической активности. Во время дегрануляции НК-клеток на их поверхности временно появляются лизосомальные мембранные белки LAMP-1 (CD107a) и LAMP-2 (CD107b). Поверхностная экспрессия LAMP-1 используется для измерения цитолитической функции НК-клеток (Alter et al., 2004). После высвобождения перфориона, он полимеризуется и образует поры в клеточной мембране клеток-мишеней, что облегчает прохождение гранзимов. Гранзимы представляют собой сериновые протеазы, которые активируют молекулы каспаз, что приводит к индукции апоптоза клеток-мишеней (Pardo et al., 2002).

При столкновении НК-клеток с клетками, опсонизированными антителами, происходит запуск ADCC, опосредованной взаимодействием рецептора CD16 с конститутивной частью антитела - Fc-фрагментом (Campbell and Hasegawa, 2013; Ochoa et al., 2017).

ADCC, возможно, принимает участие в физиологическом противоопухолевом эффекторном иммунном ответе и может быть использована с терапевтической целью. В последнее время было разработано более 15-ти видов моноклональных антител, нацеленных на антигены поверхности опухолевых клеток. Одним из них является антитело Ритуксимаб (анти-CD20), которое было одобрено FDA в 1997 году для лечения неходжкинской лимфомы (Ochoa et al., 2017).

Кроме того, НК-клетки продуцируют фактор некроза опухоли TNF (tumor necrosis factor) и экспрессируют TNF-родственные апоптоз-индуцирующие лиганды, такие как TRAIL и FasL, приводящие к апоптозу опухолевых клеток после взаимодействия с соответствующими рецепторами (Baetu and Hiscott, 2002; Wallin et al., 2003).

Иммунные клетки могут продуцировать экзосомы, которые могут участвовать в противоопухолевой иммунной защите (Shoae-Hassani et al., 2017). Недавние исследования показали, что как покоящиеся, так и активированные человеческие НК-клетки секретируют экзосомы, которые содержат CD56 и несколько других НК-клеточных маркеров, таких как NKp30, NKp44, NKG2D и NKp46 (Lugini et al., 2012). Эти экзосомы также содержат FasL и перфорин и могут проявлять цитотоксическую активность против различных линий опухолевых клеток человека.

1.3.3 «Обучение» НК-клеток как механизм развития толерантности к нормальным клеткам организма

Обычно НК-клетки не проявляют цитотоксической активности против нормальных клеток организма. Однако, в отличие от наивных CD8⁺-Т-клеток, они конститутивно экспрессируют перфорин, гранзимы. Ряд жестких механизмов препятствует случайной активации НК-клеток в организме. Один из механизмов связан с так называемым обучением НК-клеток. Суть обучения состоит в том, что цитотоксический потенциал приобретают только НК-клетки, узнающие собственные молекулы HLA организма посредством хотя бы одного ингибирующего рецептора (Höglund and Brodin, 2010). НК-клетки, не отвечающие этим условиям, остаются гипореактивными и неспособны лизировать клетки-мишени, хотя у них сохранена экспрессия перфорина/гранзимов, а также способность секретировать цитокины (Anfossi et al., 2006). Описанный механизм позволяет предотвратить случайное повреждение здоровых клеток организма. Обучение НК-клеток имеет ряд важных отличий от обучения Т-клеток: 1) оно не сопровождается перестройкой генов мишень-распознающих рецепторов; 2) НК-клетки, не проконтактировавшие с HLA-I, не погибают, а циркулируют в крови в составе субпопуляции CD56^{dim}CD16⁺; 3) литическая функция не прошедших обучение НК-клеток может быть восстановлена под действием цитокинов, вырабатываемых, например, при острых вирусных инфекциях (Sun et al., 2009).

Существует три основных модели обучения. Первая из них – модель «разоружения». Изначально НК-клетки функционально полноценны, но при потере ингибирующих рецепторов становятся гипореактивными (Gasser and Raulet, 2006). Другая модель, известная как реостатная модель, основана на том, что приобретение НК-клетками цитотоксической способности не подчиняется закону «все или ничего», а зависит от числа и аффинности экспрессирующихся на поверхности ингибирующих рецепторов (Brodin et al., 2009). В соответствии с данной моделью, реакция НК-клеток подстраивается под уровень экспрессии собственных молекул HLA-I, экспрессированных на клетке. Образование функционально-активных НК-клеток является количественным процессом, который зависит от силы активирующего или ингибирующего сигнала, полученного НК-клеткой (Brodin et al., 2009). Активация НК-клеток происходит в том случае, когда сигнал от активирующих рецепторов превышает сигнал от ингибирующих. Напротив, хроническая сильная стимуляция без ингибирующего сигнала приводит к гипореактивности НК-клеток (Brodin et al., 2009). Третья модель называется модель «вооружения», или «лицензирования», согласно которой НК-клетки исходно функционально неполноценны, и только после взаимодействия ингибирующих

рецепторов с молекулами HLA-I NK-клетки «приобретают лицензию» на выполнение цитотоксических функций (Gasser and Raulet, 2006; Tu et al., 2016). Большинство ученых в последнее время склоняются в пользу этой модели. Лицензирование NK-клеток зависит от экспрессии рецепторов KIR, а экспрессия ингибирующего рецептора CD94/NKG2A может подавляться рецепторами KIR (Höglund and Brodin, 2010). Несмотря на то, что лицензирование важно для приобретения эффекторных функций, нелицензированные NK-клетки, по-видимому, эффективно реагируют на клетки-мишени в определенных условиях. Например, активация нелицензированных NK-клеток происходит при встрече с клетками-мишенями, которые экспрессируют высокие уровни HLA-I. Эта способность обнаруживать опухоли и вирусы, оверэкспрессирующие HLA-I, может быть причиной того, что до 50% NK-клеток не лицензируются, но сохраняются в организме (Anfossi et al., 2006).

1.4 Терминальная дифференцировка и старение NK-клеток

1.4.1 Дифференцировка зрелых NK-клеток

Дифференцировка NK-клеток может быть индуцирована различными способами, такими как рецепция цитокинов, контактные взаимодействия и влияние микроокружения, в том числе и патогенного. В процессе дифференцировки генерируется значительное разнообразие NK-клеток, тесно связанное с их функциями. В группе Hogowitz для изучения разнообразия репертуара NK-клеток был применен мультипараметрический анализ, включающий оценку 35 параметров, в том числе экспрессии 28 рецепторов, NK-клеток периферической крови, полученной от пяти пар монозиготных близнецов и двенадцати неродственных доноров, генотипированных по HLA и рецепторам KIR. Этот анализ выявил огромную степень разнообразия NK-клеток – более чем 100000 фенотипически различных NK-клеток. Генетические особенности доноров в значительной степени определяли экспрессию ингибирующих рецепторов, тогда как различия экспрессии активирующих рецепторов было обусловлено влиянием окружающей среды (Hogowitz et al., 2013).

Этапы созревания NK-клеток могут прослеживаться по уменьшению уровня экспрессии CD94 и появлению на поверхности одного или более типов рецепторов KIR и рецептора CD16 (Рис. 2). Маркер CD57 приобретает NK-клетками на поздних стадиях созревания и выделяет терминально дифференцированные клетки с высокой цитолитической активностью, но низким пролиферативным потенциалом (Moretta, 2010). Другими маркерами степени дифференцировки зрелых циркулирующих NK-клеток, помимо CD57, являются молекулы NKG2A и CD62L. Дифференцировка зрелых NK-

клеток характеризуется постепенной сменой поверхностных рецепторов. Клетки постепенно теряют такие маркеры как: CD94/NKG2A и начинают экспрессировать молекулу рецепторы CD16, CD94/NKG2C и рецепторы KIR, появление которых считается необратимым изменением как *in vivo*, так и *in vitro* (Beziat et al., 2013; Bjorkstrom et al., 2010; Lopez-Vergès et al., 2010). До недавнего времени процесс дифференцировки NK-клеток CD56^{dim} считался однонаправленным (Bjorkstrom et al., 2010), экспрессия NKG2A может быть восстановлена, а вот появление на поверхности молекулы CD57 является необратимым (Bjorkstrom et al., 2010). Однако, по последним данным, NK-клетки обладают значительной пластичностью в экспрессии рецепторов, что свидетельствует о том, что имеющиеся представления о процессе дифференцировки NK-клеток в будущем могут быть скорректированы.

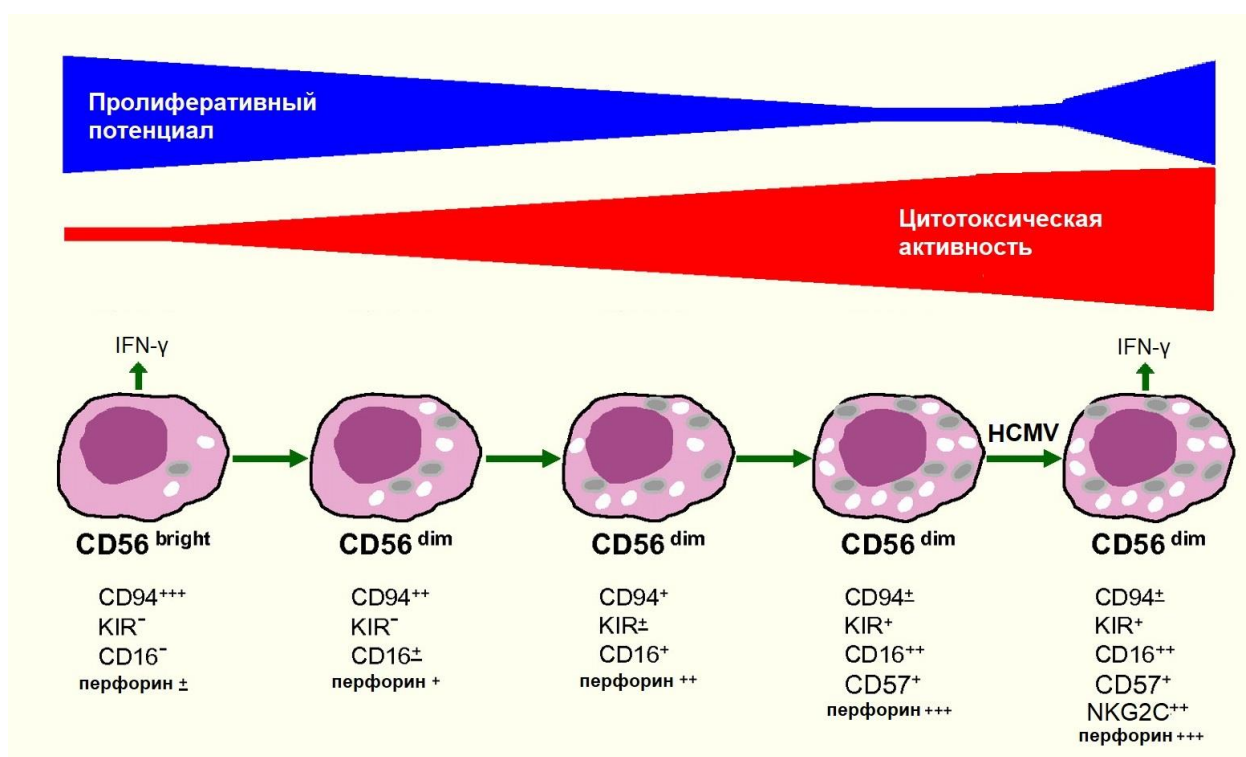


Рисунок 2. Дифференцировка зрелых NK-клеток по Moretta с изменениями (Moretta, 2010).

1.4.2 Развитие «адаптивных» NK-клеток

«Адаптивные» NK-клетки обладают свойствами, не типичными для клеток врожденного иммунитета, которые ранее считали уникальными для адаптивного иммунитета. Для них характерно увеличение продолжительности жизни и экспансии в ответ на патоген, повышенная антитело-зависимая цитотоксичность, ограниченная антигенная специфичность и более интенсивный ответ при повторной встрече с антигеном, ассоциированный с реконfigurацией NK-клеточного репертуара (Muntasell et al., 2013). Образование адаптивных NK-клеток связано с изменениями в эпигенетическом

профиле, изменениями в экспрессии ключевых транскрипционных факторов и сигнальных адаптерных молекул.

В литературе описано четыре различных варианта образования адаптивных НК-клеток: гаптен-индуцированные мышинные НК-клетки печени; мышинные НК-клетки, индуцированные в условиях лимфопении; CMV-специфичные мышинные и человеческие НК-клетки и цитокин-индуцированные человеческие НК-клетки, полученные в условиях длительной стимуляции IL-12, IL-15 и IL-18 (Geary and Sun, 2017). Наиболее известный тип адаптивных НК-клеток ассоциирован с инфекцией цитомегаловируса (CMV). Было показано, что при заражении и/или реактивации цитомегаловирусной инфекции в периферической крови пациентов нередко происходит увеличение количества НК-клеток, экспрессирующих рецептор NKG2C и маркер терминальной дифференцировки CD57 (Guma et al., 2004; Muntasell et al., 2013).

Приобретение НК-клетками черт адаптивности, или иммунологической памяти, сопровождается различными фенотипическими изменениями (Рис. 3). Одним из ярких фенотипических признаков CMV-индуцированных адаптивных НК-клеток является, как уже сказано выше, увеличенная экспрессия активирующего рецептора NKG2C. Наряду с этим, в таких клетках понижена экспрессия ингибирующего рецептора NKG2A. Эти адаптивные НК-клетки обладают фенотипом CD56^{dim}CD16⁺, негативны по CD161, но, как правило, экспрессируют CD57, рецепторы KIR и LILRB1, т.е. обладают признаками высокой степени дифференцировки (Guma et al., 2004; Kovalenko and Streltsova, 2016; Sandra Lopez-Vergès et al., 2011).

Было замечено, что у серопозитивных по CMV доноров есть НК-клетки, у которых снижена экспрессия трансмембранной адаптерной молекулы FcεRIγ. Эта адаптерная цепь необходима для работы рецепторов натуральной цитотоксичности NKp30 и NKp46, что приводит к низкому уровню поверхностной экспрессии этих рецепторов в адаптивных НК-клетках (Hwang et al., 2012). Экспрессия адаптерной молекулы CD3ζ в адаптивных клетках во многом заменяет FcεRIγ, например, при сборке рецептора CD16. Это приводит к увеличению антитело-зависимой цитотоксичности (Lee et al., 2015; Muntasell and Pupuleku, 2016). В адаптивных НК-клетках снижается экспрессия субъединиц рецепторов IL-12β2 и IL-18Rβ, что приводит к уменьшению уровня реагирования на IL-12 и IL-18 (Tesi et al., 2016).

Инфекция CMV индуцирует стабильные эпигенетические изменения в НК-клетках (Tesi et al., 2016), которые характеризуются изменением метилирования отдельных генов. Характер эпигенетических изменений в адаптивных НК-клетках сходен с программой, запускаемой при образовании цитотоксических Т-клеток памяти (Lee et al., 2015; Schlums

et al., 2015). При развитии адаптивных NK-клеток снижается экспрессия внутриклеточных сигнальных молекул SYK и EAT-2, характерных для миелоидных клеток, тогда как экспрессия ZAP-70 и SAP, типичных для Т-клеток, остается неизменной (Schlums et al., 2015). Также было показано метилирование гена ZBTB16, кодирующего транскрипционный фактор PLZF, что приводит к ингибированию экспрессии PLZF. Одновременно наблюдается увеличение экспрессии генов *IFNG* и *TNFA*, кодирующих IFN- γ и TNF- α , что приводит к увеличению продукции этих цитокинов в результате CD16-опосредованной активации (Luetke-Eversloh et al., 2014).

Приблизительно 4% всех людей имеют гомозиготную делецию гена, который кодирует NKG2C (NKG2C^{-/-}). Однако среди NK-клеток таких доноров были найдены изменения, характерные для адаптивных NK-клеток, включая терминально дифференцированный фенотип, функциональное перепрограммирование и эпигенетическое ремоделирование промотора интерферона (IFN)- γ (Liu et al., 2016). Было показано, что как для NKG2C-позитивных, так и для NKG2C-негативных адаптивных NK-клеток важно наличие высокого уровня экспрессии CD2 – костимуляторной молекулы, вероятно, обеспечивающей «сигнал 2» при CD16-опосредованном распознавании комплекса антитела с антигеном (Liu et al., 2016).

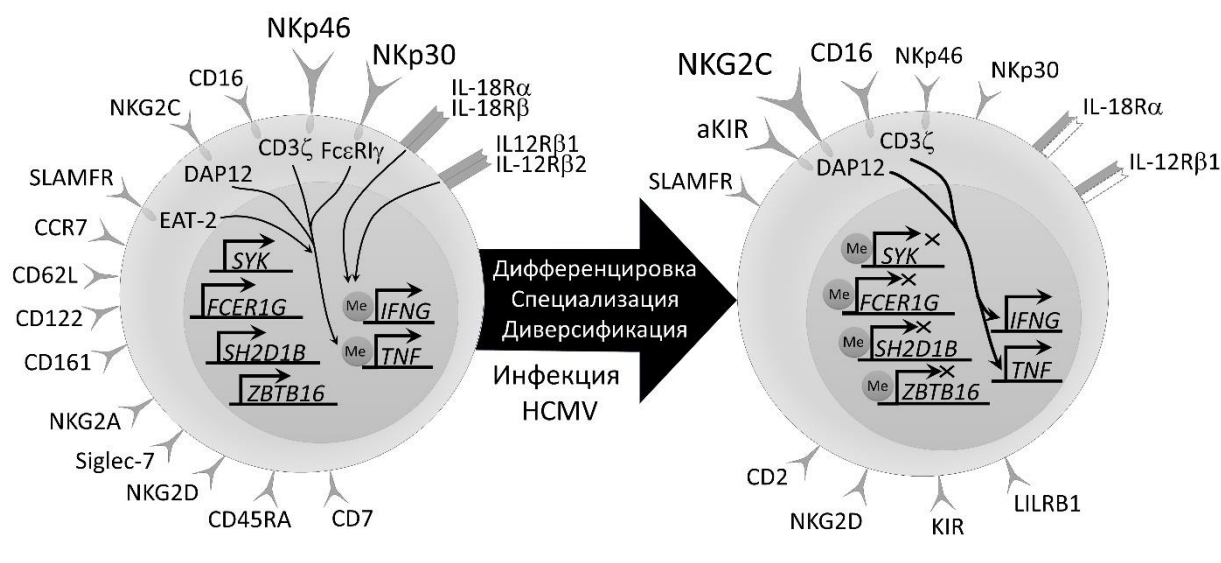


Рисунок 3. Изменения NK-клеток, связанные с приобретением адаптивных свойств по Kovalenko and Streltsova, 2016. Me – гиперметилирование участков ДНК. (Kovalenko and Streltsova, 2016).

1.4.3 «Старение» NK-клеток

В большинстве случаев, когда в литературе упоминается клеточное старение, в первую очередь имеются в виду репликативное старение, т.е. потеря способности к

делению. В 1961 году Хэйфлик Л. и Мурхед П. выяснили, что нормальные фибробласты человека могут размножаться ограниченное число раз, и этот предел запрограммирован (Hayflick and Moorhead, 1961). Были проведены поиски маркеров клеточного старения, характерных для разных типов клеток. В качестве маркера репликативного старения НК-клеток был предложен CD57. Клетки CD57⁺ имеют более короткие теломеры, по сравнению с клетками CD57⁻, низкую активность теломеразы, слабую экспрессию генов, связанных с клеточным циклом, и ограниченную пролиферативную способность (Nielsen et al., 2013). Показано, что во время эмбрионального развития организма НК-клетки негативны по CD57, после рождения и с увеличением возраста доля CD57⁺-НК-клеток возрастает (Nielsen et al., 2013).

Маркер CD57 представляет собой терминально сульфатированный углеводный эпитоп, экспрессия которого на клеточной поверхности связана с активностью глюкуронилтрансферазы B3GAT1 (Mitsumoto et al., 2000). Появление молекул CD57 на НК-клетках обычно связано с поздними стадиями клеточной дифференцировки. По сравнению с клетками CD57⁻, CD57⁺-НК-клетки хуже пролиферируют в ответ на IL-2 и IL-15 и продуцируют меньше IFN- γ в ответ на IL-12 и IL-18 (Nielsen et al., 2013).

Было показано, что увеличение уровня CD57 ассоциировано с значительным снижением уровня экспрессии IL-18R α и IL-2R β , но не IL-12R β (Bjorkstrom et al., 2010). Кроме этого, CD57⁺-НК-клетки демонстрировали более низкий уровень экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3, CXCR4 и CCR5, а также активирующих рецепторов NKp46 и NKp30, по сравнению с НК-клетками CD57⁻CD56^{dim}. Появление маркера CD57 и рецепторов KIR на поверхности НК-клеток была ассоциирована с изменениями в экспрессии LILRB1, NKG2C, CD62L и KLRG1 (Bjorkstrom et al., 2010). Эти изменения могут быть связаны с развитием пула адаптивных НК-клеток.

Как и в других клетках млекопитающих, концевые участки хромосом в НК-клетках содержат теломеры, специализированные структуры, которые состоят из повторяющихся последовательностей TTAGGG и ряда взаимодействующих с этими участками белков (Mouzis et al., 1988). В большинстве человеческих клеток число повторов теломер весьма гетерогенно и составляет от 3 до 20 кб, в зависимости от типа ткани, возраста донора и репликативной истории клеток. Связанные с теломерами белки образуют комплекс, защищающий хромосомы от плавления и от ошибок распознавания сигналов разрыва и повреждения ДНК (Ouyang et al., 2007). С каждым циклом репликации теломеры сокращаются (Nastie et al., 1990) и в конечном итоге достигают критической длины, что вызывает индукцию p53-опосредованного механизма остановки пролиферации. Таким образом, укорочение теломер работает как «молекулярные часы», которые накладывают

ограничение на пролиферативный потенциал. Клетки, обладающие высоким пролиферативным потенциалом, как правило, экспрессируют белок каталитической субъединицы теломеразы (hTERT, human telomerase reverse transcriptase), который обладает способностью удлинять теломеры путем добавления одноцепочечной теломерной ДНК к 3' концам хромосом (Lingner et al., 1997). Часть клеток иммунной системы обладают высоким пролиферативным потенциалом. Для них была обнаружена зависимость между укорочением теломер и продолжительностью жизни (Ouyang et al., 2007). Уровень эндогенной активности теломеразы в НК-клетках недостаточен для полного восстановления длины теломер. Средняя длина теломер у НК-клеток уменьшается с возрастом (Ouyang et al., 2007). Было показано, что НК-клетки CD56^{bright} подвергались значительно меньшему числу клеточных делений *in vivo* по сравнению с клетками CD56^{dim} (Chan et al., 2007; Ouyang et al., 2007; Romagnani et al., 2007).

Как уже было указано выше, циркулирующие в периферической крови НК-клетки обладают низким уровнем теломеразной активности, что и приводит к быстрому укорочению теломер. Удлинение длины теломер и увеличение продолжительности жизни *in vitro* можно добиться с помощью увеличения теломеразной активности за счет искусственного внедрения гена теломеразы в различные клетки (Vodnar et al., 1998). В работе Фуджизаки было показано, что НК-клетки здоровых людей, трансдуцированные ретровирусным вектором, экспрессирующим hTERT, обладают большей продолжительностью жизни в культуре клеток, по сравнению с контрольными клетками (H Fujisaki et al., 2009).

1.5 Подходы к использованию НК-клеток в противоопухолевой иммунотерапии

НК-клетки являются потенциальными эффекторными клетками в иммунотерапии рака (Baggio et al., 2017; Shook and Campana, 2011). Активированные *in vitro* НК-клетки проявляют цитотоксичность против ряда гематологических злокачественных новообразований, включая острый миелоидный лейкоз (AML) (Fauriat et al., 2007; Lotzová et al., 1987; Stringaris et al., 2014), острый лимфоидный лейкоз (ALL) (Jin et al., 2016; Pfeiffer et al., 2007; Rouse et al., 2016; Satwani et al., 2014), множественную миелому (ММ) (Davies et al., 2001; El-Sherbiny et al., 2007; Shah et al., 2013; Swift et al., 2012), а также многих солидных опухолей, таких как нейробластома, рак яичников, рак толстой кишки, рак почек и рак желудка (Gras Navarro et al., 2015; Kailayangiri et al., 2017; Liu et al., 2013a; Mamessier et al., 2011; Rusakiewicz et al., 2013). Однако *in vivo* многие опухоли развивают различные стратегии ухода от надзора цитотоксических клеток (Rouse et al., 2016; Stringaris et al., 2014).

По сравнению с Т-клетками использование НК-клеток для лечения онкологических заболеваний имеет свои преимущества и недостатки. Основным недостатком иммунотерапии на основе НК-клеток – их низкий пролиферативный потенциал, что приводит к меньшей выживаемости НК-клеток *in vivo*. С другой стороны, НК-клетки могут более эффективно убивать опухолевые клетки из-за способности к нескольким циклам цитотоксичности. Другим преимуществом является отсутствие риска возникновения реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) при использовании аллогенных НК-клеток. При этом, несовпадение рецепторов KIR с молекулами HLA-I на поверхности опухолевых клеток реципиента должно способствовать усилению противоопухолевой цитолитической активности адаптивных НК-клеток (Martín-Antonio et al., 2017). Наконец, при введении НК-клеток в организм больного не возникает «цитокинового шторма», который характеризуется неконтролируемой активацией иммунных клеток из-за резкого повышения таких растворимых цитокинов как TNF- α , IL-1 и IL-6. В то же время, несмотря на высокую противоопухолевую цитотоксическую активность НК-клеток в целом, в микроокружении опухоли их литическая функция часто нарушается (Burga et al., 2016).

Идея применения цитотоксических лимфоцитов в иммунотерапии появилась в конце 70-х годов XX века. Однако получение достаточного количества активных донорских НК-клеток было трудоемким и долгим процессом. В 1980 году было показано, что инкубирование мышинных спленоцитов с IL-2 приводит к образованию клеток, проявляющих высокую цитотоксическую активность против свежeweделенных или культивируемых клеток сингенной саркомы (Yron et al., 1980). Эти клетки получили название лимфокин-активированных киллерных клеток (ЛАК-клетки, LAK). В дальнейшем было показано, что ЛАК-клетки способны лизировать свежeweделенные опухолевые клетки различной нозологии. В результате ЛАК-клетки стали применяться для лечения опухолевых больных. Многие страны, в том числе и СССР, проводили исследования активности аутологичных и аллогенных ЛАК-клеток по отношению к опухолевым клеткам. В доклинических испытаниях ЛАК-клетки демонстрировали высокую противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* на животных. Однако, данные клинических исследований показали, что системное введение ЛАК-клеток значительно не увеличивает эффективность лечения (Демидов et al., 2005).

Свежeweделенные НК-клетки обладают низким пролиферативным потенциалом и слабой цитотоксической активностью (Dybkaer et al., 2007). Другая проблема заключается в том, что при инфузии донорные НК-клетки быстро теряют свою активность (Vrehm et al., 2011; Geller and Miller, 2011). Поэтому были сделаны попытки использовать IL-2 для

стимуляции пролиферации и активации NK-клеток. Введение активированных IL-2 NK-клеток и/или цитокинов для экспансии и активации NK-клеток не привело к значительными положительным результатам в борьбе с аутологичными раковыми клетками (Farag et al., 2002). В большинстве исследований не удалось убедительно продемонстрировать клиническое преимущество данных методов. И, хотя IL-2 может изменять баланс активирующих и ингибирующих рецепторов на NK-клетках, вероятно, что ингибирующие сигналы, инициируемые молекулами HLA-I аутологичных раковых клеток, препятствуют успешному лечению. В настоящее время в иммунотерапии обычно используют гаплоидентичные NK-клетки (Stringaris and Barrett, 2017).

Введение пациентам IL-2 приводило к различными побочным эффектам, включая лихорадку, озноб, миалгию (Antony and Dudek, 2010), и могло способствовать экспансии регуляторных T-клеток (Treg), которые в свою очередь подавляли NK-клетки (Pedroza-Racheco et al., 2013). Введение IL-15 не способствовало пролиферации Treg (Waldmann et al., 2011), однако при введении пациентам с метастатической меланомой и почечной карциномой могло приводить к дозозависимой токсичности, включая нейтропению (Conlon et al., 2015). Альтернативный подход заключался в прохождении пациентами курса химиотерапии иммуносупрессивными препаратами – циклофосфамидом или флударабином, действие которых приводило к истощению пула зрелых лимфоцитов пациента. Таким образом обеспечивалась благоприятная среда для экспансии донорных NK-клеток (Miller et al., 2005).

В настоящее время разрабатываются методы получения NK-клеток из различных источников, каждый из которых имеет свои клинические и материально-технические преимущества использования в клинике. Для последующего применения в иммунотерапии NK-клетки могут быть выделены из периферической или пуповинной крови, получены из гемопоэтических клеток-предшественников CD34⁺ или «перепрограммированы» из зрелых соматических клеток через стадию индуцированных плюрипотентных стволовых клетках или эмбриональных стволовых клеток (Spanholtz et al., 2011). Периферическая кровь является легкодоступным материалом, который позволяет быстро получить большое количество NK-клеток.

Малую продолжительность жизни NK-клеток в организме реципиента можно компенсировать увеличением количества введений донорных клеток. Если бы NK-клетки можно было бы замораживать/размораживать без потери функциональной активности, это бы позволило наращивать клетки заранее и использовать для лечения сразу же, как только они понадобятся. Однако, в отличие от T-клеток, NK-клетки оказались очень чувствительны к процессу замораживания и оттаивания, что приводило к потере их

функциональной активности. Исследования по оптимизации криоконсервации НК-клеток выявили, что активность замороженных НК-клеток может быть восстановлена путем инкубации в течение ночи с цитокинами, такими как IL-2 (Dominguez et al., 1997; Domogala et al., 2016; Holubova et al., 2016). Пока неизвестно, можно ли использовать аналогичную стратегию для восстановления функции замороженных модифицированных НК-клеток для иммунотерапии.

На данный момент времени для активации выделенных НК-клеток используют методики, основанные на культивировании клеток в среде с добавлением цитокинов (Geller and Miller, 2011). В дополнение к растворимым цитокинам, для активации НК-клеток широко используются человеческие фидерные клетки, включая генетически модифицированные клеточные линии, которые экспрессируют активирующие лиганды рецепторов НК-клеток, связанные с мембраной цитокины или молекулы клеточной адгезии. Повышения активности НК-клеток также можно добиться с помощью генетической модификации (Burga et al., 2016; M. A. Streltsova et al., 2018).

Особенности адаптивных НК-клеток делают их потенциально эффективными для использования в противоопухолевой терапии. Достаточно давно стали появляться подтверждения того, что инфекция HCMV может снижать риск рецидива онкологического заболевания. Нужно отметить, что эта инфекция потенциально опасна для онкологических больных, страдающих иммуносупрессией. В исследовании с участием реципиентов гематopoэтических клеточных трансплантатов было показано, что экспансия НК-клеток $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$ ассоциирована с уменьшением частоты рецидива у больных лейкозом (Cichocki et al., 2016). Также относительно недавно при использовании цитокин-активированных НК-клеток памяти в клинических испытаниях первой фазы были выявлены положительные эффекты у пяти из девяти пациентов с острой миелоидной лейкемией, в том числе у четырех пациентов наступила полная ремиссия (Romee et al., 2016).

Большое количество испытаний по применению НК-клеток в иммунотерапии успешно прошло первую фазу клинических исследований, что говорит об актуальности и перспективности их использования в терапии рака. Так, во Франции проводят исследования по введению гаплоидентичных НК-клеток пациентам с острым миелоидным лейкозом (ClinicalTrials.gov. NCT01947322). В Китае занимаются подавлением рецидива гепатоклеточной карциномы после трансплантации печени с использованием НК-клеток (NCT02399735). В Германии исследуют возможности применения адаптивной иммунотерапии на основе аутологичных НК-клеток, активированных молекулами Hsp70 и IL-2, для лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого (NCT02118415). А

выделение и наращивание НК-клеток из пуповинной крови и дальнейшее их введение в организм пациента является частью терапии хронического лимфолейкоза (NCT02280525), применяемой в США.

1.6 Методы культивирования НК-клеток

Использование нативных НК-клеток как для фундаментальных исследований, так и для применения в иммунотерапии затруднено из-за их низкой жизнеспособности. Для культивирования НК-клеток *in vitro* требуется дополнительная активация НК-клеток, которая может быть осуществлена с помощью цитокинов (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21) и/или контактных взаимодействий с клетками-мишенями. Стимуляция НК-клеток может приводить к индукции пролиферации, изменениям фенотипа и увеличению их функциональной активности. Активированные клетки могут лизировать опухолевые мишени, устойчивые к покоящимся НК-клеткам.

1.6.1 Активация НК-клеток

1.6.1.1 Активация НК-клеток цитокинами

Среди цитокинов, активирующих НК-клетки, можно выделить IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21 (Leong et al., 2014). Было показано, что эти цитокины играют ключевую роль в активации НК-клеток против инфекционных агентов и опухолевых клеток. Данные цитокины стимулируют изменение поверхностной экспрессии рецепторов НК-клеток, увеличивают продукцию таких факторов, как IFN- γ и TNF- α , а также приводят к росту цитолитической активности НК-клеток. В отличие от IL-12 и IL-18, IL-2 и IL-21 причисляют к цитокинам адаптивного иммунитета, поскольку их секретируют Т-лимфоциты в процессе иммунного ответа.

Цитокин-опосредованные пути активации НК-клеток не зависят от ингибирующих сигналов, которые получает НК-клетка при взаимодействии с клеткой-мишенью. Это связано с тем, что сайты проведения сигналов находятся в разных частях мембраны. При взаимодействии НК-клетки с клеткой-мишенью возникает иммунологический синапс, а проведение сигнала от цитокинов обычно не связано с иммунологическим синапсом (Kovalenko and Streltsova, 2016). Исключением является только IL-15, который, как было показано в работе Кобаяши и др., должен быть представлен DC, которые несут на своей поверхности α -субъединицу IL-15R (Kobayashi et al., 2005).

1.6.1.1.1 IL-2 и IL-15

IL-2 способствует выживанию НК-клеток посредством индукции экспрессии Bcl-2 в контексте антиапоптотической программы, вызывает увеличение секреции IFN- γ , цитотоксической активности НК-клеток и запускает их пролиферацию (Fehniger et al.,

2000). В частности, IL-2 стимулирует пролиферацию NK-клеток путем увеличения экспрессии генов, отвечающих за этот процесс (Dybkaer et al., 2007). Основными продуцентами IL-2 являются цитотоксические Т-клетки и Th1-клетки.

IL-15 обладает во-многом сходными свойствами с IL-2. Как и IL-2, он регулирует активацию NK-клеток, пролиферацию, выживание и цитотоксичность при транс-представлении DC (Kobayashi et al., 2005). IL-15 также поддерживает выживание NK-клеток посредством индукции Bcl-2 (Zwirner and Domaica, 2010). Кроме того, этот цитокин стимулирует пролиферацию NK-клеток, которая в основном связана с пролиферацией CD56^{bright}, но не CD56^{dim}-NK-клеток (Zwirner and Domaica, 2010). Этот цитокин, наряду с IL-12, продуцируется активированными DC и макрофагами (Leong et al., 2014).

Рецепторы к IL-2, IL-15 и IL-21 содержат общую γ -цепь рецептора IL-2 (IL-2R) (Wendt et al., 2007). CD56^{bright}-NK-клетки конститутивно экспрессируют α -цепь рецептора IL-2 (CD25), который образует высокоаффинный гетеротримерный комплекс IL-2R $\alpha\beta\gamma$, реагирующий на пикомолярную концентрацию IL-2 (Caligiuri et al., 1990). Экспрессию CD25 можно индуцировать как на CD56^{bright}, так и на CD56^{dim}-NK-клетках путем комбинированной активации цитокинов IL-12, IL-15 и IL-18 и, в меньшей степени, путем активации IL-2 или IL-15 (Leong et al., 2014).

IL-2 и IL-15 регулируют цитотоксичность, опосредованную NK-клетками (Kobayashi et al., 2005). Один из механизмов, с помощью которого IL-2 способствует NK-опосредованной цитотоксичности, включает в себя индукцию экспрессии перфорины (Zhang et al., 1999). Также стимуляция клеток с IL-2 приводит к увеличению плотности поверхностной экспрессии активирующих молекул и, следовательно, цитотоксичности NK-клеток (Fujisaki et al., 2009). IL-2 и IL-15 (без дополнительной стимуляции) являются слабыми индукторами продукции цитокинов NK-клетками (Carson et al., 1994; Girart et al., 2007).

Обоснование перекрывающейся активности IL-2 и IL-15 в NK-клетках пока до конца не изучены. Возможно, это связано с общими рецепторными субъединицами и общими сигнальными путями. Было продемонстрировано, что на поверхности NK-клеток человека, стимулированных IL-2 в сочетании с IL-15 или IL-7, наблюдается последовательная экспрессия рецепторов IL-15R α и IL-2R α , что обеспечивает временную чувствительность к растворимому IL-15, а затем длительную ответность на IL-2 и транс-представленный IL-15 (Pillet et al., 2009).

1.6.1.1.2 IL-12

IL-12 – цитокин, который секретируется клетками миелоидного ряда, такими как моноциты, макрофаги и DC, в ответ на патогены. Он вызывает увеличение секреции цитокинов и цитотоксичности NK-клеток (Wang et al., 2000). Однако, без других цитокинов IL-12 является относительно слабым стимулом для продукции IFN- γ (Girart et al., 2007). Наоборот, IL-12 является относительно мощным индуктором NK-клеточной цитотоксичности против клеток-мишеней (Wang et al., 2000). Было обнаружено, что IL-12 вызывает индукцию пролиферации NK-клеток (Loza and Perussia, 2004). Этот цитокин участвует в ингибировании опосредованного NK-клетками ангиогенеза (Yao et al., 1999). Добавление IL-12 вместе с IL-2 или IL-15 вызывает быструю активацию NK-клеток и стимулирует продукцию не только IFN- γ , но и TNF- α , который вызывает цитокин-индуцируемый апоптоз (Ross and Caligiuri, 1997). Считается, что такая гибель NK-клеток представляет собой гомеостатический механизм самоограничения эффекторных функций NK-клеток.

Стимуляция NK-клеток IL-12+IL-15 или IL-15+IL-18, но в отсутствие IL-2, способствует усиленной секреции IFN- γ (главным образом CD56^{bright} NK-клетками), IL-10, MIP-1a, TNF- α и GM-CSF и обеспечивает пролиферацию NK-клеток с устойчивой способностью продуцировать IFN- γ (Sotiriadou et al., 2005).

1.6.1.1.3 IL-21

IL-21, цитокин, секретируемый T-клетками CD4⁺, также стимулирует NK-клетки. Показано, что IL-21-стимулированные NK-клетки не только обеспечивают прямой противоопухолевый эффект, но и воздействуют на наивные и активированные T-клетки, вызывая их миграцию и дифференцировку (Roda et al., 2006). Следовательно, данная стимуляция может индуцировать как немедленный врожденный противоопухолевый ответ, осуществляемый NK-клетками, так и последующий длительный иммунитет, опосредованный опухолеспецифическими CD8⁺T-клетками.

В работе Лим было показано, что экспансия и фенотипические характеристики NK-клеток зависят от времени и продолжительности стимуляции IL-21 (Lim et al., 2014). Наибольшее количество клеток было получено при культивировании NK-клеток с IL-21 в течение первой недели инкубации. При регулярном добавлении IL-21 происходило снижение количества клеток и уменьшение уровня экспрессии части поверхностных маркеров. Культивирование NK-клеток с добавлением больших доз IL-21 (50 нг/мл) значительно сокращало продолжительность их жизни, за счет индукции апоптоза (Li et al., 2015).

1.6.1.1.4 Активация НК-клеток с помощью фидерных клеток

В дополнение к растворимым цитокинам, человеческие фидерные клетки широко используются для активации НК-клеток, включая генетически модифицированные клеточные линии, которые экспрессируют активирующие рецепторные лиганды, связанные с мембраной цитокины или молекулы клеточной адгезии. Наиболее известными вариантами фидерных клеток являются аллогенные периферические мононуклеарные клетки (PBMC), лимфобластоидная линия EBV (Berg et al., 2009) и модифицированные фидерные клетки K562, экспрессирующие на своей поверхности активирующие молекулы 4-1BBL и MICA (B. Jiang et al., 2014), mbIL-15 и 4-1BBL (Fujisaki et al., 2009; Lapteva et al., 2012) или их комбинации (Gong et al., 2010). Например было показано, что НК-клетки, простимулированные с помощью K562-mb15-41BBL в комбинации с IL-2, имеют значительно более высокую цитотоксическую активность против клеток острого миелоидного лейкоза, чем клетки, стимулированные IL-2 (Fujisaki et al., 2009). Эти активированные НК-клетки также проявляют цитотоксичность в отношении клеточных линий, полученных от пациентов с саркомой Юинга, рабдомиосаркомы и нейробластомы (Cho et al., 2010).

За последнее время появились новые эффективные способы активации, которые включают в себя культивирование клеток с добавлением IL-2 и модифицированных фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембрано-связанные IL-15 или IL-21. Культивирование клеток в среде с IL-2 приводит к средней экспансии в 193 раза (от 21 до 277 в зависимости от донора) (Carlens et al., 2001). Добавление модифицированных фидерных клеток K562-mbIL15 приводило к увеличению средней экспансии до 277 раз (от 201 до 1459) (Fujisaki et al., 2009), а культивирование с K562-mbIL21 увеличивает эти показатели до 2363 раза (от 600 до 6362) (Liu et al., 2013b). В другом исследовании сообщалось, что в отличие от K562-mbIL15, K562-mbIL21, стимулировали экспансию НК-клеток без признаков старения в течение 6 недель. Средняя клеточная экспансия на 21 день культивирования составила 47967 раз (медиана 31747) для K562-mbIL21, против 825 (медиана 325) для K562-mbIL15 (Denman et al., 2012). Несмотря на значительное увеличение уровня пролиферации, K562-mbIL21-активированные НК-клетки демонстрировали значительное увеличение длины теломер, что говорит об их большом пролиферативном потенциале (Denman et al., 2012).

Значительные отличия в пролиферации НК-клеток между различными людьми, о которых сообщалось в работе Denman et al., 2012 и других работах (Berg et al., 2009; Leivas et al., 2016), показывают, что разная эффективность реакций НК-клеток на стимуляцию может быть донор-опосредованной. Причины этого явления до конца

непонятны. Одной из причин могут быть наблюдаемые у разных людей разные соотношения НК-клеток, различающихся по профилю экспрессии рецепторов и по отвечаемости на различные контактные и растворимые стимулы (Brady et al., 2010).

1.6.2 Влияние стимуляции на фенотипические характеристики НК-клеток

Активация и дифференцировка НК-клеток, вызванная внешними раздражителями, сопровождается изменением экспрессии некоторых внутренних и поверхностных белков (Li et al., 2015; Yokoуama et al., 2004). Добавление IL-2 способствует функциональному созреванию CD56^{bright} НК-клеток в лимфатических узлах, вызывая увеличение экспрессии KIR, CD16, NCR и перфорина (Ferlazzo et al., 2004). В некоторых работах было показано, что IL-2 и IL-15 активируют экспрессию рецепторов NKG2D, членов семейства NCR и членов семейства KIR (Skak et al., 2008), что может способствовать распознаванию и киллингу клеток-мишеней. IL-12 вызывает усиление экспрессии NKp46, но не влияет на экспрессию ингибирующего рецептора KIR3DL1, что облегчает распознавание клеток-мишеней. IL-21 регулирует экспрессию NKG2D в НК-клетках (Zwirner and Domaica, 2010) и может подавлять экспрессию рецептора NKp44 через адаптер DAP-12, сохраняя при этом продукцию цитокинов у CD56^{bright} и CD56^{dim} НК-клеток на исходном уровне и даже усиливая их цитотоксическую функцию (de Rham et al., 2007). В мышинных моделях было показано, что IL-21 способствует созреванию НК-клеток (Brady et al., 2010), в то время как в нескольких исследованиях человеческих НК-клеток отмечается высокая поверхностная экспрессия рецептора NKG2A на IL-21-стимулированных НК-клетках, которая характерна для менее дифференцированных НК-клеток (Denman et al., 2012; Li et al., 2015).

Было обнаружено, что активация НК-клеток часто приводит к появлению молекулы HLA-DR на поверхности клетки (Ferlazzo et al., 2003; Galea-Lauri et al., 1999; Yano et al., 1996a). Эта молекула связана с антиген-представляющими клетками, так как она непосредственно участвует в процессе представления антигена CD4⁺ Т-клеткам (Rock et al., 2016). У здоровых людей небольшая часть циркулирующих НК-клеток экспрессирует HLA-DR (Burt et al., 2008). Эта циркулирующая фракция HLA-DR-позитивных НК-клеток может существенно увеличиваться в условиях, связанных с хроническим воспалением, обусловленных вирусом иммунодефицита (Fogli et al., 2004a; Lichtfuss et al., 2012a), рассеянный склероз (T. Aranami et al., 2006), 2006), IgA-нефропатия (Yano et al., 1996a). Экспрессия HLA-DR возрастает в НК-клетках также при стимуляции BCG (J Henry Evans et al., 2011). Это указывает на возможное физиологическое значение HLA-DR-позитивной субпопуляции *in vivo*. Однако это подмножество все еще плохо охарактеризовано. В частности, неясно, связана ли экспрессия HLA-DR с

дифференцировкой NK-клеток. Функциональное значение присутствия молекулы HLA-DR на NK-клетках все еще обсуждается. В одной из статей было показано, что NK-клетки могут представлять определенные антигены T-клеткам с использованием этой молекулы, включая столбнячный токсин (Roncarolo et al., 1991), однако дальнейшие исследования не проводились.

Молекула HLA-DR может быть лигандом неизвестного рецептора. Было показано, что экспрессия HLA-DR на активированных NK-клетках может быть опосредована с повышенным пролиферативным потенциалом (J H Evans et al., 2011a) и цитотоксической активностью против определенных клеток-мишеней (Burt et al., 2008; J Henry Evans et al., 2011). Не совсем понятно, какие конкретные стимулы могут индуцировать экспрессию HLA-DR, а также указывает ли HLA-DR на активированное состояние NK-клеток вообще или только при определенных условиях, так как характеристики NK-клеток изменяются вместе с экспрессией HLA-DR. Также неясно, является ли рост HLA-DR-положительной NK-клеточной фракции во время активации следствием пролиферации небольшого количества HLA-DR⁺NK-клеток, циркулирующего в крови, или из-за индукции экспрессии HLA-DR *de novo* в зрелых NK-клетках. В настоящее время получены данные в пользу первой гипотезы (J H Evans et al., 2011b), но второй вариант не следует исключать.

1.6.3 Культивирование единичных NK-клеток

NK-клетки способны изменять свой фенотип при дифференцировке и активации, образуя гетерогенные субпопуляции с различной экспрессией функциональных рецепторов, эффекторных молекул и сигнальных белков, а значит, обладающих различной активностью (Bjorkstrom et al., 2010; Long et al., 2013). Механизмы дифференцировки NK-клеток до конца не ясны. Получение и анализ потомства одной NK-клетки позволяет лучше охарактеризовать процессы дифференцировки и активации на уровне одной клетки и изучить функциональные особенности NK-клеток на разных стадиях развития. Метод клонирования NK-клеток также позволяет выбирать клетки с желаемыми свойствами для дальнейшего применения в противоопухолевой терапии. Получение клонов NK-клеток используют для решения таких фундаментальных задач, как изучение процессов дифференцировки (Hayakawa et al., 1991; Spits and Yssel, 1996) и гетерогенности фенотипических и функциональных характеристик отдельных NK-клеток (Pérez-Villar et al., 1995; Sobanov et al., 2002). Изучение NK-клеток на клональном уровне также было использовано в работах по подбору наиболее функционально-активных NK-клеток против конкретных опухолевых мишеней (Feuchtinger et al., 2009; Ruggeri et al., 1999).

В литературе описано использование клонов NK-клеток для изучения надсемейства гетеродимеров CD94 (Pérez-Villar et al., 1995) и зависимости изменений экспрессии

рецептора CD94/NKG2 от функциональной активности NK-клеток (Sobanov et al., 2002). Группа Руггери исследовала роль рецепторов KIR в HLA-несогласованной трансплантации гематопозитических стволовых клеток с использованием клонов NK-клеток (Ruggeri et al., 1999). Метод клонирования также помог в исследовании факторов, приводящих к гетерогенной цитотоксической активности NK-клеток по отношению к В-лимфобластоидному лейкозу. С помощью полученных клонов NK-клеток, было показано, что неоднородная активность популяций NK-клеток возникает из-за экспрессии на клеточной поверхности различных ингибирующих и активирующих рецепторов KIR. Клетки одного клона гомогенны по набору KIR, тогда как клоны различались между собой по набору рецепторов KIR на своей поверхности. Это позволило группе Феучтингер провести функциональные тесты и подобрать для каждого варианты опухоли наиболее цитотоксически-активные клоны (Feuchtinger et al. 2009).

В большинстве ранее опубликованных работ по клонированию NK-клеток использовалась стимуляция комбинацией различных фидерных клеток, IL-2 и PMA, которая изначально была разработана для получения клонов Т-клеток (Litwin et al., 1993; Moretta et al., 1990; Pérez-Villar et al., 1995; Pfeiffer et al., 2007; Ruggeri et al., 1999; Schmidt et al., 1985; Spits and Yssel, 1996; Yssel et al., 1984). Однако в последнее время для активации и экспансии NK-клеток используются различные варианты стимуляции (Denman et al., 2012; H Fujisaki et al., 2009; Lapteva et al., 2016). Некоторые из них могут быть применены для получения клонов NK-клеток (Cella and Colonna, 2000; Spits and Yssel, 1996).

Первые методы получения клонов NK-клеток были основаны на использовании предельного разведения и культивирования клеток в среде, дополненной облученными (EBV) -трансформированными В-клетками или облученными аллогенными лимфоцитами в качестве фидерных клеток (Moretta et al., 1990; Schmidt et al., 1985). В работе Litwin et al. сортировка клеток в режиме «single cell» (по одной клетке с заданным фенотипом на лунку) использовалась вместо метода лимитирующих разведений (Litwin et al. 1993). Метод сортировки единичных клеток также использовался в некоторых других работах (Carr, 2002; Phillips et al., 1996; Spits and Yssel, 1996). В 2000 году был опубликован протокол о стабильном производстве клонов NK-клеток методом лимитирующих разведений с использованием фидерных клеток RPMI-8866 (Cella and Colonna, 2000). Кроме того, в некоторых исследованиях метод совместного культивирования NK-клеток с DC был использован для получения клонов NK-клеток (Ferlazzo et al., 2002; Semino et al., 2007).

1.7 Методы модификации НК-клеток

Генетические манипуляции могут не только помочь преодолеть такие трудности выращивания НК-клеток как низкий уровень экспансии, но и значительно повысить функциональные характеристики НК-клеток путем внедрения новых рецепторов на поверхность клетки. Однако, до недавнего времени, такие манипуляции не приводили к значительным результатам. Вирусная трансдукция и трансфекция, успешно используемая для Т-клеток, как правило, негативно сказывается на жизнеспособности НК-клеток и связана с низкими уровнями экспрессии в них трансгена. Однако, за последние 10 лет появилось большое количество работ и методик по эффективной модификации НК-клеток. Были разработаны подходы к негенетической модификации НК-клеток, однако такие способы приводят лишь к временному изменению содержания молекул на клеточной поверхности.

К настоящему времени осуществлено множество вариантов генетической модификации НК-клеток. Самое большое количество генетических модификаций получено с использованием конструкции химерных антигенных рецепторов (CAR, chimeric antigen receptor). Верхняя часть CAR может нести разнообразные рецепторы, например NKG2D (Chang et al., 2013) или CD16 (Binyamin et al., 2008; Weng and Levy, 2003), рецепторы к хемокинам (Kremer et al., 2017; Levy et al., 2016; Müller et al., 2015; Wennerberg et al., 2015). Кроме введения рецепторов CAR с помощью генетической модификации было осуществлено введение генов-самоубийц (Bonini et al., 1997; Di Stasi et al., 2011; Leboeuf et al., 2014; Vogler et al., 2010), генов, приводящих к принудительной экспрессии НК-клетками цитокинов – IL-2 и IL-15 (Imamura et al., 2014; Nagashima et al., 1998; Sahm et al., 2012; Yvon et al., 2017) и увеличение активности теломеразы (H Fujisaki et al., 2009).

1.7.1 Методы генетической модификации НК-клеток

Генетическая модификация клеток может быть осуществлена методом трансдукции с помощью вирусных частиц и методом трансфекции с использованием плазмид. Наиболее часто используемые инструменты для доставки генов включают в себя модифицированные ретровирусные конструкции на основе лентивирусов (Micucci et al., 2006) и гамма-ретровирусов (Alici et al., 2009; Kellner et al., 2016). Преимущество лентивирусных систем заключается в том, что они способны инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки, тогда как ретровирусы заражают только делящиеся клетки (Carlsten and Childs, 2015). Таким образом, лентивирусные векторы могут использоваться для трансдукции более широкого спектра типов клеток. Также, по сравнению с ретровирусными векторами, лентивирусные векторы могут переносить

трансгены большего размера (De Meyer et al., 2006). Эффективность трансдукции вирусными частицами первичных НК-клеток варьирует в разных работах от 1% до 90% (Imai et al., 2005; Lapteva et al., 2016; Li et al., 2010; Suerth et al., 2016). Однако, в отличие от ретровирусной трансдукции, единичная лентивирусная трансдукция приводит в целом к более низкой (менее 30%) экспрессии трансгена у НК-клеток (Suerth et al., 2016).

Так как трансдукция происходит ненаправленно, существует риск мутагенеза, хотя на его вероятность влияет ряд факторов, таких как конкретный тип используемого вектора и сайт интеграции (Baum and Fehse, 2003; Wu and Dunbar, 2011). Невирусные методы - трансфекция ДНК и мРНК – позволяют обойти данные проблемы. Однако, таким способом можно достичь только кратковременной экспрессии трансгена, что накладывает ограничения на использование трансфицированных клеток, но делает терапию более безопасной.

Одним из наиболее перспективных методов генетической модификации НК-клеток является вирусная трансдукция. Сниженная эффективность вирусной трансдукции НК-клеток, по сравнению с Т-клетками, может быть частично связана с врожденными свойствами НК-клеток. Было сделано предположение о том, что Toll-like рецепторы (TLR) типа 2, 3, 4, 7 и 8 и/или RIG-I-подобные рецепторы (RLR) (Thompson and Locarnini, 2007) в определенной степени обеспечивают противовирусную резистентность НК-клеток и, вероятно, участвуют в инициировании апоптоза в НК-клетках после вирусной трансдукции (Sutlu et al., 2012). Наибольшая эффективность вирусной трансдукции наблюдалась при использовании либо НК-клеточных линий, либо первичных НК-клеток, которые подверглись экспансии *ex vivo* (Klingemann et al., 2016). Напротив, вирусная трансдукция свежевыделенных человеческих лимфоцитов обычно приводила к значительно более низкой эффективности трансдукции (Bilal et al., 2015; Streltsova et al., 2017).

1.7.1.1 Ретровирусная трансдукция НК-клеток

Первые конструкции, используемые для генетической модификации НК-клеток, были сделаны на основе ретровирусов. Самый ранний отчет о ретровирусной трансдукции НК-клеток был опубликован в конце 1990-х годов и посвящен генетической манипуляции НК-клеточной линии NK-92 (Nagashima et al., 1998). В этом исследовании эффективность трансдукции составляла всего 2-3%. Оптимизация подходов к ретровирусной генной трансдукции за последнее десятилетие привела к повышению ее эффективности. Сообщается, что ретровирусная трансдукция НК-клеток не изменяет функцию, фенотип и пролиферативную способность НК-клеток (Guven et al., 2005; Kellner et al., 2016; Suerth et al., 2016).

1.7.1.2 Трансдукция с помощью лентивирусов

Генетическая модификация НК-клеток с помощью лентивирусных векторов была впервые осуществлена на первичных мышинных НК-клетках (Tran and Kung, 2007). В большинстве исследований уровень лентивирусной трансдукции НК-клеток достигал в среднем 15-40%, хотя эффективность варьировала от нескольких процентов до модификации почти 100% клеток, а в некоторых случаях требовалось несколько циклов трансдукции (E. Liu, Y. Tong, G. Dotti, B. Savoldo, M. Muftuoglu, K. Kondo, M. Mukherjee, J.S. Orange, C. Sobieski, 2016). Недавние данные показали, что эффективность трансдукции первичных НК-клеток человека может быть увеличена путем ингибирования внутриклеточных противовирусных механизмов в НК-клетках (Sutlu et al., 2012).

Таким образом, эффективность вирусной трансдукции НК-клеток может сильно варьировать, может потребоваться многократная обработка НК-клеток вирусными частицами и/или дальнейшее культивирование клеток для достижения приемлемой трансгенной экспрессии. Кроме того, связанная с вирусной модификацией гибель клеток и необходимость их обогащения после трансдукции могут снижают клиническую полезность этого подхода. Тем не менее, вирусная трансдукция НК-клеток обеспечивает стабильную трансгенную экспрессию.

1.7.1.3 Трансфекция

По сравнению с вирусной трансдукцией, трансфекция НК-клеток, по-видимому, связана с более низким уровнем апоптоза, меньше зависит от характеристик НК-клеток конкретного донора. При этом эффективность доставки трансгена полностью не связана с уровнем клеточного деления. В большинстве случаев этот подход приводит к более быстрой, хотя и кратковременной (до трех дней) экспрессии трансгена, по сравнению с вирусной трансдукцией, когда гены должны быть включены в клеточный геном до того, как белок начнет экспрессироваться (Oei et al., 2018). Передача гена с использованием трансфекции может быть достигнута либо с помощью электропорации (Chang et al., 2013; H. Jiang et al., 2014), включая нуклеофилизацию (Maasho et al., 2004; Phatarpekar et al., 2016), либо липофекции, которая использовалась только в нескольких исследованиях по модификации НК-клеток (El Sobky et al., 2016; Zhang et al., 2004).

1.8 Заключение

Таким образом, так как НК-клетки способны быстро и эффективно лизировать опухолевые клетки, не вызывая при этом развития реакции «трансплантат против хозяина», они представляют уникальный объект с большим потенциалом для иммунотерапии. Изучение развития фенотипической и функциональной гетерогенности

популяции зрелых NK-клеток может быть полезно для персонализации иммунотерапии. Однако низкий уровень экспансии NK-клеток *in vitro* препятствует изучению этих особенностей. Разработка эффективных методов получения долгоживущих популяций NK-клеток человека с заданными характеристиками может послужить полезным инструментом для расширения знаний о характеристиках отдельных субпопуляций и выявления условий, приводящих к получению большого количества цитотоксически-активных NK-клеток для применения в иммунотерапии.

2 Материалы и методы

В исследовании принимали участие здоровые добровольцы обоих полов в возрасте от 21 до 69 лет, давшие свое информированное согласие на участие в исследовании.

2.1 Материалы

2.1.1 Клеточные линии

Клеточные линии K562 (эритробластоидная лейкемия), Jurkat (Т-клеточная лимфома) и CIR (В-клеточная лимфома) были получены из АТСС. Генно-модифицированный клон клеток K562, экспрессирующий мембранный IL-21 (K562-mbIL21), любезно предоставлен доктором Дином Ли (MD Anderson Cancer Center, США). Данные клетки также экспрессируют CD64, CD86, CD137L и фрагмент рецептора CD19 (Denman et al., 2012). Для сборки ретровирусных частиц были использованы клеточные линии GP2-293 (любезно предоставлена доктором Е.Барсовым) и Phoenix Ampho (любезно предоставлена доктором А.В.Филатовым), сконструированные на основе эмбриональной клеточной линии почек HEK293T. Эти линии конститутивно экспрессировали следующие вирусные гены: Gag-Pol/Tat/Env/Rev.

2.1.2 Растворы

Буфер PBS (1x) - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47mM K₂HPO₄, 4.29mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH=7.2-7.4 (Amresco, США)

Буфер PBA (1x) – PBS с добавлением 0.1% BSA (Serva, Германия) и 0.1% азида натрия (Amresco, США), pH=7.2-7.4.

Буфер для сепарации (1x) – PBS с добавлением 0.5% BSA и 2 mM EDTA (Serva, Германия), pH=7.2-7.4. Стерилизацию буфера проводили с помощью 22-µm фильтров (Millipore, США).

Буфер TBE (5×) - 45 mM Трис, 45 mM H₃BO₃, 10 mM ЭДТА, pH=8.3.

Буфер для нанесения образцов ДНК на агарозный гель – 0.1% бромфеноловый синий, 0.1 % ксиленцианол, 30 % глицерин.

Буфер для аннексина – 100 mM HEPES, 8,1 г NaCl, 278 г CaCl₂ на 1000 мл деионизированной воды.

Среда LB – водный раствор 1% бактериального триптона (Хеликон, Россия), 0,5% бактериального дрожжевого экстракта (Хеликон, Россия), 0,5%NaCl и 0,001% NaOH. Стерилизацию проводили путем автоклавирования.

Среда LB с агаром - водный раствор 1% бактериального триптона, 0,5% бактериального дрожжевого экстракта, 2% агара (Хеликон, Россия), 0,5% NaCl и 0,001% NaOH. Стерилизацию проводили путем автоклавирования.

Среда SOB - водный раствор 2% бактериального триптона, 0,55% бактериального дрожжевого экстракта, 0,2% NaCl, 1% KCl, 2M MgCl₂+ MgSO₄

Среда для заморозки эукариотических клеток – 90% эмбриональной сыворотки телят (FCS) (HyClone, США), 10% DMCO (Sigma, США).

Буфер ТВ - 10mM MOPS, 55mM MnCl₂·2H₂O, 55mM MnCl₂·4H₂O, 15mM CaCl₂·2H₂O, 250mM KCl

Раствор полилизина - 180 мл PBS, 20 мл 1% желатина (Sigma, США) и 50 мл 0.01% poly-l-lysine (Sigma, США)

Кальций-фосфатный буфер 2xHBS: 0.28 M NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, pH=7.1

Кальциевый буфер: 1 mM трис-HCl, 0,1 mM ЭДТА, 0,25 M CaCl₂, pH=8,0

2.1.3 Антитела

В работе были использованы следующие антитела:

- CD57-PE (клон ТВ01) из eBioscience, США;
- anti-NKG2A-PE (клон 131411), anti-NKG2C-PE (клон 134591) из R&D Systems, США;
- CD25-FITC (клон M-A251), CD71-PE (клон M-A712) из BD Biosciences, США;
- CD86-PE (клон IT2), anti-IL-21-PE (клон 3A3-N2), anti-Гранзим В-Alexa Flour 647 (клон GB11) из BioLegend, США;
- CD3-PE-Cy7 (клон UCHT1), CD56-APC (клон N901), CD56-PE (клон N901 (HLDA6)), anti-HLA-DR-FITC (клон B8.12.2) из Beckman Coulter, США;
- CD56-Brilliant Violet 421 (клон HCD56), CD16-PE (клон 3G8), NKp46-FITC (клон 9E2), NKp30-PE (клон P30-15), NKp44-PE (клон 44.189), CD107a-PE-Cy5 (клон H4A3), NKG2D-PE (клон 1D11), CD69-PE (клон FN50), CD11b-PE-Cy7 (клон M1/70), из Sony Biotechnology, США;
- CD57-FITC (клон ТВ03), CD57-APC (клон ТВ03), anti-KIR2DL2/DL3-PE (клон DX27), anti-IFN γ -F (клон REA600), anti-NGFR-PE (клон ME20.4-1.H4) из Miltenyi Biotech, Германия.

2.1.4 Прочие реагенты и материалы

Человеческий рекомбинантный IL-2 (Hoffmann-La-Roche, Швейцария)

AIM V Serum Free Medium (Thermo Fisher, США)
 Среда RPMI-1640 medium (ПанЭко, Россия)
 Среда DMEM (ПанЭко, Россия)
 Fetal calf serum (FCS) (HyClone, США)
 DMCO (Sigma, США)
 BSA (Serva, Германия)
 Азид натрия (Amresco, США)
 NK Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec, Германия)
 MACS™ LD Columns (Miltenyi Biotec, Германия)
 EDTA (Serva, Германия)
 Раствор фиколла плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия)
 Раствор Версена (ПанЭко, Россия)
 BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, США)
 Раствор брефельдина А (Sigma, США)
 Раствор

2.2 Методы

2.2.1 Выделение, стимуляция и инкубирование клеток и клонов НК-клеток

2.2.1.1 *Выделение периферических мононуклеаров из венозной крови человека*

Гепаринизированную кровь была разбавлена в 2 раза раствором PBS. После производили подслаивание раствора фиколла плотностью 1,077 г/см³ в количестве 1 часть фиколла на 4 части разбавленной крови. Центрифугировали 20 мин, 1500 g с плавным разгоном и торможением при 20°C. Кольцо периферических мононуклеаров ресуспендировали в PBS. Центрифугировали 15 мин, 300 g, с обычным торможением. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в PBS и центрифугировали 10 мин, 200 g. Далее осадок ресуспендировали в буфере для сепарации. Количество периферических мононуклеаров подсчитывали в камере Горяева.

2.2.1.2 *Определение серологического статуса инфекции HCMV*

Серологический статус цитомегаловирусной инфекции человека (HCMV) определяли по наличию иммуноглобулинов класса G в сыворотке или плазме крови доноров с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа. При наличии IgG к CMV в исследуемом образце происходит их связывание с рекомбинантным антигеном, иммобилизованным на внутренней поверхности лунок планшета. К образцу сыворотки

добавляли конъюгат моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. После связывания данных антител проводили инкубацию содержимого лунок с раствором тетраметилбензидина. При наличии IgG к CMV происходило окрашивание раствора. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации IgG в анализируемых пробах.

В данной работе определяли только серопозитивность/серонегативность доноров по наличию/отсутствию IgG к CMV. Анализ проводили в соответствии с методикой производителя (CMV-IgG-ИФА-БЕСТ, D-1556, Вектор-Бест, Россия).

2.2.1.3 Магнитная сепарация

НК-клетки получали из периферических мононуклеаров с помощью отрицательной магнитной сепарации с использованием набора для изоляции НК-клеток (Miltenyi Biotech, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Чистота НК-клеток в препаратах после процедуры составляла не менее 97% (Kanevskiy et al., 2013).

2.2.1.4 Культивирование клеточных линий

Клеточные линии K562, K562-mbIL21, Jurkat и C1R культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) (Hyclone, США), 2 mM L-глутамина (PanEco, Россия) и 2 mM антибиотика-антимикотика (Sigma, США) в концентрации $2-8 \times 10^5$ клеток/мл (для поддержания роста клеток в логарифмической фазе). Поверхностную экспрессию IL-21 в клетках K562-mbIL21 периодически тестировали с использованием anti-IL-21-PE антител (BioLegend, США, клон 3A3-N2). Для получения фидерных клеток, клетки K562 или K562-mbIL21 облучали γ -излучением (100 Гр) и замораживали в среде для заморозки эукариотических клеток при -150°C .

2.2.1.5 Получение клонов НК-клеток

Для получения коллекций клонов, свежевыделенные НК-клетки были предварительно окрашены флуоресцентно-конъюгированными моноклональными антителами. Были использованы 5 панелей антител:

- Для получения клонов из неразделенных НК-клеток или из субпопуляций $\text{CD56}^{\text{bright}}$ и CD56^{dim} проводили окрашивание антителами к CD56, CD3.
- Для получения клонов из НК-клеток, отличных по степени дифференцировки и уровню активации: $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^-$, $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{HLA-DR}^+$, $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD57}^- \text{HLA-DR}^-$, $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD57}^- \text{HLA-DR}^+$, $\text{CD57}^{\text{bright}}$ были использованы антитела к CD56, CD57 и HLA-DR. Данный тип сортировки клеток обозначен в работе как первый вариант разделения «вариант 1».

- Для получения клонов из NK-клеток, отличных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C: CD56^{bright}NKG2C⁻, CD56^{bright}NKG2C⁺, CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁻, CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺, CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ были использованы антитела к CD56, CD57 и NKG2C. Данный тип сортировки клеток обозначен в работе как второй вариант разделения «вариант 2».

- Для клонирования NK-клеток CD56^{dim}CD57⁻NKG2A⁻ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2A⁻ были использованы антитела к CD56, CD57 и NKG2A.

- Для получения клонов из NKG2A⁻-NK-клеток, отличных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C были использованы антитела к CD56, CD57, NKG2A и NKG2C.

Клетки сортировали в 96-луночные круглодонные планшеты по одной клетке на лунку в режиме «Single cell». Данный режим позволяет в большей точностью гарантировать попадание одиночных клетки в лунки планшета. Для этого был использован сортировщик клеток FACSVantage DiVa (Beckton Dickinson, США), оснащенный лазерами 405, 488, 643 нм и соответствующим набором детекторов и фильтров. Было отсортировано не менее 120 клеток из каждой субпопуляции. Планшеты, приготовленные для сортировки клеток, содержали фидерные клетки в концентрации 10⁴ K562-mbIL21 (если не указано иное) на мл. полной среды для клонов (среда DMEM (ПанЭко, Россия), содержащая 20% среды ExVivo (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, США) и 100 ед/мл рекомбинантного человеческого IL-2 (Hoffmann-La-Roche, Швейцария)). Через 3 недели инкубации клеток в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂) половина среды заменялась на новую. В этой работе были использованы два метода культивирования клонов NK-клеток. В способе 1 фидерные клетки K562-mbIL21 (10⁴ клеток/мл) добавляли к клонам NK-клеток каждую неделю, начиная с третьей недели. Способ 2 включал еженедельную подмену среды и одно добавление 10⁴ фидерных клеток/мл после 6 недель инкубации клонов.

2.2.1.6 Оценка эффективности клонирования и продолжительности жизни клонов NK-клеток

Появление клонов NK-клеток в лунках регистрировалось визуально. Количество клонов, а также частоту получения клонов в популяциях оценивали каждую неделю начиная со 2 и по 7-14 в зависимости от коллекции.

Эффективность клонообразования (E) была рассчитана как процент всех полученных клонов от общего количества посаженных клеток. В разных коллекциях эффективность клонирования считали на неделе 2, 3 или 4, в зависимости от того, на

какой неделе было обнаружено наибольшее количество клонов. Общие частоты образования клонов из субпопуляций CD56^{bright} и CD56^{dim} были рассчитаны на основе начальных частот в субпопуляциях CD56^{bright/dim}HLA-DR⁺ (F_{i1}) и CD56^{bright/dim}HLA-DR⁻ (F_{i2}) НК-клеток в $((F_{i1} * F_{g1}) + (F_{i2} * F_{g2})) / (F_{i1} + F_{i2})$, где F_{g1} - частоты генерации клона CD56^{bright/dim}HLA-DR⁺, частоты генерации клона F_{g2} CD56^{bright/dim}HLA-DR⁻.

Долю живых клонов (X) на каждой неделе культивирования рассчитывали по формуле $X=X_1/X_2*100$, где X₁ – это количество выживших клонов на определенной неделе, а X₂ – общее количество лунок, в которые были посажены НК-клетки.

Для оценки выживаемости (S) клонов было высчитано отношение количества обнаруженных клонов на определенной неделе к максимальному количеству клонов, обнаруженных на неделе 2, 3 или 4, в зависимости от коллекции. Выживаемость высчитывали по формуле $S=X_n/E*100$, где X_n – процент живых клонов (X) на исследуемой неделе (n), E – эффективность образования клонов. Клоны, выжившие в течение 8 или более недель, были признаны долгоживущими. Количество клеток в клоне периодически оценивали с помощью гемоцитометра.

2.2.1.7 Окрашивание клеток методом прямой иммунофлуоресценции

Клетки переносили в цитометрические пробирки и отмывали от среды раствором РВА. После отмывки добавляли человеческие моноклональные антитела в экспериментальные образцы в концентрациях, указанных производителем. Инкубировали 30 мин на льду. Затем отмывали 1 мл РВА путем центрифугирования в режиме 300 g, 4 мин, 4°C. Ресуспендировали образцы в 200 мкл PBS и проводили измерение на проточном цитофлуориметре.

Для изучения поверхностной экспрессии рецепторов KIR были собраны панели антител, позволяющие методом вычитания определить наличие или отсутствие экспрессии отдельных рецепторов:

- 1) KIR2DL2/2DS2/2DL3-FITC, KIR2DL3-PE, CD56-APC
- 2) KIR2DS1-FITC, KIR2DL1-PE, CD56-APC
- 3) KIR3DL1-FITC, KIR3DL2-PE, CD56-APC
- 4) KIR2DL5-FITC, CD56-APC

2.2.1.8 Проточная цитометрия

Использовали цитофлуориметр FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose CA, США), оснащенный лазерами $\lambda=488$ нм, $\lambda=640$ нм и набором стандартных фильтров (Beckton Dickinson). В каждом образце измеряли не менее 5000 событий, зарегистрированных в секторе живых клеток по прямому и боковому светорассеянию. Результаты обрабатывали

в программах Flowing Software версия 2.5.1 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Финляндия) и FlowJo software версия 7.6 (TreeStar, Ashland, OR, США). Статистический анализ проводили в программах SigmaPlot 12 (SYSTAT Software Inc., США) и Graphpad Prism 7 (StatSoft Inc., США).

2.2.1.9 Анализ функциональной активности НК-клеток

2.2.1.9.1 Измерение натуральной цитотоксичности по уровню активации каспазы 6 в клетках мишенях

Метод основан на измерении уровня активации каспазы 6 в клетках мишенях при инкубации с НК-клетками. Для анализа использовали клеточную линию K562, которую предварительно окрашивали витальной краской TFL4 в среде RPMI – 1640 в концентрации 0,5 мкл/мл и инкубировали 45 минут в CO₂-инкубаторе. Отмывали клетки средой, центрифугировали 200g в течение 5 мин при 25⁰C. НК-клетки смешивали с K562 в соотношении 1:1, добавляли 50 мкл субстрата, который окрашивает активированную каспазу 6, осаждали клетки при 240g 30 сек и инкубировали 30 мин в CO₂ икубаторе. Отмывали 500 мкл РВА, измеряли с использованием проточного цитометра FACSCalibur.

2.2.1.9.2 Измерение натуральной цитотоксичности по уровню экспрессии LAMP-1 на поверхности НК-клеток

Метод основан на появлении LAMP-1 на поверхности НК-клеток при взаимодействии с клеткой-мишенью. Для прекращения процесса обратного захвата использовали брефельдин А (Sigma, США) – препарат, блокирующий внутриклеточный транспорт из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи. Для анализа использовали клеточную линию K562, которую добавляли к НК-клеткам в соотношении 1:1 соответственно. Предварительно готовили раствор для анализа натуральной клеточной цитотоксичности, содержащий раствор брефельдина А в концентрации 10 нг/мл и anti-CD107a. Смешивали НК -клетки и K562 в необходимом соотношении, добавляли по 50 мкл раствора для анализа клеточной цитотоксичности, откручивали 240g 30 сек и инкубировали клетки 2,5 часа в CO₂-инкубаторе. После отмывали 500 мкл раствора РВА и измеряли уровень LAMP-1 на проточном цитометре FACSCalibur.

2.2.1.9.3 Измерение антителозависимой цитотоксичности

Метод основан на способности НК-клеток распознавать клетки-мишени с помощью Fc-рецепторов, на поверхности которых произошло взаимодействие с антителом. Для прекращения процесса обратного захвата использовали брефельдин А.

Для анализа использовали клеточную линию C1R, которую добавляли к НК-клеткам в соотношении 1:3, соответственно. Предварительно готовили раствор для

анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности, содержащие раствор брэфельдина А в концентрации 10 мкг/мл, anti-CD107a и ритуксимаба (Roche, Швейцария) 2,5 мкг/мл. Смешивали NK -клетки и C1R в необходимом соотношении, добавляли по 50 мкл раствора, откручивали 240g 30 сек и инкубировали клетки 2,5 часа в CO₂-инкубаторе. После отмывали 500 мкл РВА и измеряли уровень LAMP-1 на проточном цитометре FACSCalibur.

2.2.1.9.4 Измерение уровня продукции IFN- γ

а. ELISA

Для определения различий в уровнях продукции IFN- γ между клонами, клетки подвергались дополнительной активации. После пересадки 10⁵ клеток в новую лунку 96-луночного планшета проводили стимуляцию двумя способами. В первом варианте клетки инкубировали в свежей полной среде с добавлением 100 ед/мл IL-2 в течении 16 часов. Второй способ включал инкубацию со свежей полной средой без добавления IL-2 в течение ночи и повторную рестимуляцию с 10 нг/мл IL-12 и 10 нг/мл IL-15 в течение 16 часов. Уровень секреции IFN- γ анализировали, как описано ранее (Erokhina et al., 2018), с использованием набора для ELISA (Вектор-Бест, Россия).

б. Внутриклеточное окрашивание

2 \times 10⁵ клеток переносили в новую лунку 96-луночного планшета и инкубировали в свежей полной среде без добавления IL-2 в течение ночи. Затем клетки повторно стимулировали с помощью 10 нг/мл IL-12 и 10 нг/мл IL-15 в течение 16 часов. Далее к клеткам добавляли 10 нг/мл брэфельдина А (Sigma, США) и инкубировали в течение 4 часов. После фиксации и пермеабелизации клеток с использованием набора BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для внутриклеточного окрашивания образцы инкубировали с антителом против IFN γ в буфере BD Perm/Wash™ в течение 30 минут на льду.

2.2.1.9.5 Внутриклеточная оценка гранзима В

2 \times 10⁵ клеток фиксировали и пермеабелизировали с использованием набора BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, США). Образцы инкубировали с антителом против гранзима В в буфере BD Perm/Wash™ в течение 30 минут на льду. После отмывали 500 мкл раствора BD Perm/Wash™ и измеряли уровень гранзима В на проточном цитометре FACSCalibur.

2.2.1.10 *Измерение уровня пролиферации NK-клеток*

Метод основан на использовании интернализуемой флуоресцентной метки CFSE (eBioscience, США), способной пассивно проникать внутрь клеток. Сукцинимидильные группы данного вещества реагируют с внутриклеточными аминами, формируя стабильный флуоресцентный конъюгат с белками, сохраняющийся в течение всей жизни клеток. Во время деления концентрация метки в дочерних клетках уменьшается в 2 раза, что ведет к соответствующему падению интенсивности флуоресценции.

Исследуемые клетки дважды отмывали раствором PBS. Готовили раствор CFSE в PBS в концентрации 5 мкмоль/мл и добавляли 100 мкл раствора к клеткам. Инкубировали 10 мин в темноте, затем добавляли полную среду для культивирования и оставляли для инактивации свободного CFSE во льду на 5 мин. После клетки отмывали и переносили в планшет для культивации. Уровень пролиферации измеряли на 4 и 7 день культивирования клеток с использованием метода проточной цитометрии.

2.2.1.11 *Исследование клеточного цикла*

Метод основан на применении красителя Hoechst 33342 (Life technologies, США), который относится к группе флуоресцирующих в синей области спектра красителей ДНК, специфичных для нуклеотидной пары аденин-тимин. Изучаемые клетки предварительно окрашивали anti-CD56 и anti-CD57, затем добавляли Hoechst 33342 в концентрации 10 мкг/мл, предварительно разведенный в 100 мкл PBS. Далее клетки инкубировали на водяной бане при 37 °C в течение 45 мин. По окончании инкубации добавляли PI (Invitrogen, США) в концентрации 5 мкг/мл, инкубировали 2 мин и измеряли на приборе FACSVantage.

2.2.1.12 *Анализ жизнеспособности клеток*

- С помощью Annexin V и пропидия йодида (PI)

Для детекции апоптотических клеток применяли Annexin V, способный связываться с остатками фосфатидилсерина, частично транслоцированными на внешнюю поверхность клеточной мембраны во время апоптоза. Для выявления некротических клеток использовали краситель пропидия йодид (PI), связывающий нуклеиновые кислоты. Клетки ресуспендировали в полипропиленовых пробирках. К клеткам добавляли рекомбинантный человеческий аннексин V (Invitrogen, США), разведенный в буфере для аннексина. Инкубировали 15 минут при 20°C без отмывки. Добавляли к клеткам по 400 мкл пропидия йодид (Sigma, США) в расчёте 2 мкг/мл. После этого инкубировали 10 мин в темноте и проводили измерения на проточном цитофлуориметре.

- С помощью SYTOX Red Dead Cell Stain

Метод окраски мертвых клеток с помощью SYTOX Red Dead Cell Stain основан на том, что данный краситель не может проникать через биологические мембраны. В результате проникновения данной краски возможно только в клетки с поврежденными плазматическими мембранами. Для проведения эксперимента, к клеткам добавляли раствор SYTOX Red Dead Cell Stain в РВА согласно инструкции производителя. Инкубировали образцы 2-5 мин в темноте и проводили измерения на проточном цитофлуориметре.

2.2.2 Генетические манипуляции с клетками

2.2.2.1 Приготовление компетентных бактериальных клеток *E. coli*

Клетки *E. coli* рассеивали из замороженного на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ стока штрихом на чашку с селективной средой LB, содержащей ампициллин. Выращивали в инкубаторе при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Отбирали несколько колоний (10-12) диаметром $\sim 2\text{-}3\text{ мм}$, помещали в 40 мл среды SOB. Выращивали при интенсивном встряхивании, при $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ до достижения плотности $\text{OD}_{600}=0.6$. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду. Суспензию клеток центрифугировали при 1800 g, в течение 10 мин. После откручивания тщательно сливали супернатант и удаляли остатки жидкости. Ресуспендировали в 10 мл буфера ТВ. Инкубировали во льду 15 мин. Суспензию клеток центрифугировали при 1800 g в течение 10 мин. После откручивания тщательно сливали супернатант и удаляли остатки жидкости. Ресуспендировали в 2мл буфера ТВ и добавляли DMSO до 3.5%. Инкубировали смесь во льду 10-15 мин и добавляли DMSO до 3.5% от нового объема смеси. Аликвотили по 200 мкл суспензии клеток в охлажденные 1.5 мл эппендорфы и замораживали на $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для проверки компетентности клеток делали контрольную трансформацию. Высевали клетки на чашки с селективной средой и подсчитывали компетентность клеток по следующей формуле: компетентность клеток = $N \cdot 10^6$, где N – количество колоний, выросших на чашке.

2.2.2.2 Трансформация клеток *E. coli*

Аликвоту компетентных клеток (200 мкл) помещали в лед и выдерживали 15 мин до полного размораживания. Добавляли 30-100 нг плазмиды и инкубировали во льду 30 мин. Далее делали тепловой шок ($43\text{ }^{\circ}\text{C}$, 35 с) на водяной бане, после чего выдерживали 2 мин во льду. К аликвоте добавляли 800 мкл среды LB и качали на качалке 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Далее осаждали клетки и растирали их на чашку Петри с селективной средой.

2.2.2.3 Выделение плазмид для трансфекции

Для выделения плазмид использовали коммерческий набор GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Scientific, США). Плазмиды выделяли коммерческим набором

согласно рекомендации производителя. Далее проводили агарозный гель-электрофорез для определения концентрации плазмиды.

2.2.2.4 Агарозный гель-электрофорез

Для заливки использовали агарозный гель (1% агарозы (Helicon, РФ) в буфере TBE. Агарозу плавил и добавляли 3 мкл/100мл раствора бромида этидия, (Sigma-Aldrich, США). Гель заливали в камеру для электрофореза с предварительно установленной гребенкой. В образовавшиеся лунки вносили образцы, которые предварительно были смешаны в равных количествах с бромфеноловым синим. Условия проведения гель-электрофореза: 130-150 В. О стадии прохождения электрофореза судили по окрашенной бромфеноловым синим полосе, опережающей ДНК. Затем проводили регистрирование полосы плазмидной ДНК под светом в УФ-диапазоне.

2.2.2.5 Переосаждение и очистка плазмид

Для переосаждения и очистки плазмиды к аликвоте плазмиды добавляли 10% 3М ацетата калия и встряхивали образец. Далее добавляли 3 объема 96% очищенного этилового спирта, перемешивали на вортексе и выдерживали в течение 1 ч на -20 °С. Центрифугировали при ускорении равном 16000g в течение 15 мин при 25 °С. Аккуратно отбирали супернатант и добавляли к осадку 1 мл охлажденного 75% этилового спирта. Центрифугировали при 16000g, 25 °С в течение 1 мин. Удаляли супернатант и добавляли к осадку 1 мл охлажденного 75% этилового спирта. Центрифугировали при тех же условиях и сушили осадок под лампой до полного испарения этилового спирта. Осадок разводили в воде без нуклеаз (Fermentas, США). Концентрацию определяли методом агарозного гель-электрофореза.

2.2.2.6 Приготовление клеточной линии для трансфекции

Клеточные линии GP2-293 и Phoenix Ampro выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) содержащей 10% FCS, 2 mM L-глутамина, 2 mM пирувата натрия (ПанЭко, Россия), 2 mM антибиотика-антимикотика.

2.2.2.7 Подготовка НК-клеток к трансдукции

Свежевыделенные НК-клетки помещали в 24-луночные планшеты в полной среде для выращивания клонов с IL-2 в концентрации 100 ед/мл и облученными фидерными клетками K562-mbIL21 в соотношении 4:5. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе. Через 6 дней производили частичную замену среды с добавлением IL-2 в концентрации 100 ед/мл и переносили клетки в новый 24-луночный планшет, после чего инкубировали еще 4-5 дней в CO₂-инкубаторе.

2.2.2.8 Трансфекция

День первый

Чашки Петри (100 мм) обрабатывали раствором полилизина, инкубировали 2-3 мин и сливали остаток полилизина. В подготовленные чашки пересаживали по 6 млн клеток в полной среде DMEM без антибиотика.

День второй

Клетки переводили в среду DMEM с 3% сывороткой без антибиотика. Для трансфекции использовали кальций-фосфатный набор (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя, либо самостоятельно приготовленный кальций-фосфатный буфер 2xHBS и кальциевый буфер. Также использовали lipofectamine (Invitrogen, США) и Mirus (Mirus Bio, США) согласно инструкции производителя. Для сборки ретровирусных частиц использовали 10 мкг плазмиды PhRD114-TERT и 10 мкг плазмиды xLox-GFP-TERT и xLox-NGFR-TERT на одну чашку Петри (плазмиды предоставлены Frederick National Laboratory for Cancer Research). Далее инкубировали раствор плазмид в буфере на столе в течение 30 мин и равномерно раскапывали по поверхности чашек.

День третий

Переводили клетки в полную среду DMEM с 10% FCS и антибиотиком.

День четвертый

Супернатант сливали в пробирки на льду. В чашки Петри добавляли полную среду DMEM с 10% FCS и антибиотиком для сбора второго урожая вируса через 72 и 96 ч. Эффективность трансфекции не количественно определяли с помощью конфокальной микроскопии. Достаточная концентрация вирусных частиц достигалась при свечении более 60% поля конфокального микроскопа.

2.2.2.9 Выделение и концентрирование вирусных частиц

Супернатант откручивали при 1800g, 4 °C, в течение 10 мин. Далее раствор вирусных частиц отфильтровывали через фильтр Millex-HV-0,45µm (Millipore, США) и концентрировали на стерильных конусах с порами диаметром 100 нм (Millipore, США).

2.2.2.10 Трансдукция клеток

В 24-луночные непокрытые планшеты заливали раствор ретронектина (Invitrogen, США) в PBS до конечной концентрации 20 мкг/мл. Инкубировали планшет при комнатной температуре не менее 2 ч. После инкубации отбирали из планшета ретронектин и заливали по 1-2 мл 2% раствора BSA в PBS на лунку для отмывки от несвязавшегося с

пластиком ретронектина. Инкубировали 30 мин, затем раствор сливали и заливали в лунки концентрированные вирусные частицы в PBS. Центрифугировали 1800 g в течение 2 ч при 4 °C. Затем отбирали супернатант из лунок и промывали их 2% раствором BSA в PBS. Добавляли клетки в полной среде и центрифугировали при 1800 g, 30 °C, в течение 30-40 минут. Растили клетки в течение 2-3 дней в CO₂-инкубаторе и анализировали уровень трансдукции методом проточной цитометрии.

2.2.2.11 Конфокальная микроскопия

Измерение уровня свечения GFP в трансфицированных клетках проводили на конфокальном микроскопе “Nikon Eclipse TE2000-E”, (Nikon, Япония), оснащенный тремя лазерами с длинами волн 408, 488 и 543 нм и стандартным набором фильтров. Получение изображений и дальнейший просмотр проводили с помощью программы “EZ-C1 for Nikon C1 confocal microscope”.

2.2.2.12 Определение теломеразной активности клеток

Измерение теломеразной активности проводили с использованием коммерческого набора (Millipore, США). Анализ был основан на выделении теломеразы из клеток, наращивании теломер в бесклеточной системе, с последующей амплификацией теломерных повторов и детекцией продукта с помощью горизонтального гель-электрофореза. Длина теломер, полученных в бесклеточной системе, при этом зависела от активности теломеразы. Качественное определение уровня активности теломеразы в этом тесте основано на визуальном сравнении ширины и количества полос в гель-электрофорезе с позитивным контролем, который предоставляется в наборе.

3 Результаты

3.1 Выбор условий стимуляции, приводящих к увеличению продолжительности жизни НК-клеток

Для получения долгоживущих популяций был осуществлен поиск оптимального метода стимуляции, который бы приводил к значительной пролиферации и экспансии НК-клеток. За основу был взят способ активации НК-клеток с использованием модифицированных фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21), показавший ранее свою эффективность в индукции пролиферации НК-клеток (Denman et al., 2012). В серии экспериментов было проведено сравнение выживаемости НК-клеток в культуре *in vitro* в условиях стимуляции IL-2, IL-2/K562-mbIL21 либо только фидерными клетками K562-mbIL21 в течение 14 дней. Максимальная клеточная выживаемость через 4 дня культивирования НК-клеток была выявлена при стимуляции IL-2 в отсутствие фидерных клеток, однако на 7-й и 14-й дни доля живых клеток в культуре в этих условиях стимуляции снижалась (Рис. 4). Стимуляция НК-клеток с K562-mbIL21 в отсутствие IL-2 приводила к уменьшению времени жизни клеток по сравнению с другими способами стимуляции, к 14-му дню культивирования живых клеток не обнаруживалось (Рис. 4). Несмотря на то, что доля выживших клеток на 4-й день при культивировании в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21 была наиболее низкой, далее было зарегистрировано статистически значимое повышение жизнеспособности этих клеток на 7-й день (Рис. 4). Через 14 дней культивирования доля живых клеток донор-опосредованно варьировала от 47 до 86%, что могло быть связано с различным субпопуляционным составом свежевыделенных НК-клеток у разных доноров.

Таким образом, было показано, что стимуляция IL-2 в комбинации с клетками K562-mbIL21 увеличивает жизнеспособность НК-клеток, по сравнению со стимуляцией только IL-2 или только K562-mbIL21. Этот способ был выбран для дальнейших исследований по получению долгоживущих популяций НК-клеток. Для того, чтобы нивелировать эффекты, связанные с гетерогенностью свежевыделенных НК-клеток, на выживаемость в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21, последующие эксперименты проводились на клональных культурах НК-клеток.

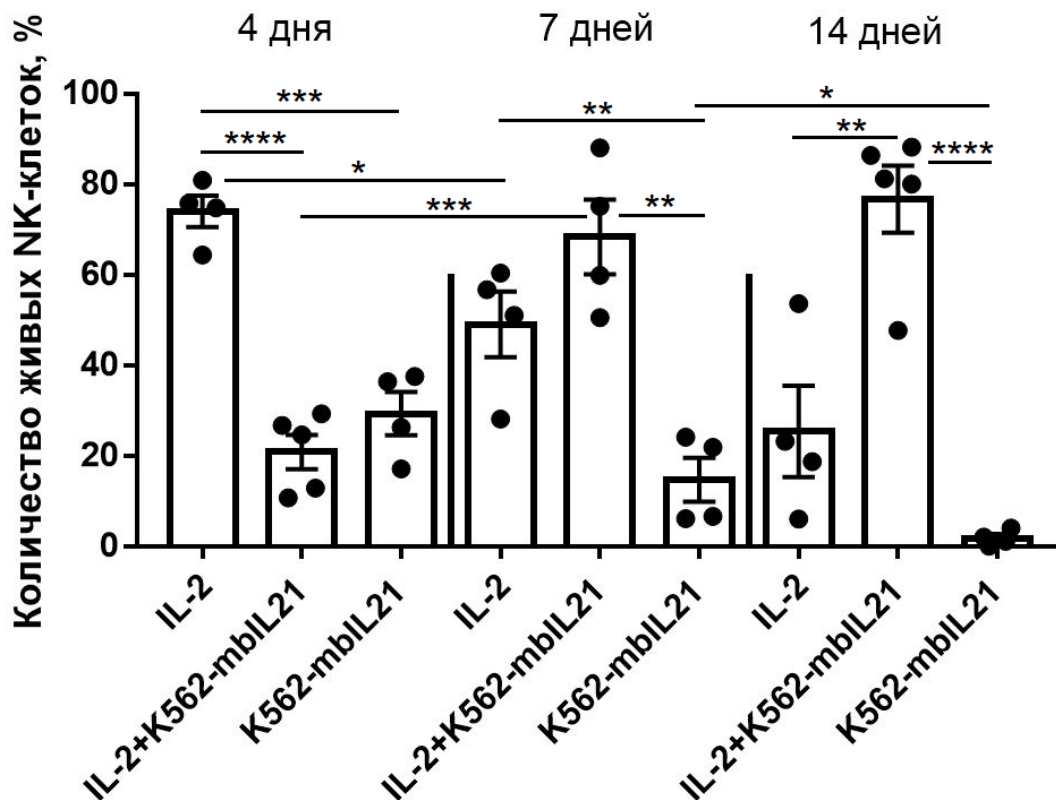


Рисунок 4. Выживаемость НК-клеток в условиях стимуляции IL-2, IL-2/K562-mbIL21 или K562-mbIL21, измеренная методом окрашивания с помощью аннексина V и пропидия йодида через 4, 7 и 14 дней культивирования.

3.1.1 Подбор условий начальной стимуляции НК-клеток для клонирования

Для получения клонов НК-клеток был применен способ помещения единичных клеток в лунки 96-луночного планшета с использованием клеточного сортировщика в режиме «single cell» (Рис. 5А). Сортировка в этом режиме приводила к выделению субпопуляций НК-клеток с чистотой 99%. Концентрация IL-2 100 ед./мл, использованная в этих экспериментах, была выбрана как промежуточная концентрация между концентрацией 10-50 ед./мл, используемой для культивирования НК-клеток с модифицированными фидерными клетками K562-mbIL21 (Denman et al., 2012; H Fujisaki et al., 2009; Lapteva et al., 2016; Liu et al., 2013b), и 500 ед./мл, рекомендованной для получения клонов НК-клеток с применением фидерных клеток RPMI-8866 (Cella and Colonna, 2000). Сходная концентрация IL-2 была использована для предварительной стимуляции НК-клеток, предназначенных для адоптивной иммунотерапии, в клинических испытаниях (Miller et al., 2005). Для выбора оптимального способа получения клонов НК-клеток было проведено сравнение нескольких вариантов стимуляции: IL-2, IL-2 + IL-21 (10 нг/мл), IL-2 + K562 (10^4 клеток/мл), IL-2 + K562-mbIL21 (10^4 клеток/мл), K562-mbIL21 (10^4 клеток/мл) (Рис. 5Б). Эффективность генерации клонов, или эффективность

клонирования (Е) была рассчитана как процентное содержание полученных клонов от общего количества лунок, в которые были помещены единичные НК-клетки. Удельное количество образовавшихся клонов НК-клеток, образованных под действием стимуляции только фидерными клетками K562-mbIL21, оказалось наименьшим (Рис. 5Б). При стимуляции НК-клеток с помощью IL-2, IL-2+IL-21 или IL-2+K562 эффективность генерации клонов составила 10-15% при незначительных различиях между комбинациями стимулов (Рис. 5Б). Однако, когда НК-клетки культивировали в присутствии IL-2 в комбинации с K562-mbIL21, эффективность генерации клонов значительно увеличивалась, достигая 30% или более в некоторых экспериментах. Таким образом, способ культивирования клонов НК-клеток в среде с IL-2 и K562-mbIL21 позволил получить наибольшее количество клонов, по сравнению с другими методами стимуляции, использованными в этой работе.

Проведена оценка влияния концентрации клеток K562-mbIL21, используемой при культивировании, на эффективность образования клонов и их выживаемость в процессе культивирования (Рис. 5В). Были выбраны концентрации 5×10^3 , 1×10^4 и 2×10^4 клеток/мл среды. Эффективность генерации клонов оказалась наивысшей при добавлении 10^4 клеток/мл. Для оценки уровня выживаемости клонов на каждой неделе культивирования высчитывали долю живых клонов (X) по формуле $X = X_1 / X_2 * 100$, где X_1 – это количество выживших клонов на определенной неделе, а X_2 – общее количество лунок, в которые были посажены НК-клетки. Процентное содержание выживших клонов через 7 недель культивирования при начальной стимуляции НК-клеток фидерными клетками в концентрации 10^4 клеток/мл оказалось наибольшим, по сравнению с другими условиями стимуляции (Рис. 5В). Таким образом, можно заключить, что оптимальные условия образования клонов НК-клеток могут быть достигнуты при стимуляции единичных НК-клеток с использованием 100 ед./мл IL-2 и 10^4 клеток K562-mbIL21 на мл среды (Рис. 5В). Эффективность клонирования варьировала от донора к донору, что могло связано с фенотипическими особенностями НК-клеток разных индивидов. Был проведен цитометрический анализ экспрессии NKG2A, NKG2C, CD57, CD16, KIR2DL2/DL3, NKp30 и NKp46 в свежeweделенных НК-клетках (Рис. 5Г). Была продемонстрирована значительная вариабельность уровня экспрессии ряда маркеров, и не было выявлено четкой взаимосвязи частоты генерации клонов с уровнем экспрессии этих маркеров у

разных

людей.

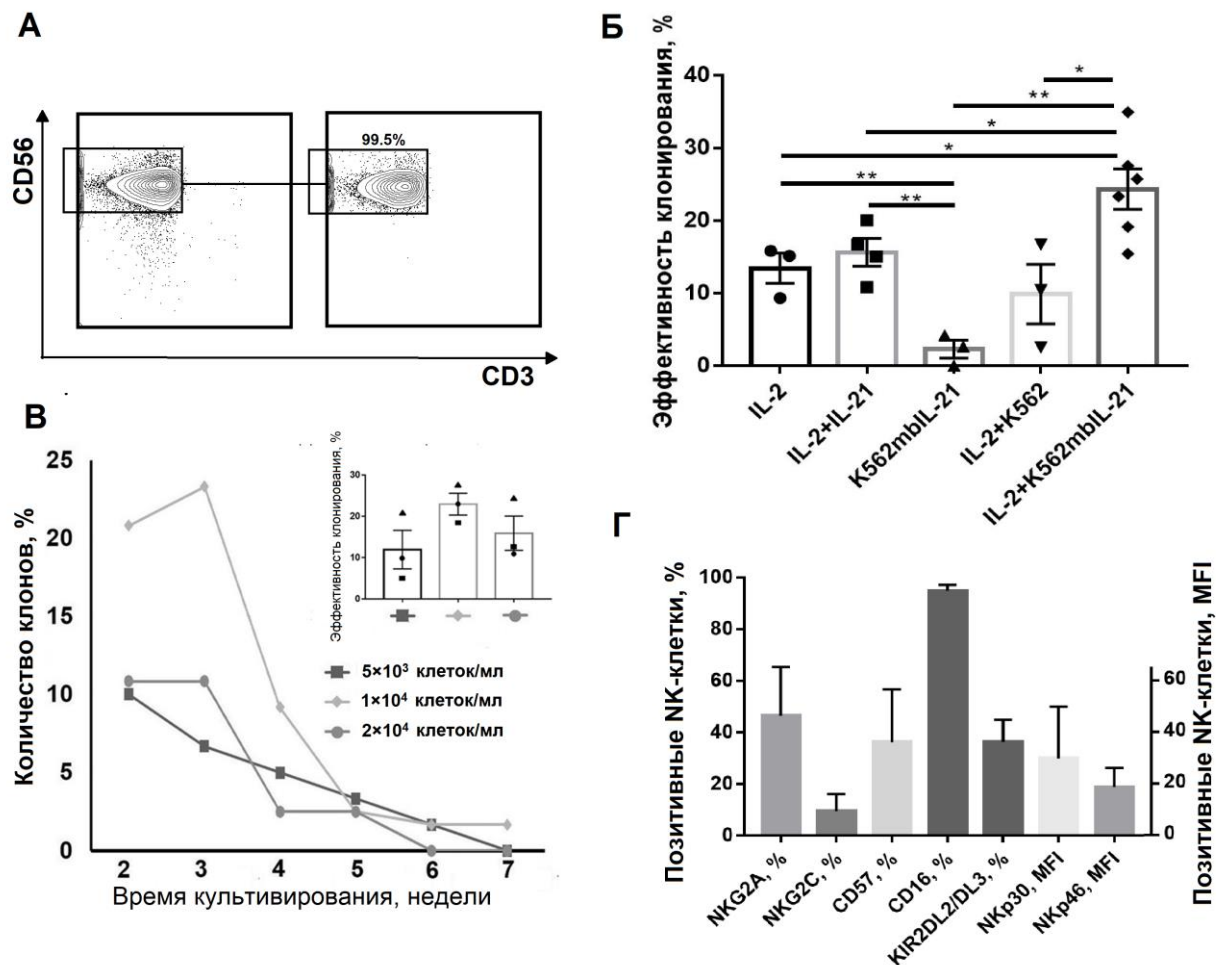


Рисунок 5. Выбор условий стимуляции и оптимизация метода клонирования НК-клеток. А) Стратегия сортировки цельной популяции НК-клеток и чистота полученной фракции клеток. Окрашивание сепарированных на магнитной колонке фракций НК-клеток проводили с использованием моноклональных антител к CD56 и CD3. Б) Эффективность образования клонов при различных условиях стимуляции. Представлено среднее значение \pm SE для n независимых экспериментов ($n = 3$ для IL-2; $n = 4$ для IL-2 + IL-21; $n = 3$ для K562-mbIL21; $n = 3$ для IL-2 + K562; $n = 5$ для IL-2 + K562-mbIL21). В) Выбор количества фидерных клеток K562-mbIL21, используемых для стимуляции образования большого числа долгоживущих клонов НК-клеток. Длительность жизни клонов после стимуляции разным количеством K562-mbIL21. Эффективность образования клонов в 3 независимых экспериментах представлены в столбцах разными символами. Г) Фенотипический анализ свежевыделенных НК-клеток перед сортировкой. Показано среднее \pm SD для 8 экспериментов.

3.1.2 Влияние условий культивирования клонов НК-клеток на их продолжительность жизни и уровень клеточной экспансии.

Далее проводилось изучение влияния частоты добавления фидерных клеток в процессе культивирования на выживание и экспансию клонов. Были разработаны две модели культивирования клонов, отличающиеся по схеме рестимуляции фидерными

клетками K562-mbIL21, что привело к получению клонов с разной продолжительностью жизни. В обеих моделях начальные условия клонирования были одинаковыми (100 ед./мл IL-2 и 10^4 клеток/мл K562-mbIL21). Модель 1 включала еженедельное добавление фидерных клеток (10^4 клеток/мл) вместе с заменой половины культуральной среды на свежую, содержащую IL-2 (Рис. 6А). В модели 2 еженедельно производилась только замена половины среды на свежую с IL-2. Фидерные клетки добавлялись единожды через 6 недель культивирования (Рис. 6Б).

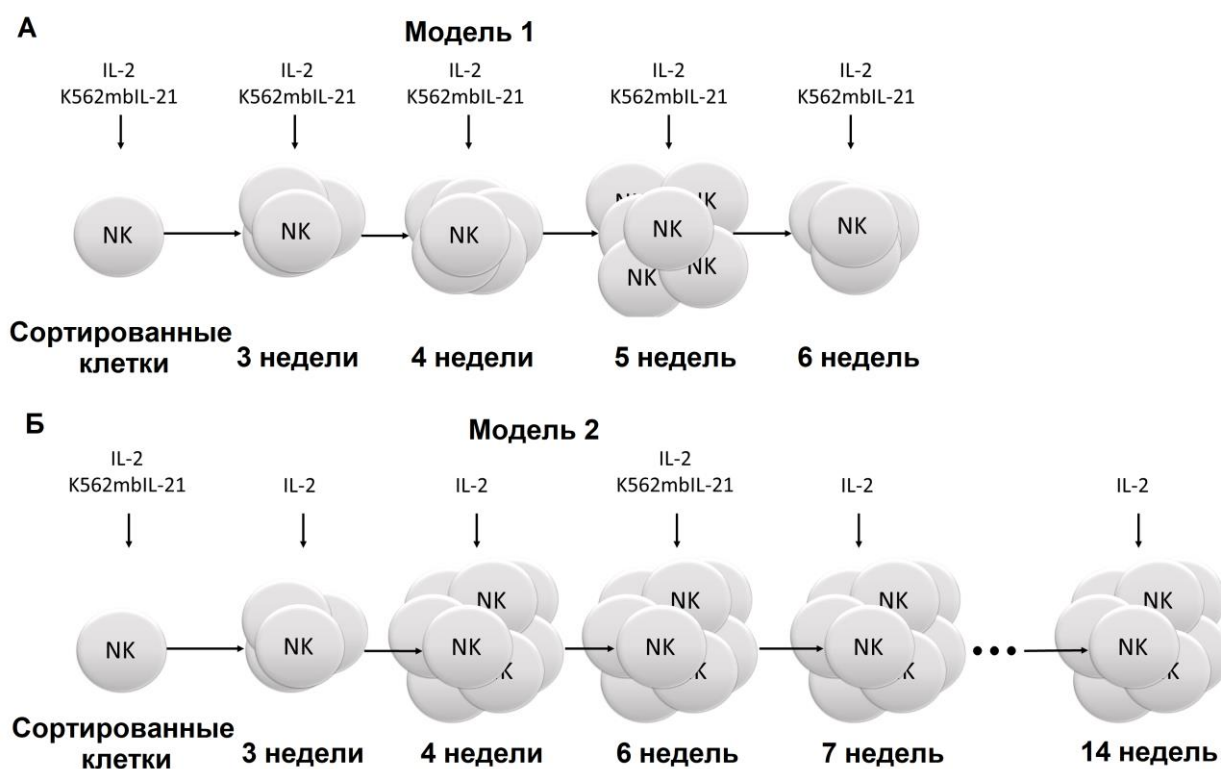


Рисунок 6. Схемы моделей культивирования клонов NK-клеток. А) Модель 1, включающая еженедельное добавление фидерных клеток, начиная с третьей недели. Б) Модель 2, включающая однократное добавление фидерных клеток через 6 недель.

Была оценена выживаемость клонов, культивируемых в соответствии с моделями 1 и 2. Выживаемость (S) высчитывали по формуле $S = X_n / E * 100$, где X_n – процент живых клонов (X) на исследуемой неделе (n), E – эффективность образования клонов. Клоны, культивируемые в соответствии с моделью 1, как правило, имели более короткий срок жизни, чем клоны, культивируемые по модели 2. Средняя выживаемость клонов, выращиваемых по модели 1, через 5 недель составила около 40% (Таблица 1). Однако, все эти клоны погибали в течение 7-й недели культивирования. В отличие от способа культивирования по модели 1, использование модели 2 приводило к значительному увеличению длительности жизни клонов. Около 30% клонов оставались в живых через 7

недель культивирования. Доля долгоживущих клонов, срок жизни которых составлял 8 или более недель, составляла 15,6%, а 11,6% из этих клонов демонстрировали наибольшую продолжительность жизни сроком до 14 недель.

После 5-и недель культивирования общее количество клеток в клонах, полученных с помощью модели 1, достигало значений в диапазоне от 5×10^4 до 3×10^6 клеток на клон (таблица 1). В клонах, культивируемых в соответствии с моделью 2, вариабельность уровня клеточной экспансии была намного выше. Через 7 недель культивирования, часть проанализированных хорошо пролиферирующих клонов образовало более 5×10^6 клеток на клон. В трех наиболее хорошо пролиферирующих клонах, культивируемых по модели 2, общее количество клеток на клон достигало $1-2 \times 10^7$ клеток.

Таблица 1. Выживаемость (S) и уровень экспансии клонов NK-клеток, культивируемых по модели 1 и модели 2. Общее количество клеток (уровень экспансии) подсчитывали в случайно выбранных хорошо пролиферирующих клонах.

	Выживаемость, % (среднее \pm SD)		Общее количество клеток в хорошо пролиферирующих клонах (среднее \pm SD)		
	5 недель	7 недель	5 недель (19 клонов)	7 недель (25 клонов)	12 недель (10 клонов)
Модель 1 (3 коллекции)	42 \pm 5	-	1.2*10 ⁶ \pm 1.14*10 ⁶	-	-
Модель 2 (6 коллекций)		30 \pm 18		2.8*10 ⁶ \pm 4.0*10 ⁶	3.9*10 ⁶ \pm 5.84*10 ⁶

3.1.2.1 Сравнение фенотипа и функциональной активности клонов, полученных с помощью культивирования по моделям 1 и 2

Был проанализирован фенотип полученных клонов NK-клеток. Все клоны имели фенотип CD56⁺CD3⁻. Уровень экспрессии CD56 увеличивался к 5-ти неделям культивирования, независимо от модели культивирования (Рис. 7А).

Для измерения уровня активации NK-клеток был выбран маркер HLA-DR, который считается маркером активации и/или пролиферации (Benlahrech et al., 2009). Уровень экспрессии HLA-DR, измеренный после культивирования в течение 5 недель, был выше в клонах, рестимулированных еженедельно с IL-2 и K562-mbIL21 (модель 1) по сравнению с клонами, которые культивировались без рестимуляции фидерными клетками, но с еженедельным добавлением IL-2 (модель 2) (Рис. 7Б). Поскольку увеличение уровня HLA-DR наблюдалось в некоторых, но не во всех хорошо пролиферирующих клонах, можно заключить, что экспрессия HLA-DR не является надежным маркером пролиферации для

клонов НК-клеток. В клонах, выращиваемых по модели 2, высокий уровень экспрессии HLA-DR наблюдался уже через 3 недели после начала культивирования, но позже снижался даже в хорошо пролиферирующих клонах (Рис. 7А). Таким образом, по-видимому, контактные взаимодействия с IL-21-экспрессирующими фидерными клетками вызывают увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR в клонах НК-клеток, что соответствует данным, полученным в нашей лаборатории на общей популяции НК-клеток (Erokhina et al., 2018).

Экспрессия рецептора антитело-зависимой клеточной цитотоксичности CD16 характерна для CD56^{dim}-НК-клеток, обладающих высоким цитотоксическим потенциалом. Было проведено сравнение поверхностного уровня экспрессии CD16 в клонах, полученных с помощью разных моделей культивирования. В клонах, полученных по модели 1, был зарегистрирован высокий уровень экспрессии CD16, увеличивающийся во время культивирования. У клонов, выращенных по модели 2, уровень экспрессии CD16, измеренный на 3-й неделе, оказался значительно ниже, и наблюдалось дальнейшее снижение уровня экспрессии к 5-й неделе культивирования (Рис. 7А).

Для проверки функционального потенциала клонов, был измерен уровень продукции IFN- γ в ответ на IL-2 без добавления других цитокинов. Часть клонов продуцировало IFN- γ , интенсивность выделения которого значительно различалась между клонами. Статистический анализ выявил значительную разницу в секреции IFN- γ между клонами, выращенными в моделях 1 и 2 (Рис. 7В). Все проанализированные клоны, культивируемые с помощью модели 1, продуцировали IFN- γ без дополнительной стимуляции комбинацией цитокинов. Напротив, в клонах, культивируемых с помощью модели 2, менее чем у 50% анализируемых клонов был зарегистрирован низкий уровень секреции IFN- γ . В супернатантах других протестированных клонов уровень IFN- γ был ниже порога детекции.

Таким образом, еженедельная рестимуляция с помощью IL-2 + K562-mbIL21 (модель 1), а не только с помощью IL-2 (модель 2), способствовала увеличению уровня экспрессии CD16 и HLA-DR в клонах, демонстрирующих фенотип более активированных НК-клеток, способных к антитело-зависимой цитотоксичности.

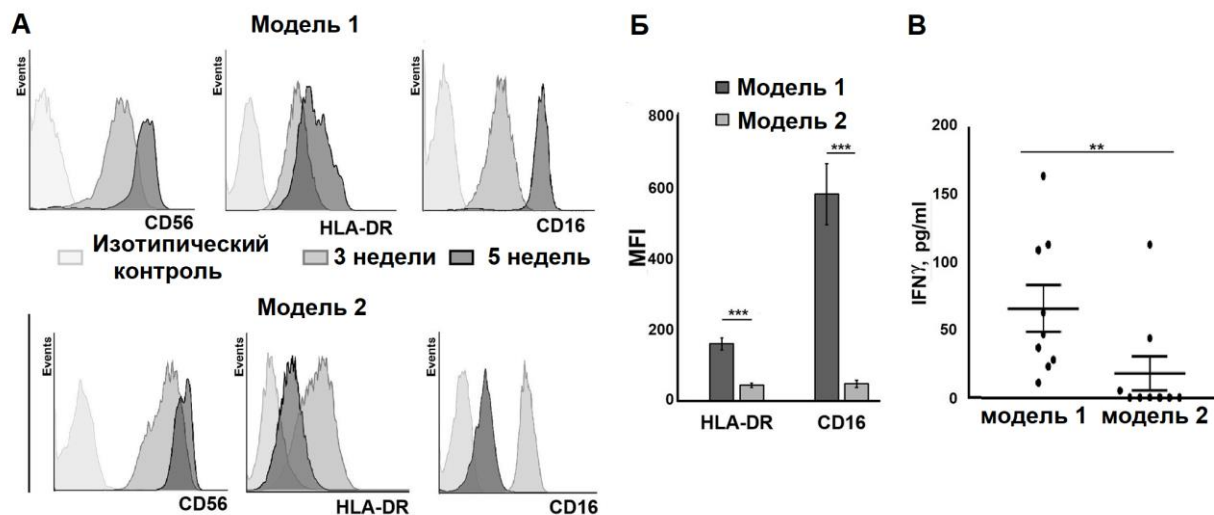


Рисунок 7. Экспрессия поверхностных маркеров и секреция IFN- γ в клонах НК-клеток зависит от модели культивирования. А) Динамика экспрессии поверхностных маркеров в клонах НК-клеток, полученных с помощью моделей 1 и 2. Измерения проводились на 3-й и 5-й неделях культивирования. Б) Различия в экспрессии поверхностных маркеров при культивировании клонов по моделям 1 и 2 (измерения проводились на 5-й неделе). В) Сравнение уровня IFN- γ в супернатантах клонов, полученных в моделях 1 и 2.

3.1.2.1.1 Изучение влияния рестимуляции фидерными клетками на фенотипические и функциональные характеристики клонов

Чтобы изучить влияние фидерных клеток на фенотип и функциональную активность клонов, некоторые клоны, выращенные с использованием модели 2, были разделены на две равные части через 6 недель культивирования. Данная точка была выбрана как максимальное время инкубации клонов без добавления фидерных клеток. Выбранные клоны культивировали далее в течение двух недель в присутствии 100 ед./мл IL-2. Помимо этого, к одной из частей клона еженедельно добавляли фидерные клетки. Фенотип данных клонов был измерен через две недели (Рис. 8). Клоны, культивируемые с фидерными клетками, имели более активированный фенотип, характеризующийся увеличением уровня экспрессии маркеров активации HLA-DR и CD86. Уровень экспрессии рецепторов натуральной цитотоксичности NKp44 и NKp46 и ингибирующего NKG2A-рецептора также в среднем увеличивался. Клетки клонов демонстрировали повышение уровня CD56 и NKG2D. Таким образом, можно сделать вывод, что контактное взаимодействие между НК-клетками и фидерными клетками приводит к дополнительной активации даже на поздних неделях культивирования. Интересно, несмотря на то, что на момент измерения данные клоны культивировались в течение 8 недель, фенотипический

профиль клонов больше похож на профиль малодифференцированных CD56^{bright}, чем на профиль зрелых NK-клеток CD56^{dim}.

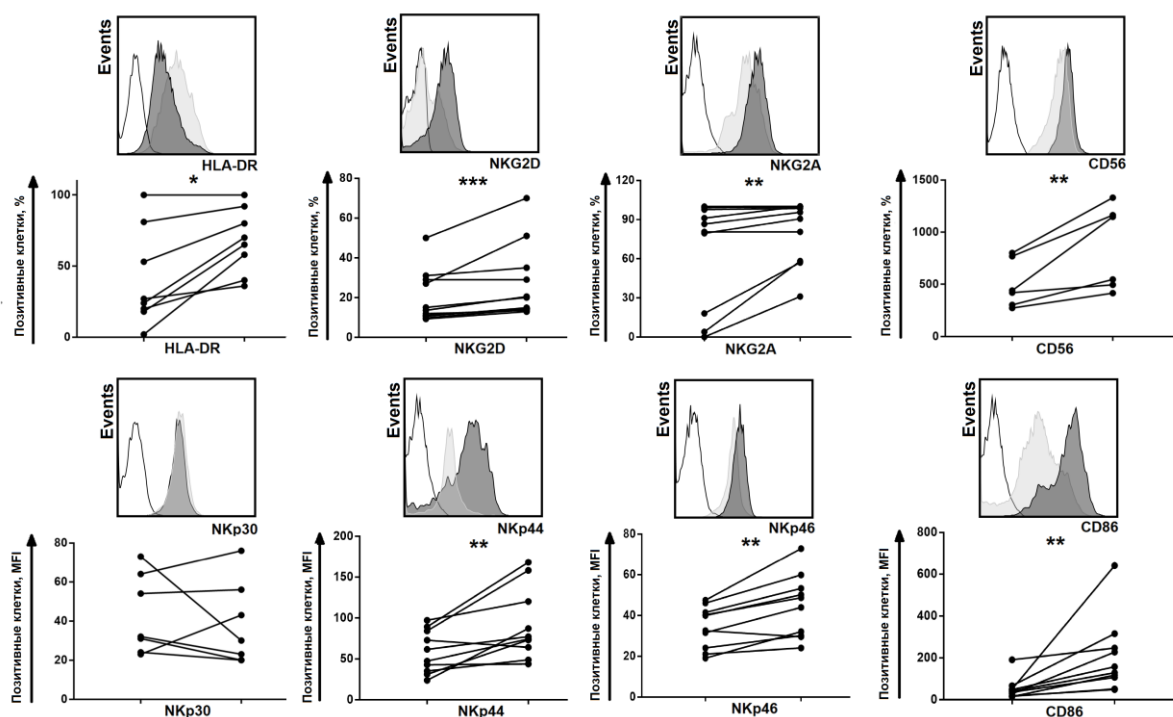


Рисунок 8. Фенотипический анализ клеток клонов, которые были разделены на две равные части после 6 недель культивирования по модели 2. Половина клеток клона культивировалась в присутствии только IL-2, ко другой части клеток еженедельно добавляли IL-2 и K562-mbIL21. Фенотипический анализ клонов, измеренный через 2 недели после разделения. На гистограммах представлен уровень экспрессии маркеров репрезентативного клона. Светло-серым обозначен фенотип части клона, культивируемого в среде без добавления фидерных клеток, темно-серым – фенотип клона, рестимулированного комбинацией IL-2/K562-mbIL21. На графиках показано изменение уровня экспрессии поверхностных маркеров, культивируемых клонов без (слева) и с добавлением фидерных клеток (справа). Для определения статистических различий использовали критерий Уилкоксона.

Для сравнения функциональной активности клонов, клоны были разделены на две части на 2 неделе культивирования. Одну часть клеток каждого из клонов культивировали по модели 1 с еженедельной рестимуляцией K562-mbIL21. Другую часть клеток клонов пересаживали только с использованием IL-2-содержащей среды. Через две недели была проведена оценка уровня секреции IFN- γ , внутриклеточной экспрессии гранзима В и уровня натуральной цитотоксичности. Было зарегистрировано статистически значимое снижение уровня натуральной цитотоксической активности в клонах, рестимулированных комбинацией IL-2 и K562-mbIL21, по сравнению с клонами, стимулированными только IL-2 (Рис. 9А В то же время, клоны, повторно стимулированные фидерными клетками, имели повышенный уровень внутриклеточного гранзима В (Рис. 9Б). Для определения

способности продуцировать IFN- γ клетки переносили в среду без цитокинов на 24 часа, а затем повторно стимулировали комбинацией IL-12 и IL-15 в течение 18 часов. Было обнаружено, что контактные взаимодействия с фидерными клетками во время культивирования увеличивали уровень продукции IFN- γ (Рис. 9В), что подтверждает данные, приведенные на рисунке 7В.

Таким образом, клоны, культивируемые по модели 1, обладали более активированным фенотипом и уровнем продукции IFN- γ . Однако, уровень цитотоксической активности у них оказался сниженным, по сравнению с клонами, культивируемыми по модели 2. Клоны, полученные с помощью модели 2, обладали большим уровнем экспансии и более высокой продолжительностью жизни, по сравнению с клонами, полученными в модели 1, что, в совокупности с повышенной цитотоксической активностью, повышает их значимость для клинического применения. Модель культивирования 2 была использована в последующих экспериментах.

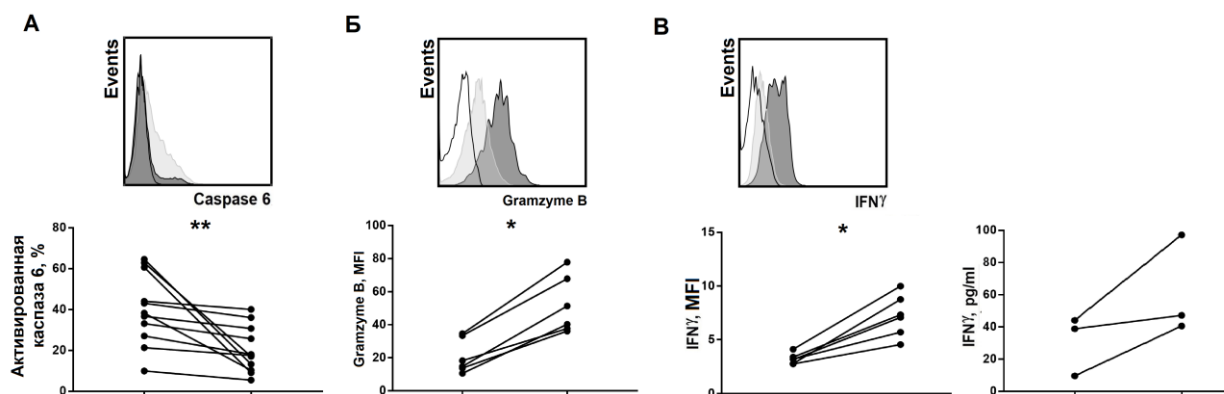


Рисунок 9. Функциональный анализ клеток клонов, разделенных на две равные части через 2 недели культивирования. А) Натуральная цитотоксичность клонов, стимулированных в течение двух недель только IL-2 (светло-серый; слева) и IL-2 с добавлением фидерных клеток (темно-серый; справа). Б) Внутриклеточный уровень гранзима В в клонах, культивируемых без (светло-серый; слева) и в присутствии фидерных клеток (темно-серый; справа). В) Продукция IFN- γ в клонах, стимулированных без (светло-серый; слева) или с добавлением (темно-серый; справа) клеток K562-mbIL21. Представлены показатели внутриклеточного уровня IFN- γ и концентрации IFN- γ в культуральных супернатантах. Для определения статистических различий использовали критерий Уилкоксона.

3.2 Изучение эффективности образования, экспансии и выживаемости клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека

3.2.1 Анализ эффективности образования клонов, полученных из НК-клеток человека, различных по степени дифференцировки

Считается, что за счет наличия на поверхности НК-клеток CD56^{bright} рецептора CD25, эти клетки лучше реагируют на стимуляцию IL-2, что может способствовать их выживанию и пролиферации (Caligiuri et al., 1990). В данной работе было получено несколько коллекций клонов из субпопуляций НК-клеток CD56^{bright} и CD56^{dim}. Чистота сортировки данных субпопуляций в указанных условиях представлена на рисунке 10А. Эффективность клонообразования оказалась выше у НК-клеток из субпопуляции CD56^{bright} (Рис. 10Б). Более дифференцированные клетки с фенотипом CD56^{dim} также реагировали на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21, но формировали меньше клонов. Следовательно, стадия дифференцировки НК-клетки влияет на способность этой клетки пролиферировать в ответ на данную комбинацию стимулов.

Далее проводилось более детальное изучение зависимости эффективности клонирования от этапа дифференцировки НК-клеток. По стадии дифференцировки циркулирующие НК-клетки можно разделить на три группы: CD56^{bright}CD57⁻, CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57⁺. Процентное соотношение этих популяций в периферической крови доноров различно. Субпопуляция CD56^{bright}CD57⁻ представляет наименее зрелые НК-клетки, а CD56^{dim}CD57⁺ НК-клетки являются наиболее дифференцированными (Bjorkstrom et al., 2010; Nielsen et al., 2013). Было сделано предположение, что с возрастанием степени дифференцированности будет снижаться способность НК-клеток образовывать клоны. В этом случае соотношения субпопуляций в выделенных НК-клетках могут влиять на их пролиферативный ответ. В данном исследовании был проанализирован потенциал клонообразования субпопуляций НК-клеток CD56^{bright}CD57⁻, CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57^{bright}, выделенных из шести индивидов (Рис. 10В). Наименьшая частота образования клонов наблюдалась в субпопуляции высокодифференцированных CD56^{dim}CD57^{bright}-НК-клеток, наибольшая эффективность клонирования была показана для НК-клеток с фенотипом CD56^{bright} (Рис. 10В). Несмотря на существенные вариации в частоте образования клонов НК-клеток от разных доноров, в каждой коллекции величины эффективности клонирования НК-клеток из разных субпопуляций соответствовали следующей схеме: CD57^{bright} < CD56^{dim}CD57⁻ < CD56^{bright} (Рис. 10В). Можно заключить, что менее дифференцированные НК-клетки обладают более высоким пролиферативным ответом на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21, по сравнению с более дифференцированными клетками (Рис. 10Б,В). Таким образом, этап

дифференцировки NK-клеток определяет их пролиферативный ответ в текущих условиях стимуляции.

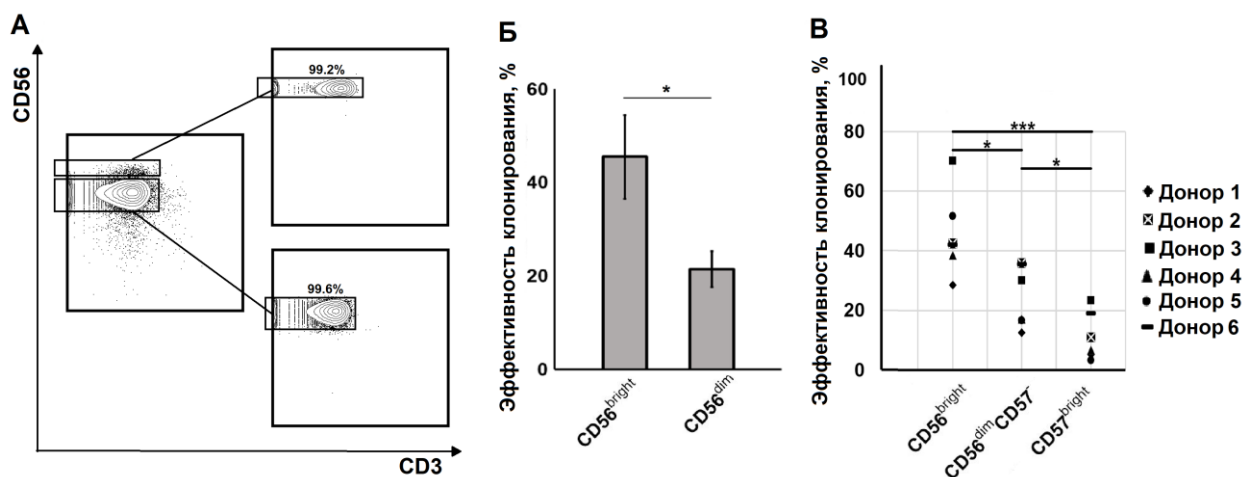


Рисунок 10. Получение клонов из субпопуляций $CD56^{\text{bright}}$ и $CD56^{\text{dim}}$. А) Схема сортировки субпопуляций NK-клеток с использованием маркеров CD3, CD56 и чистота отсортированных субпопуляций. Б) Эффективность генерации клонов из субпопуляций $CD56^{\text{bright}}$ и $CD56^{\text{dim}}$. В каждом столбце представлены данные 4 коллекций клонов. В) Эффективность клонирования в субпопуляциях $CD56^{\text{bright}}CD57^{-}$, $CD56^{\text{dim}}CD57^{-}$, $CD56^{\text{dim}}CD57^{\text{bright}}$.

3.2.2 Анализ эффективности образования клонов, из NK-клеток, различных по степени дифференцировки, активации либо по уровню экспрессии NKG2C.

В качестве дополнительных поверхностных маркеров для поиска высокопролиферирующих субпопуляций NK-клеток, были выбраны молекула HLA-DR, экспрессирующаяся, как правило, на активированных NK-клетках, и рецептор NKG2C, повышенная экспрессия которого наблюдается при формировании пула адаптивных NK-клеток, ассоциированных с цитомегаловирусной инфекцией. На основе данных маркеров было произведено два варианта разделения NK-клеток на субпопуляции. В первой серии экспериментов (вариант 1) субпопуляции $CD56^{\text{bright}}CD57^{-}$ и $CD56^{\text{dim}}CD57^{-}$ были дополнительно поделены на HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺ (Рис. 11). Клетки $CD56^{\text{dim}}CD57^{\text{bright}}$ не были разделены на HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺ из-за низкого уровня экспрессии HLA-DR и содержания HLA-DR⁺-клеток в этой субпопуляции. Во втором варианте разделения (вариант 2) была проведена сортировка клеток по уровню экспрессии NKG2C. В нативных NK-клетках здоровых доноров можно обнаружить NKG2C-позитивные клетки во всех трех субпопуляциях, отличающихся по уровню дифференцировки. Таким образом, клетки были поделены на 6 субпопуляций: $CD56^{\text{bright}}NKG2C^{-}$, $CD56^{\text{bright}}NKG2C^{+}$, $CD56^{\text{dim}}CD57^{-}NKG2C^{-}$, $CD56^{\text{dim}}CD57^{-}NKG2C^{+}$, $CD56^{\text{dim}}CD57^{\text{bright}}NKG2C^{-}$ и $CD56^{\text{dim}}CD57^{\text{bright}}NKG2C^{+}$. Дополнительно было проведено тестирование доноров на серопозитивность путем

определения CMV-специфичных антител IgG. Для формирования коллекций клонов были выбраны серопозитивные по CMV доноры с высоким поверхностным уровнем NKG2C. Доля NKG2C⁺ в исходной популяции NK-клеток у данных индивидов составляла от 14% до 48%.

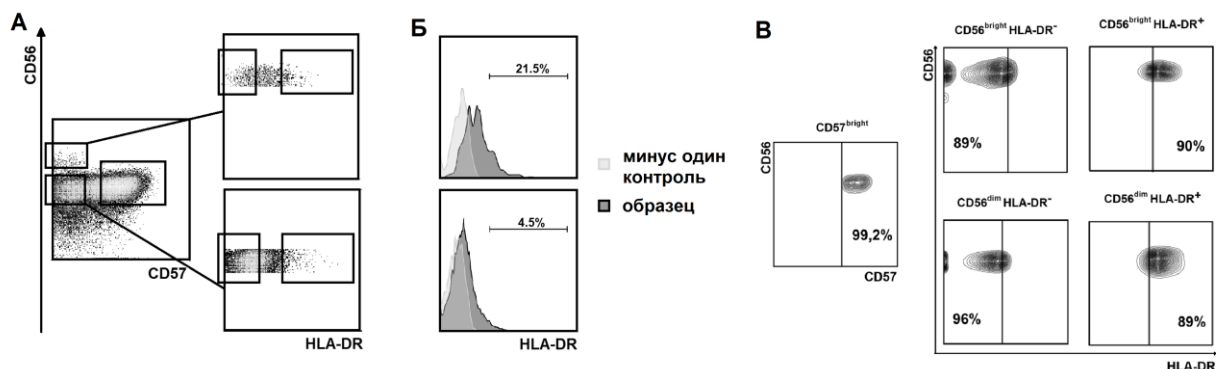


Рисунок 11. Схема разделения NK-клеток на субпопуляции по степени дифференцированности клеток и их активационного статуса. А) Схема сортировки субпопуляций NK-клеток с использованием маркеров CD56, CD57 и HLA-DR. Б) Поверхностная экспрессия HLA-DR, измеренная в CD56^{bright} (верхняя гистограмма) и CD56^{dim} (нижняя гистограмма) NK-клетках. Светло-серым представлен контроль флуоресценции «минус один» (FMO) по окрашиванию HLA-DR. В) Анализ чистоты NK-клеток после сортировки в режиме «single cell».

Не было обнаружено существенных различий в эффективности клонирования между клонами, полученными из HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных NK-клеток в пределах одной стадии дифференцировки (Рис. 12А). Тем не менее, наблюдалась тенденция к повышению эффективности клонирования в клонах, полученных из HLA-DR-позитивных NK-клеток, по сравнению с негативными.

Во втором варианте клонирования также не было найдено статистических различий в эффективности клонирования NKG2C-позитивных и негативных NK-клеток, находящихся на одной стадии дифференцировки (Рис. 12Б). В отличие от результатов клонирования по варианту 1, не было получено статистических различий в эффективности генерации клонов из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57⁺. Возможно, это связано с тем, что для получения клонов по варианту 2 были выбраны CMV-серопозитивные доноры с высоким уровнем экспрессии NKG2C на поверхности клеток. По крайней мере, у части таких доноров NK-клетки с фенотипом CD57⁺ могли обладать повышенной пролиферативной активностью. Интересно отметить, что средняя эффективность генерации клонов из субпопуляций, разделенных по варианту 1, полученных из популяции CD57^{bright}, составила 9,5%. При получении клонов по варианту 2 частота образования клонов из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻ и

$CD56^{\dim}CD57^+NKG2C^+$ повысилась и составила в среднем 28% и 26%, что соизмеримо со средней частотой получения клонов (24%) из субпопуляции $CD56^{\dim}CD57^-HLA-DR^-$.

Можно заключить, что состояние активации НК-клеток, оцененное по уровню экспрессии HLA-DR, и наличие/отсутствие NKG2C на поверхности клеток, по-видимому, не влияет на процесс генерации клонов в пределах одной стадии дифференцировки в данных условиях стимуляции. Следовательно, разная величина экспансии НК-клеток, наблюдаемая у разных доноров, может, по крайней мере частично, быть результатом различий в начальных пропорциях субпопуляций НК-клеток на определенной стадии дифференцировки.

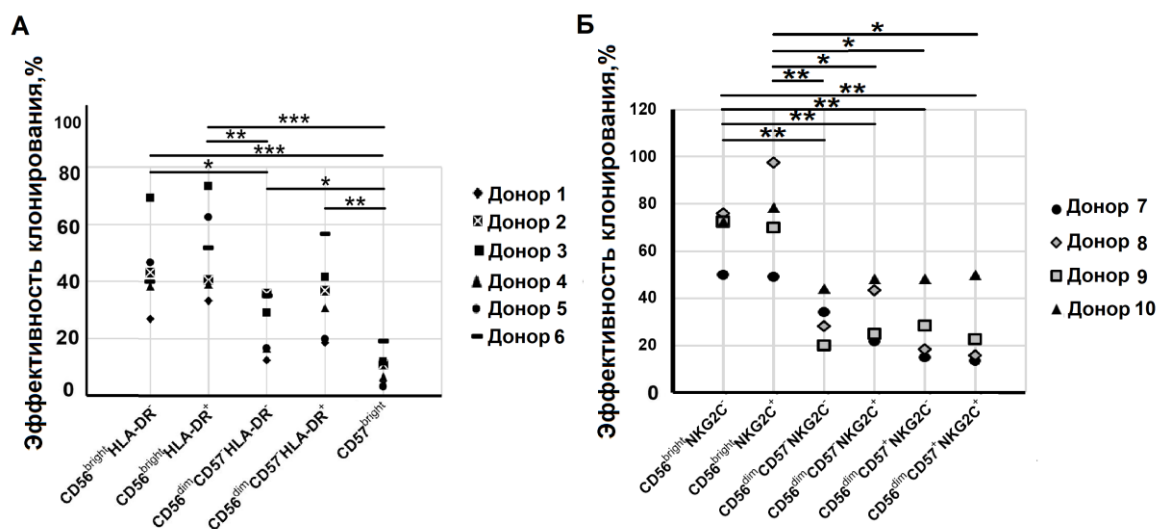


Рисунок 12. Сравнение эффективности образования клонов, полученных с помощью варианта 1 и варианта 2. А) График частоты образования клонов (Е) в пяти субпопуляциях НК-клеток, разделенных по степени дифференцировки и уровню активации, для каждого из шести доноров. Б) График частоты образования клонов (Е) в шести субпопуляциях НК-клеток, разделенных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C, для каждого из четырех доноров.

3.2.3 Изучение продолжительности жизни клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека.

Был проведен анализ продолжительности жизни клонов, полученных из разных субпопуляций. Для этого был высчитан процент живых клонов (X) на каждой неделе культивирования и выживаемость (S) клонов на неделях 5-8. Как было упомянуто выше, $CD56^{\text{bright}}$ -НК-клетки образывали больше клонов в ответ на стимуляцию IL-2 и K562-mbIL21, чем $CD56^{\dim}$ -НК-клетки (Рис. 10 Б,В). Однако через 5-6 недель культивирования количество клеток в клонах из $CD56^{\text{bright}}$ -субпопуляций резко уменьшалось, и более 80% этих клонов погибали к 7-8 неделе (Рис. 13А). Выживаемость клонов из субпопуляции $CD56^{\text{bright}}$ на 5-8 неделях культивирования была в 1,65 раза ниже, чем в клонах из

субпопуляций CD56^{dim}. CD56^{dim}-NK-клетки образовывали меньше клонов, по сравнению с NK-клетками CD56^{bright}, однако клоны из субпопуляции CD56^{dim} продемонстрировали статистически значимое повышение выживаемости в процессе культивирования (Рис. 13Б). Таким образом, можно заключить, что стадия дифференцировки влияет не только на эффективность образования, но и на продолжительность жизни клонов.

При использовании первого варианта разделения клоны, полученные из HLA-DR-негативных NK-клеток, жили дольше, чем полученные из HLA-DR-позитивных (Рис. 13А, В). Самая высокая выживаемость клонов была зарегистрирована в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻ (Рис. 13Б). Срок жизни небольшой части клонов из этой субпопуляции достигал 13-14 недель при общем количестве клеток $1-2 \cdot 10^7$ (Рис. 15). Таким образом, только небольшое число клонов NK-клеток, в основном, клоны NK-клеток CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻, способны к длительной пролиферации в ответ на стимулы.

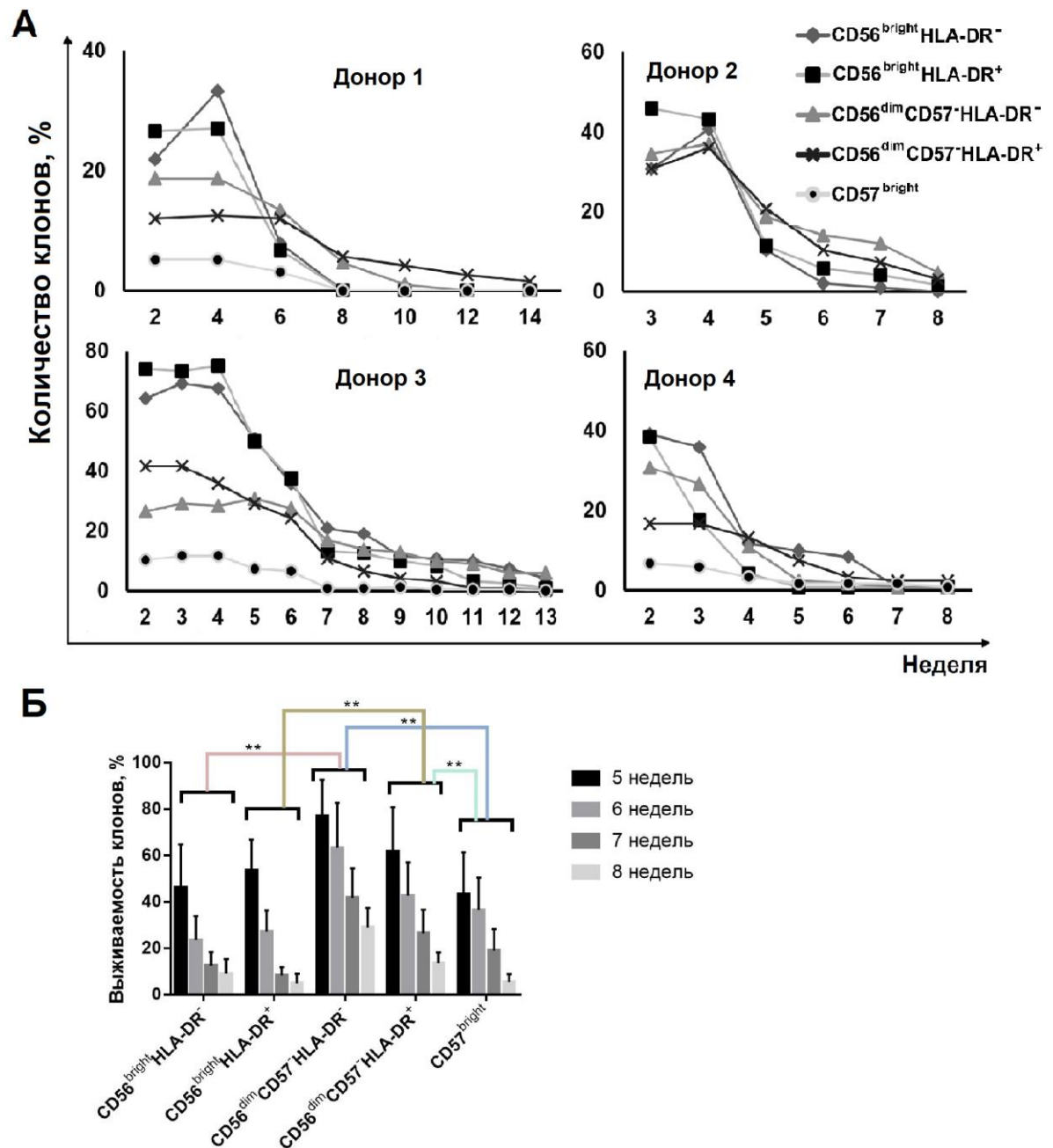


Рисунок 13. Продолжительность жизни и выживаемость клонов НК-клеток, полученных из субпопуляций, различных по степени дифференцировки и уровню активации. А) Доля живых клонов (X), измеренная на каждой неделе культивирования, рассчитанная от общего количества помещенных в лунки планшета единичных НК-клеток. Представлены данные коллекций клонов от четырех доноров. Б) Доля выживших клонов (S), измеренная на 5-8 неделях после начала культивирования. Значения представлены в виде среднего по четырем донорам \pm SE.

Анализ данных продолжительности жизни клонов по варианту разделения 2 показал, что клоны из НК-клеток NKG2C⁺ обладают большей продолжительностью жизни, по сравнению с клонами из субпопуляций NKG2C⁻. Самая большая доля

долгоживущих клонов во всех коллекциях была зарегистрирована в субпопуляции $CD57^- NKG2C^+$ (Рис. 14А). Было показано, что выживаемость клонов из субпопуляций $NKG2C^+$ на 7-й неделе культивирования, как и общее количество клеток в клоне, в большинстве случаев была более высокой, чем из соответствующих субпопуляций $NKG2C^-$. Стоит отметить, что выживаемость клонов, полученных из неразделенной субпопуляции $CD57^{bright}$, на 7-й неделе культивирования составила $25,0 \pm 4,1$ % (среднее \pm SE) (Рис. 13Б). Однако, были получены статистические различия доли выживших клонов при разделении данной субпопуляции на $CD57^{bright}NKG2C^-$ и $CD57^{bright}NKG2C^+$. Доля выживших клонов из позитивных по $NKG2C$ клеток достигала $53,0 \pm 16,9$ % (Рис. 14Б). Доля живых клонов из субпопуляции $CD57^{bright}NKG2C^-$ оказалась ниже доли живых клонов из неразделенной субпопуляции и составила $18,0 \pm 8,8$ % (среднее \pm SE). Можно заключить, что экспрессия рецептора $NKG2C$ в НК-клетках ассоциирована с лучшей пролиферацией и более высокой жизнеспособностью клонов НК-клеток. Таким образом, клетки с фенотипом адаптивных НК-клеток $NKG2C^+CD57^+$ способны пролиферировать в ответ на стимуляцию $IL-2/K562-mbIL21$. Однако, нужно отметить, что хорошо пролиферирующие клоны «адаптивных» НК-клеток наблюдались не у всех доноров, даже при сходной доле НК-клеток $NKG2C^+$.

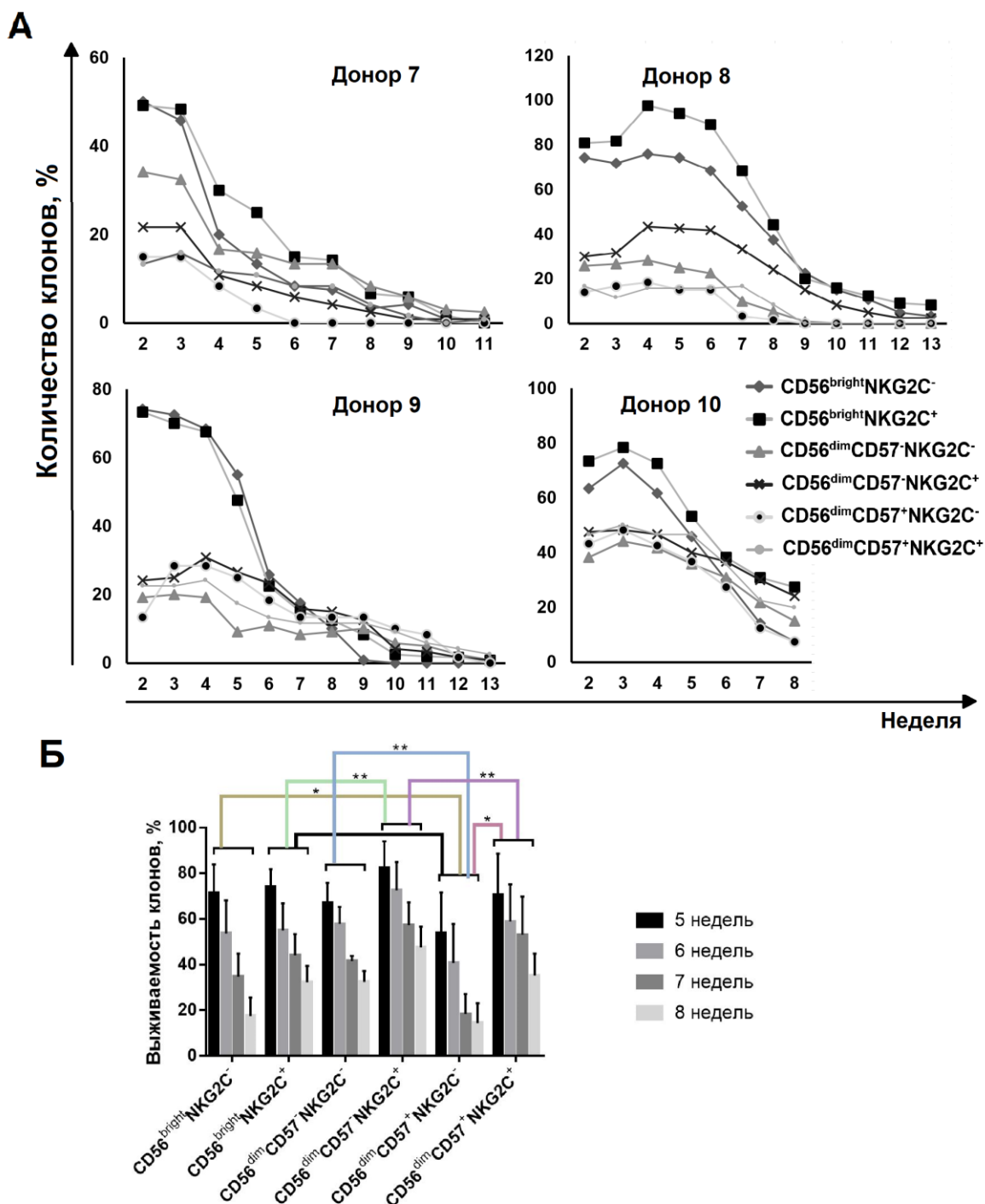


Рисунок 14. Продолжительность жизни и выживаемость клонов НК-клеток, полученных из субпопуляций, различных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C. А) Доля живых клонов (X), измеренная на каждой неделе культивирования, рассчитанная от общего количества помещенных в лунки планшета единичных НК-клеток. Представлены данные коллекций клонов от четырех доноров. Б) Доля выживших клонов (S), измеренная на 5-8 неделях после начала культивирования. Значения представлены в виде среднего по четырем донорам \pm SE.

3.2.4 Изучение экспансии долгоживущих клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток человека.

Были получены данные по общему количеству клеток и экспансии отдельных клонов, полученных из отличных по степени дифференцировки и уровню активации НК-клеток. Наблюдалась большая вариабельность количества клеток в клонах, полученных из различных субпопуляций (Рис. 15). Кроме того, количество клеток также сильно варьировало в пределах одной субпопуляции в каждой индивидуальной коллекции клонов (Рис. 15А). Наибольшее количество клеток (до 2×10^7) было зарегистрировано в части клонов, полученных из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{-}HLA-DR^{-}$ (Рис. 15Б).

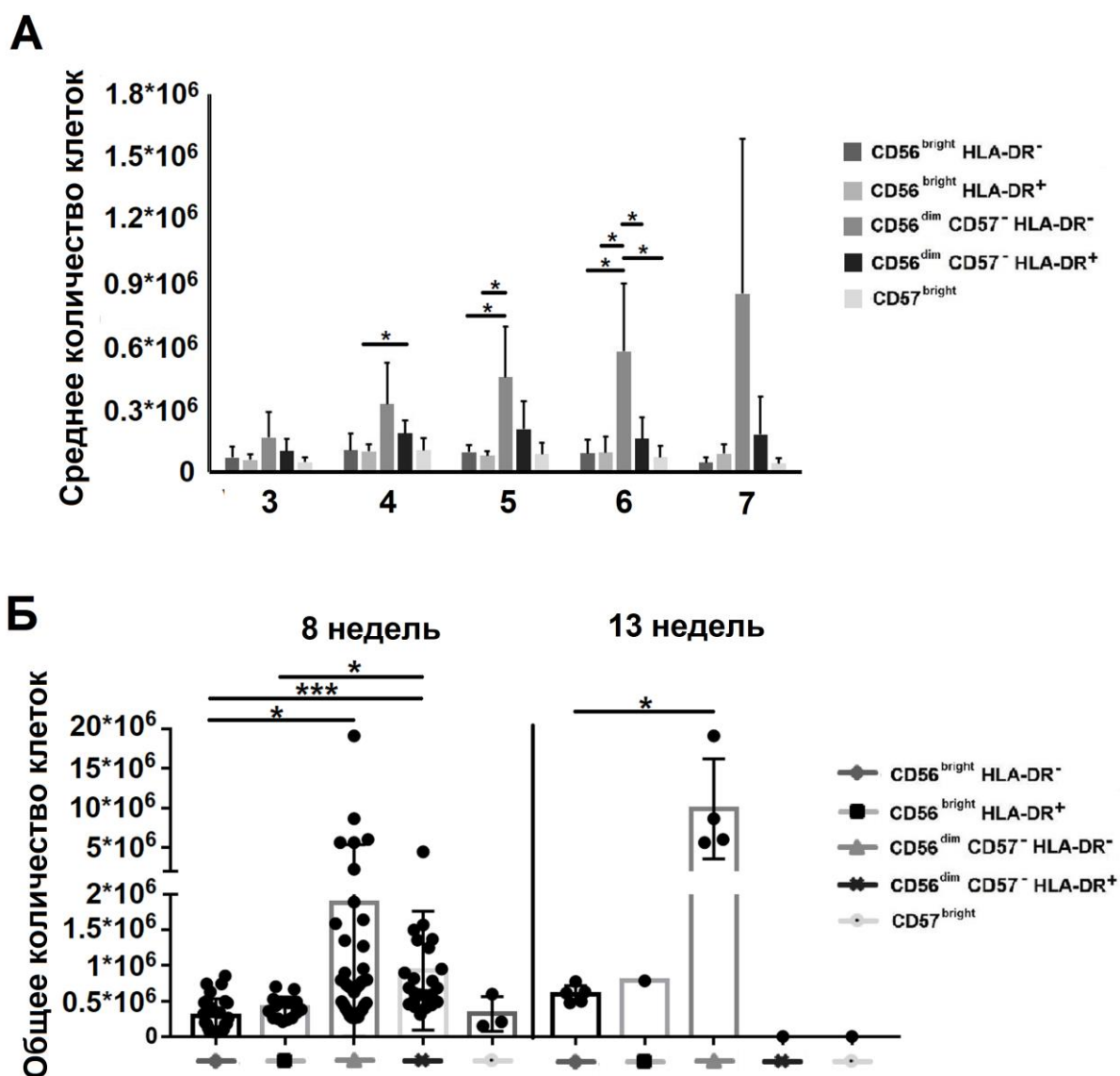


Рисунок 15. Количество клеток в клонах. А) Среднее количество клеток в клонах по четырем коллекциям. Б) Общее количество клеток в долгоживущих клонах, которое они образовали к 8 и 13 неделе культивирования.

В клонах, полученных из других субпопуляций, количество клеток не увеличивалось, уже начиная с 4-6 недель, в зависимости от клона, и далее, количество клеток в клонах значительно снижалось к 8 неделе (Рис. 16). В то же время многие клоны, полученные из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{-}HLA-DR^{-}$, постепенно погибали после 6 недель культивирования (Рис. 16). Нами не было выявлено прямой зависимости продолжительности жизни клональной клеточной культуры от общего количества клеток в клоне, что свидетельствует о том, что общее время жизни клонов зависит как от пролиферации, так и от длительности жизни клеток.

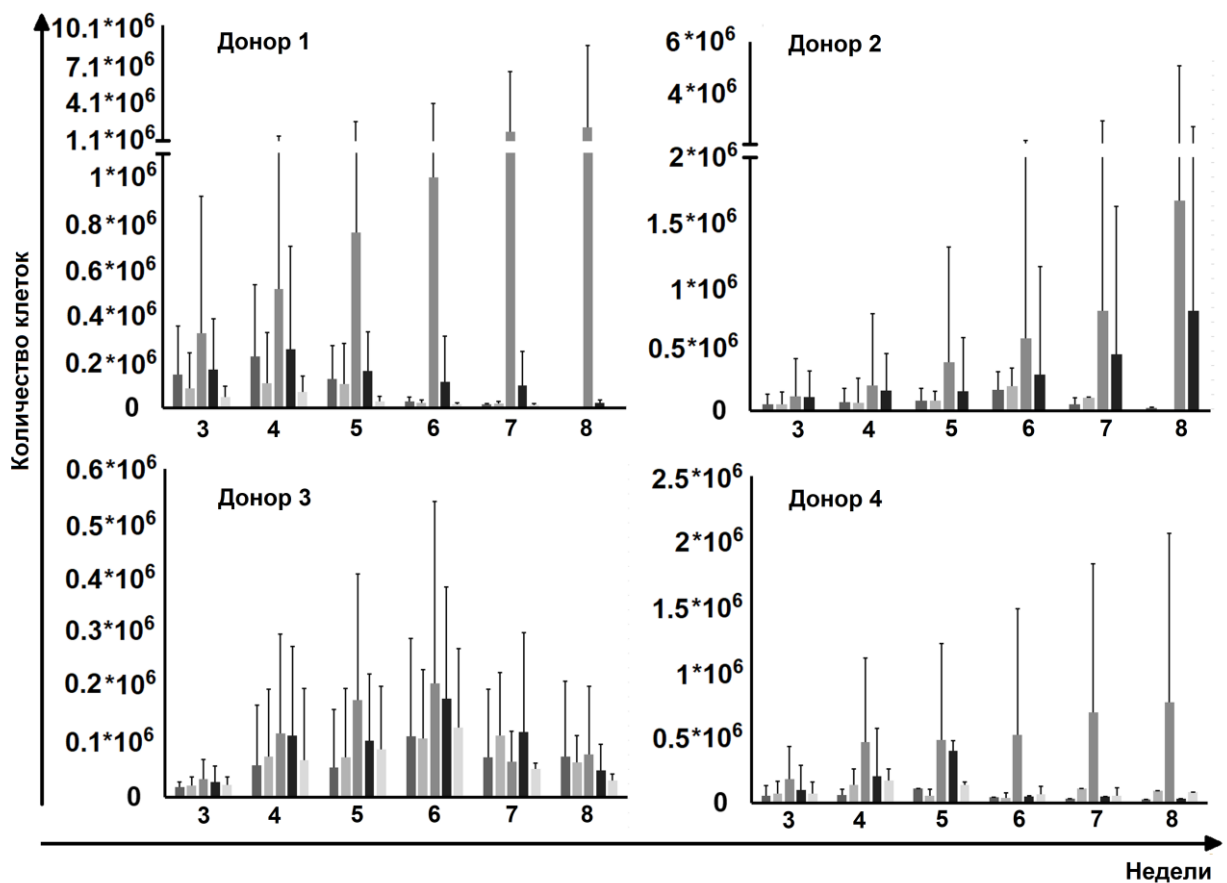


Рисунок 16. Количество клеток в клонах. А) Среднее количество клеток в клонах по четырем коллекциям. Б) Общее количество клеток в долгоживущих клонах, которое они образовали к 8 и 13 неделе культивирования. В) Динамика среднего количества клеток, измеренного через 3-8 недель в клонах, полученных из пяти субпопуляций. Представлены данные четырех коллекций (среднее ± SD).

3.3 Фенотипические особенности полученных клонов

3.3.1 Оценка стабильности экспрессии определенных при сортировке маркеров клонов НК-клеток

Был проведен анализ стабильности экспрессии маркеров на поверхности клонов, в соответствии с начальным фенотипом НК-клеток, из которых были получены данные клоны. Для изучения фенотипических особенностей НК-клеток при культивировании был проанализирован уровень поверхностной экспрессии маркеров, определяющих начальное разделение на субпопуляции по степени дифференцировки, степени активации и уровню экспрессии NKG2C. Для первого варианта разделения клеток была проведена оценка уровня поверхностной экспрессии маркеров CD56, CD57 и HLA-DR в 99 клонах (21 из CD56^{bright}HLA-DR⁻, 20 из CD56^{bright}HLA-DR⁺, 20 из CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻, 21 из CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁺ и 18 из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺) в пяти коллекциях клонов. Для второго варианта – был оценен поверхностный уровень маркеров CD56, CD57 и NKG2C в 112 клонах (22 из CD56^{bright}NKG2C⁻, 22 из CD56^{bright}NKG2C⁺, 17 из CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁻, 20 из CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺, 12 из CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻, 19 из CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺) в семи коллекциях клонов. В первую очередь была поставлена задача определить уровень дифференцированности клеток в каждом клоне в соответствии с уровнем поверхностной экспрессии CD56 и CD57.

3.3.1.1 Оценка изменения экспрессии CD56 на поверхности клонов НК-клеток

После культивирования в течение 5 недель уровень поверхностной экспрессии CD56 оставался выше в клонах, полученных из субпопуляций CD56^{bright}, чем в клонах, полученных из субпопуляции CD56^{dim}, отражая таким образом начальные различия в уровне экспрессии CD56 (Рис. 17А,Б). Между клонами из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57⁺ не было обнаружено существенной разницы в поверхностном уровне молекулы CD56 (Рис. 17А,Б). Как правило, при культивировании клонов, уровень экспрессии CD56 в индивидуальных клонах увеличивался через пять недель (Рис. 17В). Можно заключить, что для активированных НК-клеток использование поверхностного уровня CD56 в качестве маркера дифференцировки нецелесообразно. Наблюдалась тенденция к более высокому уровню экспрессии CD56 на поверхности клонов из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁻, по сравнению с клонами из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺ (Рис. 17Б).

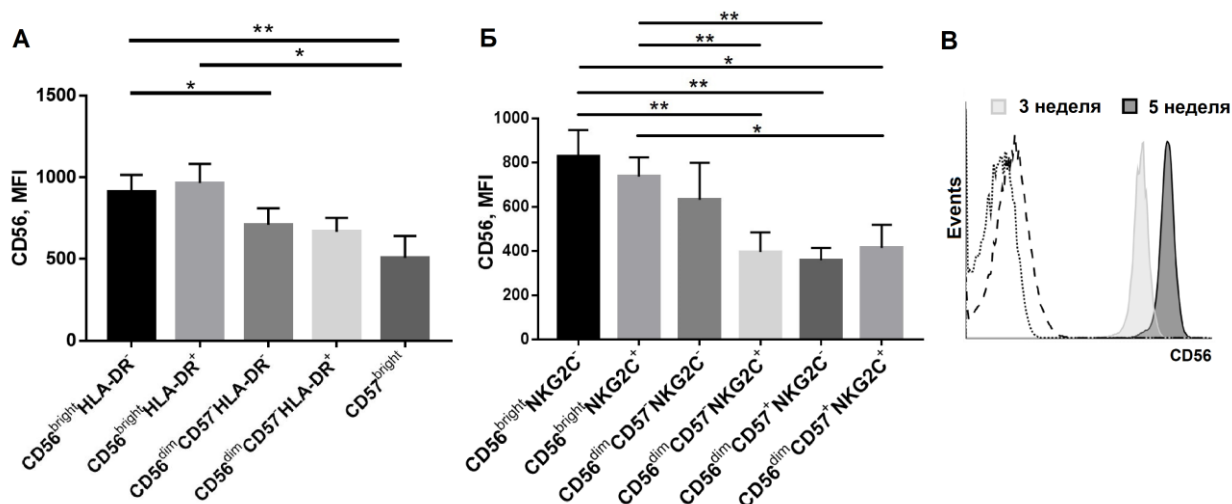


Рисунок 17. Поверхностная экспрессия CD56 в клонах НК-клеток. А) Уровень экспрессии CD56 в клонах НК-клеток, полученных из различающихся по степени дифференцированности и уровню экспрессии HLA-DR НК-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение MFI \pm SE, 43 клон). Б) Уровень экспрессии CD56 в клонах НК-клеток, полученных из различающихся по степени дифференцированности и уровню экспрессии NKG2C НК-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение MFI \pm SE, 112 клонов). В) Поверхностная экспрессия CD56 в клоне НК-клеток из подмножества CD56^{dim}HLA-DR⁻, измеренная через 3 и 5 недель культивирования. Точечная линия – аутофлуоресценция, пунктирная линия – изотипический контроль.

3.3.1.2 Анализ изменения уровня CD57 на поверхности клонов НК-клеток

Была изучена экспрессия молекулы CD57 на поверхности клеток клонов, полученных из различных субпопуляций (Рис. 18). Через 5 недель культивирования большинство клонов были частично позитивны по данному маркеру, включая клоны из субпопуляций НК-клеток CD56^{bright} и CD56^{dim}CD57⁻, а значит изначально CD57-негативные НК-клетки начинали экспрессировать молекулу CD57 на своей поверхности. Однако процентное содержание клеток CD57⁺ в этих клонах в среднем было значительно ниже, чем в клонах, полученных из НК-клеток CD57^{bright} (Рис. 18А,Б). Увеличение доли CD57-позитивных клеток в клоне подчинялось схеме CD56^{bright} < CD56^{dim}CD57⁻ < CD56^{dim}CD57^{bright}. Доля CD57-позитивных клеток в каждом клоне варьировала в широком диапазоне (от 0 до почти 100%) (Рис. 18В). Примерно в 30% проанализированных клонов из субпопуляции CD57^{bright} только половина клеток оставалась позитивна по CD57. Можно заключить, что часть клеток в клонах из субпопуляции CD57^{bright} теряет экспрессию CD57 в процессе культивации.

В процессе культивирования в определенный момент времени (индивидуально для клона) в большинстве клонов происходило увеличение уровня экспрессии CD57. В долгоживущих клонах доля CD57-позитивных клеток, измеренная через 5-6 недель, была

ниже по сравнению с короткоживущими клонами, однако обычно увеличивалась при дальнейшем культивировании (Рис. 18Г). В то же время, не было выявлено четкой связи между экспрессией CD57 и пролиферативной активностью клонов, поскольку в некоторых коллекциях наблюдались хорошо пролиферирующие клоны с высокой экспрессией CD57. Однако, продолжительность жизни данных клонов не превышала 7-8 недель.

При получении клонов из разделенных по уровню экспрессии NKG2C NK-клеток CD57^{bright} были получены статистически значимые различия уровня экспрессии CD57 на поверхности клонов (Рис. 18Б). Через пять недель культивирования, доля CD57-позитивных клеток в клонах, полученных из CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻ клеток, значительно снизилась, что соответствует менее дифференцированному состоянию. Возможно, большой процент CD57-позитивных клеток в клонах из неразделенной субпопуляции CD57^{bright} связан с активной пролиферацией клонов, полученных из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺, которые теряют экспрессию CD57 при пролиферации. В клонах из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ большинство клеток сохраняли экспрессию данной молекулы. Этот факт, в совокупности с высоким уровнем выживаемости CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ клонов, косвенно указывает на то, что клоны из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ могут обладать чертами адаптивности. Можно предположить, что уровень экспрессии CD57 каким-то образом связан с экспрессией NKG2C.

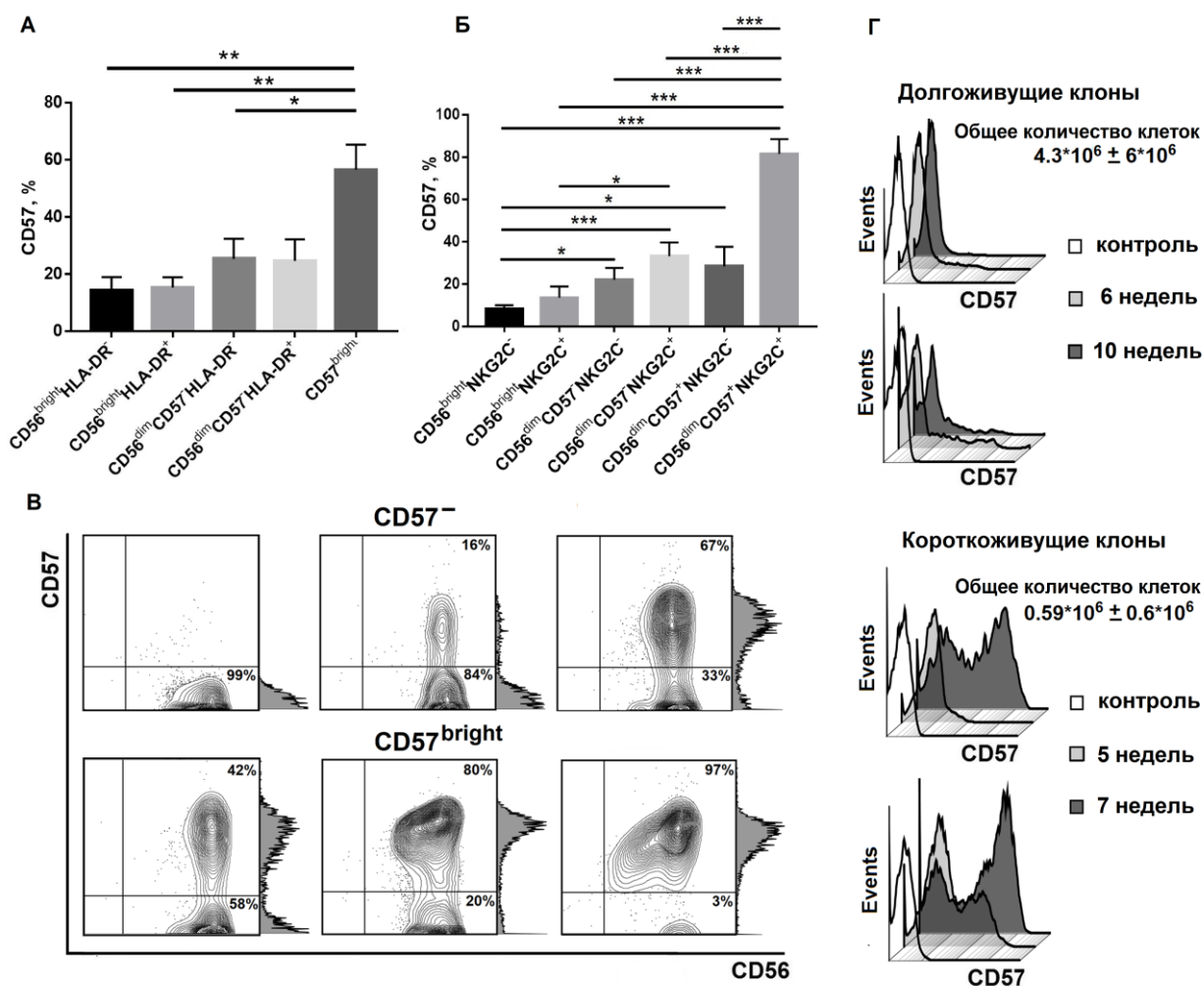


Рисунок 18. Поверхностная экспрессия CD57 в клонах NK-клеток. А) Уровень экспрессии CD57 в клонах NK-клеток, полученных из различных по степени дифференцировки и уровню экспрессии HLA-DR NK-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение \pm SE, 67 клонов). Б) Уровень экспрессии CD57 в клонах NK-клеток, полученных из различающихся по степени дифференцировки и уровня экспрессии NKG2C NK-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение \pm SE, 78 клонов). В) Доля клеток CD57⁺ в клонах, полученных из CD57-негативных и CD57-позитивных субпопуляций NK-клеток одного донора. Г) Динамика поверхностной экспрессии CD57 в короткоживущих (продолжительность жизни клонов 5-7 недель) и долгоживущих (продолжительность жизни клонов 8 недель и более) клонах. Показано по два репрезентативных клон для каждой группы. Представлены данные об общем количестве клеток в короткоживущих и долгоживущих клонах.

3.3.1.3 Оценка изменения экспрессии HLA-DR на поверхности клонов NK-клеток

- HLA-DR

Было показано, что только часть клеток клонов экспонировали на своей поверхности молекулу HLA-DR. Уровень экспрессии HLA-DR был выше в клонах, полученных из CD56^{dim}-клеток, по сравнению с клонами из клеток CD56^{bright}. Таким

образом, более дифференцированные клетки в ответ на этот тип стимуляции демонстрировали фенотип, соответствующий более активированному состоянию. Наиболее отчетливое различие уровней экспрессии HLA-DR наблюдалось между клонами, полученными из HLA-DR-негативных клеток из субпопуляций CD56^{dim} и CD56^{bright} (Рис. 19А). В первом варианте разделения различия в уровнях экспрессии HLA-DR между клонами, полученными из HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных НК-клеток одной стадии дифференцировки, оказались статистически неотличимыми (Рис. 19А). В процессе культивирования уровень экспрессии HLA-DR постепенно падал (Рис. 19В). Однако, исходя из рисунков 7А,Б и 8, можно заключить что экспрессия HLA-DR является реакцией клеток на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21. Интересно, что увеличение экспрессии HLA-DR было обнаружено в кломах из НК-клеток CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻, которые образовали долгоживущие клоны. Наиболее выраженное повышение уровня экспрессии HLA-DR (по сравнению с исходным процентом) наблюдалось в кломах, полученных из популяции CD57^{bright} -клеток.

При изучении уровня экспрессии HLA-DR на поверхности клонов, полученных по варианту 2, было показано, что клоны из субпопуляций CD56^{dim}NKG2C⁺ демонстрировали статистически более высокий уровень экспрессии HLA-DR, чем клоны из соответствующих негативных по NKG2C клеток (Рис. 19Б). Эта закономерность проявлялась в кломах из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57⁺. Таким образом, клоны полученные из субпопуляций CD56^{dim}NKG2C⁺ имеют более высокий активационный статус.

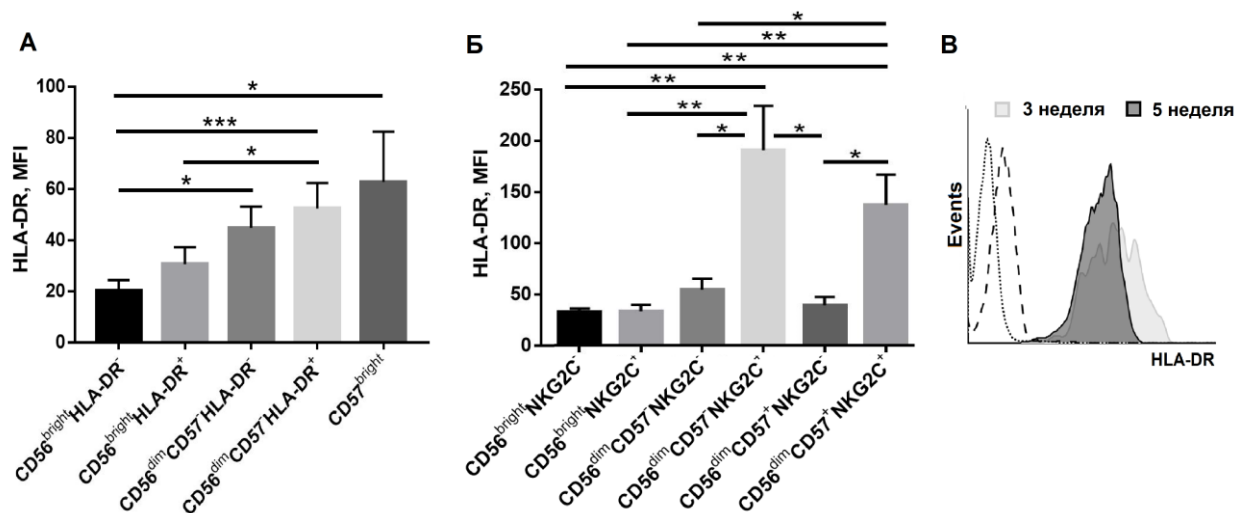


Рисунок 19. Поверхностная экспрессия HLA-DR в клонах NK-клеток. А) Уровень экспрессии HLA-DR в клонах NK-клеток, полученных из различающихся по степени дифференцированности и уровню экспрессии HLA-DR NK-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение MFI \pm SE, 55 клонов). Б) Уровень экспрессии HLA-DR в клонах NK-клеток, полученных из различающихся по степени дифференцированности и уровню экспрессии NKG2C NK-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение MFI \pm SE, 81 клон). В) Поверхностная экспрессия HLA-DR в клоне NK-клеток из CD56^{dim}HLA-DR⁺ субпопуляции, измеренная на 3 и 5 неделях культивирования. Точечная линия – аутофлуоресценция, пунктирная линия – изотипический контроль.

3.3.2 Изучение экспрессии маркеров, влияющих на функциональную активность клонов

- CD16

В ряде клонов была протестирована поверхностная экспрессия рецептора CD16 через 5 недель культивирования. Большинство клонов, включая первоначально CD16-негативные клоны, полученные из субпопуляции CD56^{bright}, экспрессировали на своей поверхности CD16. Однако уровень экспрессии CD16 у отдельных клонов сильно различался, что затрудняло выявление значительных различий между группами. Только часть клеток клона экспрессировали данный рецептор, а уровень экспрессии CD16 обычно уменьшался во время культивирования (Рис. 20В). Так как свежeweделенные NK-клетки с фенотипом CD56^{dim} обычно позитивны по данному маркеру, можно заключить, что экспрессия CD16 может исчезать в процессе культивирования с клеточной поверхности. Возможно, это связано с тем, что для индукции экспрессии рецептора CD16 требуются контактные взаимодействия с фидерными клетками. Это предположение косвенно подтверждается данными о том, что культивирование по модели 1 приводит к увеличению уровня экспрессии CD16 на поверхности клонов (Рис. 7А,Б).

Было показано, что уровень экспрессии CD16 в клонах из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{-}HLA-DR^{+}$ статистически выше, чем в клонах из соответствующих негативных по HLA-DR NK-клеток. Клоны из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$ обладали статистически более низким уровнем экспрессии CD16, чем клоны из $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{-}$. Можно предположить, что это связано с более интенсивной пролиферацией, в процессе которой клетки теряют экспрессию CD16.

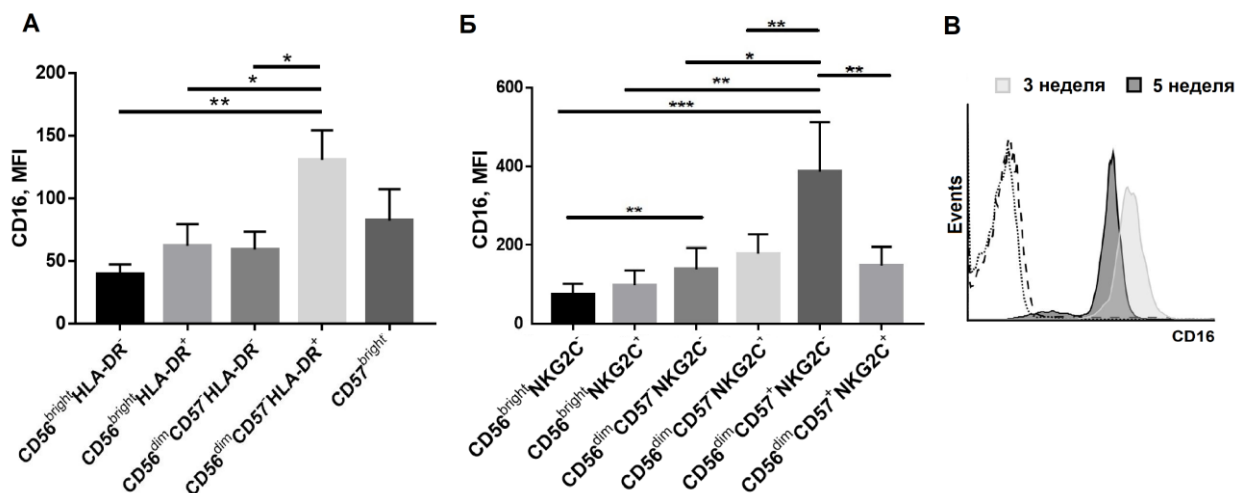


Рисунок 20. Поверхностная экспрессия CD16 в клонах NK-клеток. А) Уровень экспрессии CD16 в клонах, полученных из отличных по уровню HLA-DR и степени дифференцированности субпопуляций NK-клеток, проанализированных на 5-й неделе культивирования. Представлено среднее значение $MFI \pm SE$, 56 клонов. В) Уровень экспрессии CD16 в клонах NK-клеток, полученных из различающиеся по степени дифференцированности и уровня экспрессии NKG2C NK-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение $MFI \pm SE$, 81 клон). В) Поверхностная экспрессия CD16 в клоне из субпопуляции $CD56^{dim}HLA-DR^{-}$, измеренная через 3 и 5 недель. Точечная линия обозначает аутофлуоресценцию, пунктирная линия является изотипическим контролем.

- Рецепторы KIR

Для определения экспрессии KIR было выбрано антитело, специфичное для аллельных форм KIR2DL2 и KIR2DL3, которые широко распространены в популяции человека (Leung et al., 2005). Была проанализирована экспрессия рецепторов KIR в клонах NK-клеток и свежесыведенных NK-клетках (Рис. 21). Четыре донора, NK-клетки которых были использованы в клонировании по HLA-DR, были гетерозиготными по HLA-C; каждый из них обладал одним C1-аллелем, распознаваемым указанными рецепторами.

Полученные клоны были либо полностью KIR2DL2/DL3-позитивными, либо KIR2DL2/DL3-негативными. При этом, поверхностная экспрессия KIR2DL2/DL3 не исчезала во время культивирования в позитивных по этому маркеру при первом тестировании клонов. Не было также зарегистрировано появления рецепторов KIR на

клеточной поверхности в отрицательных клонах. В KIR-позитивных клонах уровень экспрессии KIR2DL2/DL3 обычно увеличивался в процессе культивирования (Рис. 21С).

Распределение экспрессирующих KIR2DL2/DL3 клонов среди субпопуляций NK-клеток, которые были исследованы, в основном отражает процент KIR2DL2/DL3⁺ NK-клеток *ex vivo*. Доля KIR-позитивных клонов среди клонов, полученных из клеток CD57⁻, была ниже, чем в клонах, полученных из клеток CD57⁺. Наибольшая доля KIR2DL2/DL3⁺ клонов была обнаружена в коллекциях клонов, полученных из субпопуляции CD57^{bright}. Однако, не было обнаружено существенных различий в экспансии и продолжительности жизни между KIR2DL2/DL3⁺ и KIR2DL2/DL3⁻ клонами, полученных из CD57^{bright} клеток. Таким образом, четкой связи между экспрессией KIR2DL2/DL3 и CD57 обнаружить не удалось.

При получении клонов из разделенной по NKG2C субпопуляции CD57^{bright} наблюдалась тенденция к большей доле KIR2DL2/DL3⁺-клонов из субпопуляций NKG2C⁺. Также была зарегистрирована неожиданно высокая доля KIR2DL2/DL3⁺ клонов из субпопуляции CD56^{bright}HLA-DR⁻, по сравнению с CD56^{bright}HLA-DR⁺, и повышение доли KIR2DL2/DL3⁺-клонов из субпопуляций CD56^{bright}NKG2C⁻, по сравнению с клонами из CD56^{bright}NKG2C⁺. Эти два наблюдения, возможно, связаны с тем, что неактивированные HLA-DR/NKG2C-негативные NK-клетки KIR2DL2/DL3⁺ субпопуляции CD56^{bright} обладают лучшим пролиферативным ответом на стимуляцию IL-2/К562-mbIL21.

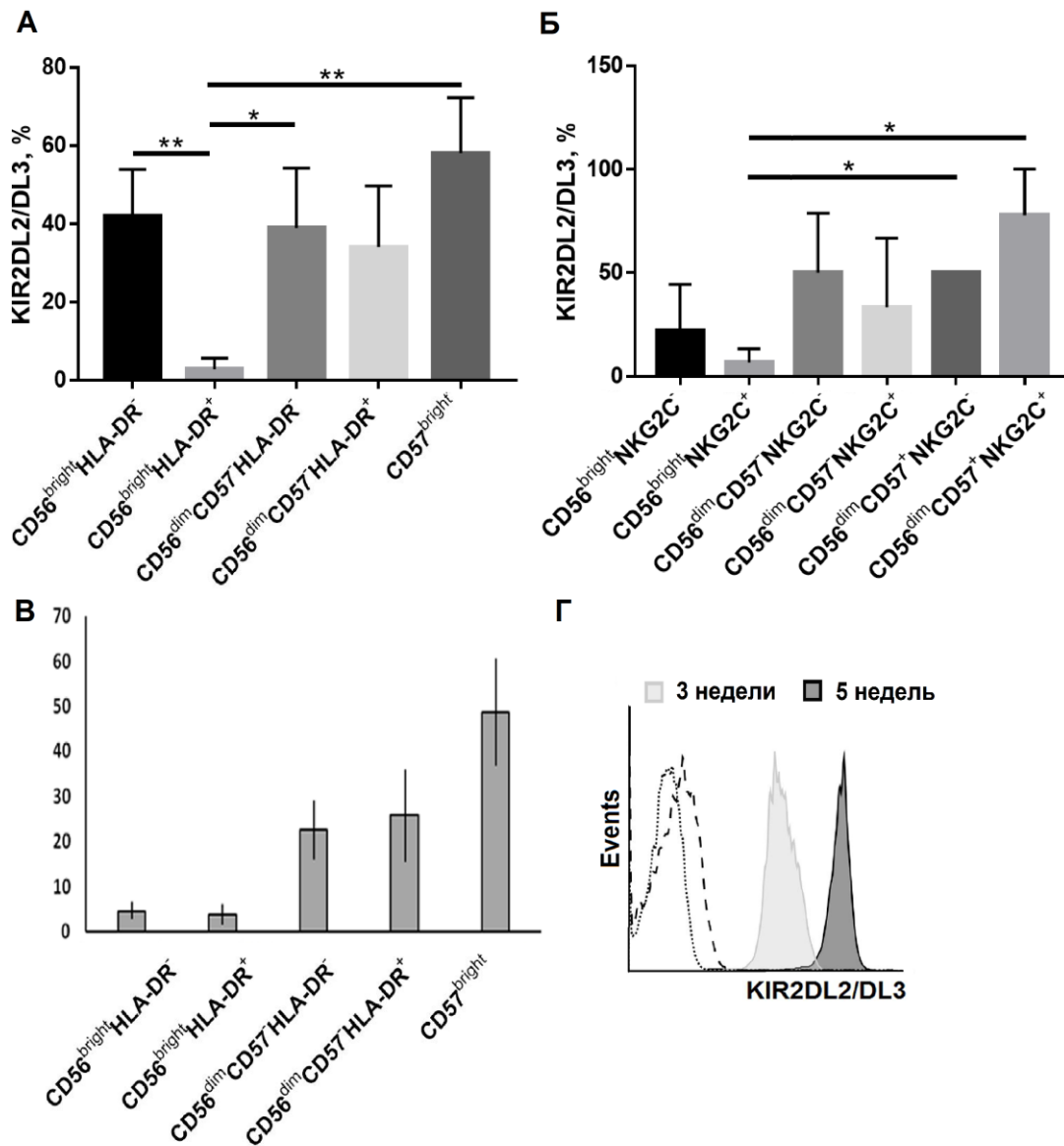


Рисунок 21. Экспрессия KIR2DL2/DL3 в клонах НК-клеток. А) Анализ экспрессии KIR2DL2/DL3 в клонах, полученных по первому варианту разделения, проанализированных на 5 неделе культивирования. В каждой субпопуляции представлена доля KIR2DL2/DL3-позитивных клонов (среднее \pm SE из 5 независимых коллекций). В общей сложности экспрессия KIR2DL2/DL3 анализировалась в 139 клонов (32 из CD56^{bright}HLA-DR⁻, 33 из CD56^{bright}HLA-DR⁺, 24 из CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻, 25 из CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁺ и 25 из CD56^{dim}CD57^{bright} cells). Б) Анализ экспрессии KIR2DL2/DL3 в клонах (52 клон), полученных по второму варианту разделения, проанализированных на 5 неделе культивирования. В каждой субпопуляции представлена доля KIR-позитивных клонов (среднее \pm SE из 4 независимых коллекций). В) Процентное соотношение KIR2DL2/DL3 в НК-клетках ex vivo (среднее \pm SD) из 9 независимых экспериментов. Г) Динамика поверхностной экспрессии KIR2DL2/DL3 в отдельном клоне НК-клеток. Точечная линия обозначает аутофлуоресценцию, пунктирная линия – изотипический контроль.

3.3.3 Оценка стабильности уровня экспрессии NKG2A

Почти все CD56^{bright}-NK-клетки, выделенные из периферической крови, несут на своей поверхности лектиноподобный ингибирующий рецептор NKG2A, который характерен для слабодифференцированных NK-клеток (Poli et al., 2009). В свою очередь, только 50% (приблизительно) высокодифференцированных NK-клеток CD56^{dim} экспрессируют NKG2A на своей поверхности (Рис. 22А). Анализ уровня экспрессии NKG2A на клетках клонов показал, что 98% клонов из всех субпопуляций NK-клеток, проанализированных в разные временные промежутки культивирования, позитивны по NKG2A (Рис. 22В). Было сделано предположение, что NKG2A-негативные NK-клетки приобретают экспрессию NKG2A на клональном уровне. Для проверки этой гипотезы было произведено клонирование NK-клеток CD56^{dim}NKG2A⁻. Анализ фенотипа полученных клонов проводился через пять недель. Было обнаружено, что 38% клонов из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻NKG2A⁻ и 16% клонов из субпопуляции CD56^{dim}CD57^{bright}NKG2A⁻ начали экспрессировать рецептор NKG2A на своей поверхности (Рис. 22Г). Этот результат указывает на способность высокодифференцированных NK-клеток экспрессировать NKG2A *de novo* в условиях стимуляции IL-2 и K562-mbIL21. Эта гипотеза дополнительно подтверждается, наличием частично позитивных по NKG2A клонов. Тем не менее, часть клонов оставалась негативной по NKG2A. Этот факт указывает на то, что экспрессия рецептора NKG2A на NK-клетках не имеет строгой корреляции с образованием клонов. Таким образом высокодифференцированные NK-клетки NKG2A⁻ могут приобретать фенотип менее дифференцированных клеток NKG2A⁺.

Были получены клоны из NK-клеток, негативных по NKG2A и различающихся степенью дифференцировки и уровнем экспрессии NKG2C. Проведено сравнение уровня экспрессии NKG2A на поверхности позитивных по данному маркеру клеток клонов. Показано, что клоны, полученные из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ обладали статистически более низким уровнем экспрессии рецептора NKG2A, по сравнению с соответствующими клонами из NKG2C-негативных клеток (Рис. 22Д). Так как по литературным данным в адаптивных NK-клетках наблюдается снижение уровня экспрессии NKG2A, можно предположить, что клоны, полученные из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ представляют собой подвид адаптивных NK-клеток.

Далее, на основании наличия поверхностной экспрессии NKG2C и CD57 и отсутствия экспрессии NKG2A, был проведен выбор 12 клонов, потенциально обладающих свойствами адаптивных NK-клеток. У большинства этих клонов оказалась снижена либо отсутствовала поверхностная экспрессия рецепторов NKp30 и NKp46 и внутриклеточной адапторной цепи FcεRIγ, что характерно для NK-клеток с адаптивными

свойствами. Таким образом, можно заключить, что в условиях стимуляции K562mbIL-21/IL-2 могут образовываться клоны с чертами адаптивных НК-клеток.

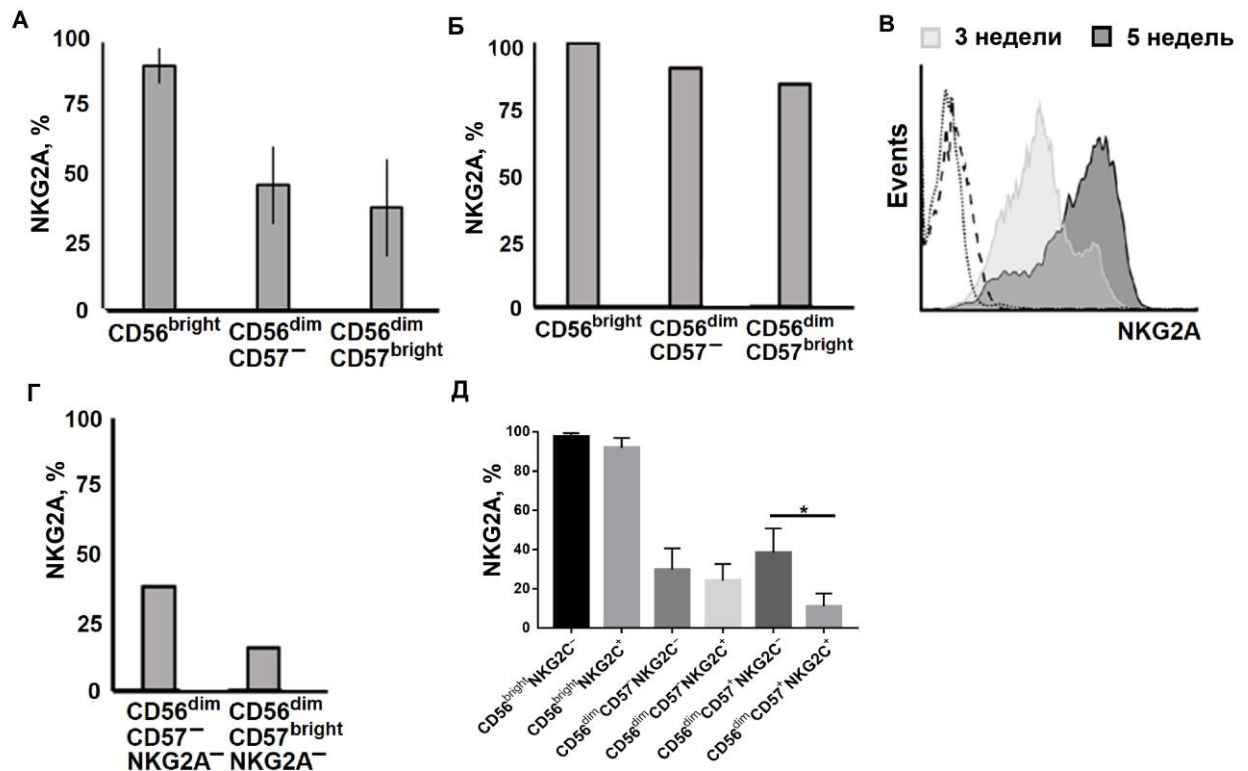


Рисунок 22. Поверхностная экспрессия NKG2A в клонах НК-клеток. А) Доля NKG2A-положительных клеток в свежевыделенных CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57^{bright} субпопуляциях НК-клеток. Среднее \pm SD из 8 независимых экспериментов. Б) Динамика поверхностной экспрессии NKG2A в клоне из CD56^{bright}HLA-DR⁺ субпопуляции. Точечная линия обозначает аутофлуоресценцию, пунктирная линия – изотипический контроль. В) Анализ экспрессии NKG2A в клонах, полученных из разных субпопуляций, проанализированных через 5 недель культивирования. В каждой субпопуляции представлена доля NKG2A-положительных клонов (среднее \pm SE из n клонов, полученных в 4-х наборах клонов: n=30 из CD56^{bright}, n=31 из CD56^{dim}CD57⁻, n=19 из CD56^{dim}CD57^{bright}). Г) Анализ экспрессии NKG2A в клонах, полученных из CD56^{dim}CD57⁻/^{bright}NKG2A⁻ клеток, проведенный после 5 недель культивирования клонов. Представлен процент NKG2A-положительных клонов (среднее \pm SE из n независимых экспериментов: n=21 из CD56^{dim}CD57⁻NKG2A⁻, n=19 из CD56^{dim}CD57^{bright}NKG2A⁻). Д) Доля NKG2A-положительных клонов, полученных из различающихся по степени дифференцированности и уровня экспрессии NKG2C НК-клеток. Анализ проводили через 5 недель после начала культивирования (среднее значение \pm SE, 78 клонов).

3.4 Функциональная активность полученных клонов НК-клеток

3.4.1 Исследование функциональной активности клонов, полученных из различных субпопуляций

Была проведена серия экспериментов по анализу функциональной активности клонов. Выше было показано, что клоны, выращенные по модели 2, не продуцируют IFN- γ без дополнительной стимуляции (Рис. 7B). В нашей лаборатории был отработан метод детекции IFN- γ в популяциях НК-клеток, которые были предварительно стимулированы IL-12+IL-15 (Erokhina et al., 2018). Данный способ стимуляции был применен и к клонам. Было показано, что все анализируемые клоны продуцировали IFN- γ в ответ на стимуляцию IL-12+IL-15. Интересно, что было обнаружено значительное различие в уровне продукции IFN- γ между клонами, полученными из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻ и CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁺. Более высокий уровень был зарегистрирован в HLA-DR-негативной субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻ (Рис. 23A). При анализе продукции IFN- γ в клонах, полученных по варианту 2 не было выявлено достоверных отличий между клонами из NKG2C-позитивных и негативных субпопуляций. Тем не менее, прослеживалась тенденция к повышенному уровню продукции IFN- γ в клонах из субпопуляций CD56^{dim}NKG2C⁺, по сравнению с клонами из субпопуляций CD56^{dim}NKG2C⁻. Также было показано, что клоны из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ обладали статистически более высоким уровнем внутриклеточного гранзима В.

В нескольких хорошо растущих клонах был измерен уровень натуральной цитотоксичности против клеток K562. Все тестируемые клоны оказались цитотоксически активны (Рис. 23B). Из-за большой вариабельности между клонами и коллекциями, уровень натуральной цитотоксичности достоверно не различался между клонами из субпопуляций NKG2C⁺ и NKG2C⁻, однако, имелась тенденция более высокой цитолитической активности НК-клеток в клонах из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺, по сравнению с клонами из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻. Таким образом, можно заключить, что все исследованные клоны, полученные с помощью стимуляции IL-2/K562-mbIL21, являются функционально активными.

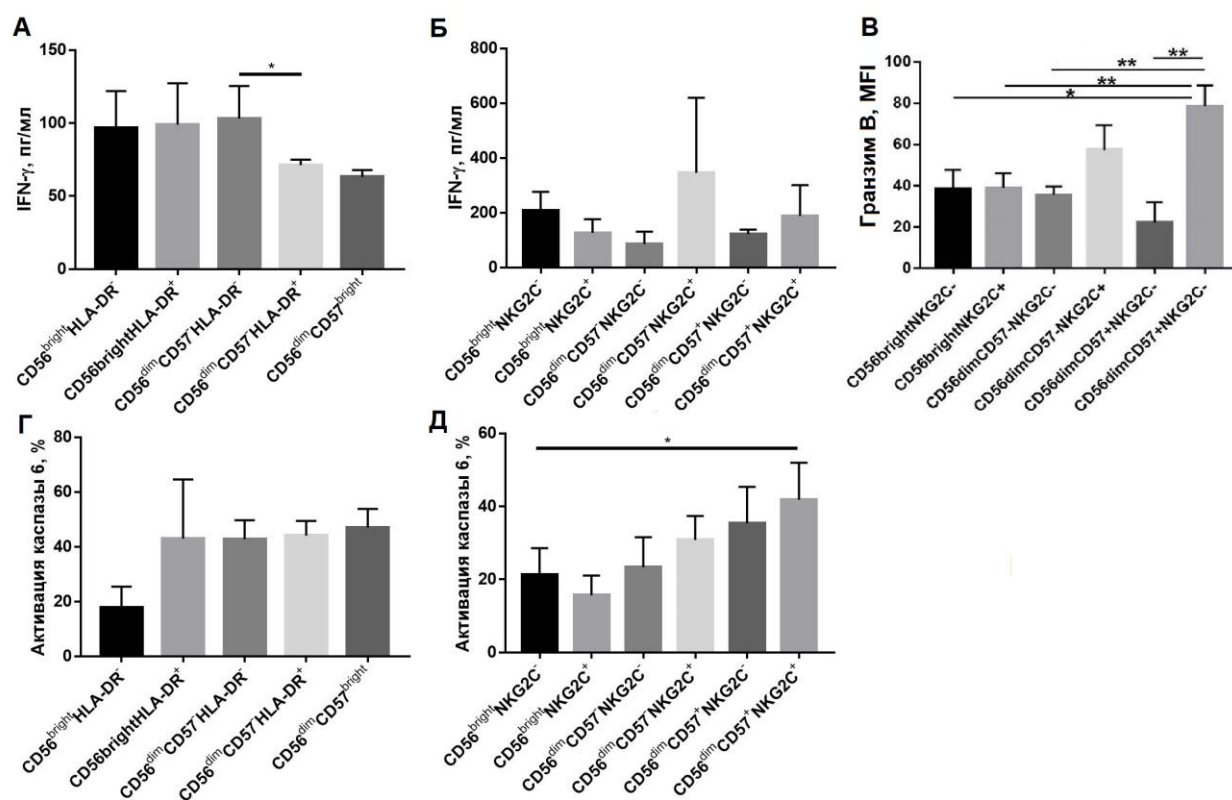


Рисунок 23. Функциональная активность клонов НК-клеток. А,Б) Уровень продукции IFN- γ в супернатантах клонов различных субпопуляций. В) Уровень внутриклеточной экспрессии гранзима В в клетках клонов. Г,Д) Уровень натуральной цитотоксической активности клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток, измеренный по уровню активации каспазы 6 в клетках-мишенях K562.

3.4.2 Исследование функциональной активности долгоживущих клонов

Было отмечено, что высокая скорость пролиферации клона положительно влияет на его цитотоксичность. Поэтому было проведено исследование функциональной активности клонов, срок жизни которых достиг 13 и более недель. Поскольку среди клонов, культивируемых по модели 1, не было получено долгоживущих клонов, измерения проводились только на клонах, полученных с помощью модели 2. Натуральную цитотоксичность НК-клеток измеряли либо по уровню экспрессии молекулы LAMP-1, маркера дегрануляции, на поверхности клеток-эффекторов, либо по уровню активированной каспазы 6 в клетках-мишенях K562, определяемого по свечению флуоресцентномеченого субстрата.

Как видно из рисунка 24, даже после 14 недель культивирования клоны сохраняли способность дегранулировать в ответ на добавление клеток-мишеней (Рис. 24А) и показали значительный цитотоксический потенциал против стандартных клеток-мишеней K562 (Рис. 24Б).

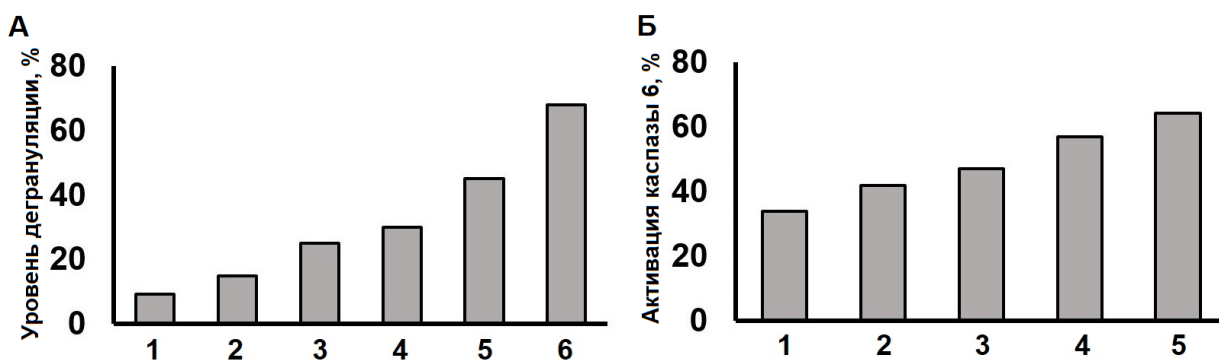


Рисунок 24. Анализ фенотипа и функциональной активности долгоживущих клонов НК-клеток. А) Дегрануляция клонов, измеренная по уровню экспрессии LAMP-1 на клеточной поверхности после инкубации в присутствии клеток-мишеней K562 на 14 неделе культивирования. Б) Эффективность натуральной цитотоксической активности клонов, измеренная по уровню активации каспазы-6 в клетках-мишенях K562 на 14 неделе культивирования.

3.4.3 Изучение функциональной активности клонов после заморозки/разморозки

По литературным данным, НК-клетки чувствительны к процессу замораживания и оттаивания, что приводит к потере их функциональной активности. Поэтому была проведена серия экспериментов по изучению влияния заморозки клонов НК-клеток на их фенотип и функциональную активность. Для этого были отобраны хорошо пролиферирующие клоны (10 штук), которые культивировались по модели 2. Сначала проводили подбор оптимальной концентрации замороженных клеток. Клоны замораживались в концентрациях от 5×10^5 до 3×10^6 клеток/мл, и, затем, размораживались, спустя длительное время (10-12 месяцев). Было обнаружено, что замораживание клонов в концентрации менее $1,5 \times 10^6$ клеток/мл приводило к нестабильному выходу из замороженного состояния, что отрицательно сказывалось на времени жизни клона после разморозки. Клоны, замороженные в концентрации $2-3 \times 10^6$ клеток/мл демонстрировали хороший пролиферативный потенциал после разморозки. Далее были проведены исследования по заморозке клонов с различным пролиферативным потенциалом, который оценивали по индексу недельного прироста клеток (N). Индекс рассчитывали по формуле $N=N_2/N_1$, где N_1 является начальным числом клеток на мл среды, а N_2 - количество клеток в мл среды после 1 недели инкубации. Лучшую выживаемость после размораживания показали клоны с $N=2$ или выше. После размораживания, время жизни таких клонов составляло не менее 3 недель. В результате было показано, что при замораживании $2-3 \times 10^6$ клеток клона с $N \geq 2$, они легко переносят заморозку и сохраняют свой пролиферативный потенциал после разморозки.

Размороженные клетки культивировали в течение недели в полной среде с ИЛ-2 (100 ед/мл) и, затем проводили измерение фенотипических особенностей клонов (Рис. 25А). Все клоны были охарактеризованы как $CD56^+CD57^-NKG2A^+$, что указывает на то, что эти клоны имеют фенотип слабодифференцированных НК-клеток. Кроме того, размороженные клоны демонстрировали высокий уровень как натуральной (Рис. 25В), так и антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (Рис. 25Г).

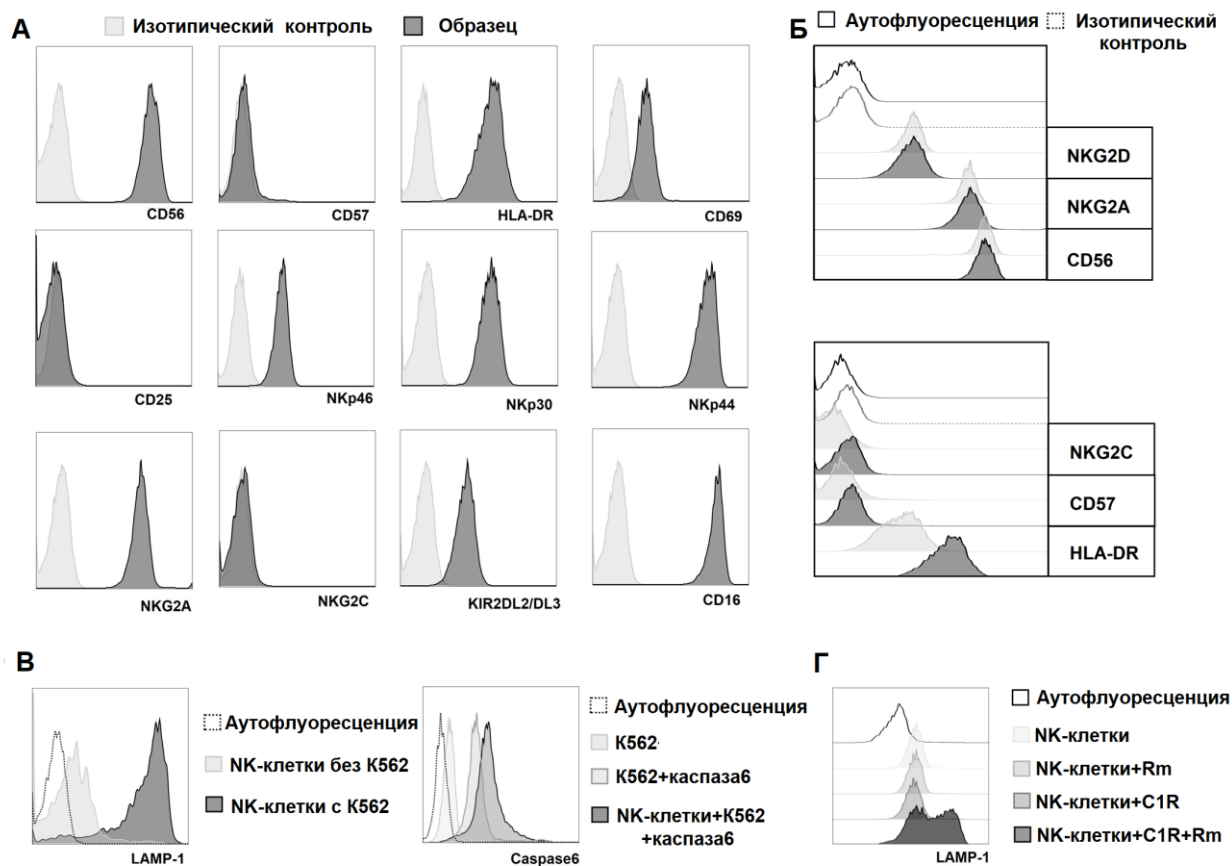


Рисунок 25. Анализ фенотипических и функциональных характеристик размороженных клонов, полученных с использованием Модели 2. На рисунке показаны данные одного репрезентативного клона. А) Анализ поверхностных маркеров размороженных клонов, измеренных с помощью проточной цитометрии. Б) Сравнение поверхностной экспрессии маркеров до заморозки (светло-серый) и после разморозки (темно-серый). В) Анализ уровня натуральной цитотоксической активности в клонах путем оценки экспрессии молекулы LAMP-1 (слева) и уровня активированной каспазы 6 в клетках-мишенях K562 (справа). Г) Анализ антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. В качестве мишеней использовали линию В-клеточной лимфомы CIR и Rm - гуманизированное антитело Ритуксимаба против молекулы CD20.

3.5 Увеличение продолжительности жизни НК-клеток с использованием генетических манипуляций

НК-клетки обладают ограниченным пролиферативным потенциалом в том числе из-за малой длины теломер (Ouyang et al., 2007; Romagnani et al., 2007). По литературным данным в условиях стимуляции комбинацией IL-2/K562-mbIL21 длина теломер в НК-клетках значительно увеличивается по сравнению со свежими НК-клетками (Denman et al., 2012). Положительная тенденция к увеличению длины теломер, вероятно, обусловлена активацией IL-21 транскрипционного фактора STAT3 (Spolski and Leonard, 2008), который, в свою очередь, регулирует экспрессию каталитической субъединицы обратной транскриптазы теломеразы (hTERT) (Konnikova et al., 2005). Поэтому было сделано предположение о том, что внедрение в геном НК-клеток каталитической субъединицы теломеразы может увеличить получаемое количество НК-клеток при культивировании. Был выбран способ доставки гена с помощью ретровирусной трансдукции, которая эффективная в отношении цитотоксических Т-клеток (Barsov, 2011).

3.5.1 Разработка метода трансдукции НК-клеток

3.5.1.1 Отработка методики трансдукции на Т-клеточной линии Jurkat

Первоначально ретровирусная векторная система была проверена с использованием линии Т-клеточной лимфомы Jurkat. Эта линия была выбрана потому, что по литературным данным она хорошо подвергается трансдукции (Barsov, 2011). GFP- и NGFR-экспрессирующие частицы были собраны в модифицированных клетках HEK293T – GP2-293. В качестве белка оболочки ретровирусной частицы был выбран белок RD114, который имеет тропизм к клеткам гематопоэтического происхождения. Оптимальный титр ретровирусных частиц, опосредующих эффективную трансдукцию, определяли с использованием клеток Jurkat. Уровень трансдукции клеток Jurkat варьировал между 45-70% для GFP-содержащего вектора. Эффективность трансдукции NGFR-содержащего вектора была еще выше, достигая 80-90% (Рис. 26). Небольшое различие в эффективности этих векторов может быть объяснено частичной гибелью клеток с высоким уровнем экспрессии белка GFP из-за его небольшой токсичности, описанной ранее (Liu et al., 1999). Несмотря на токсичность белка, после трансдукции не было обнаружено значительной элиминации GFP-трансдуцированных клеток. Поскольку, как известно, на упаковку и последующую трансдукцию ретровирусных векторов влияет природа вставленной последовательности ДНК, разница в титрах вирусных частиц с GFP и NGFR может объяснить некоторые различия в эффективности заражения клеток. Таким образом,

данные векторные системы были способны эффективно доставлять гены в контрольные клетки Jurkat.

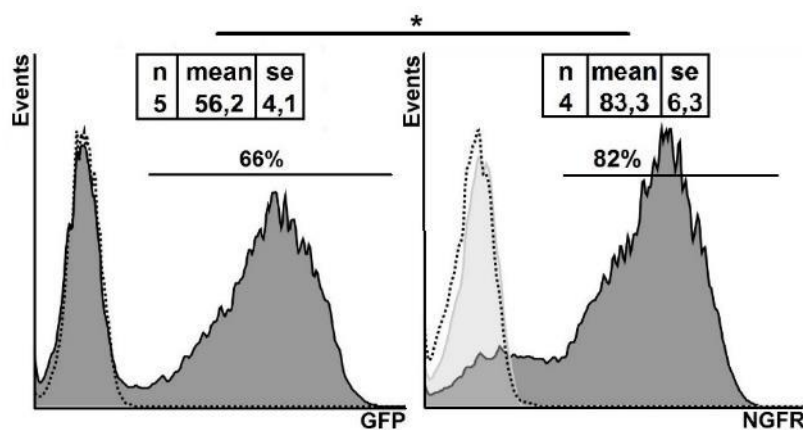


Рисунок 26. Трансдукция Т-клеток Jurkat (3 дня инкубации) с использованием векторов xlox-GFP (слева) или xlox-NGFR (справа), измеренных по уровню свечения репортерного белка методом проточной цитометрии. Показаны репрезентативные результаты. Аутофлуоресценция показана пунктиром. Изотипический контроль для CD271-PE показан светло-серым. n - количество независимых экспериментов, mean - средний процент позитивных клеток, se - стандартная ошибка.

3.5.1.2 Оценка эффективности трансдукции НК-клеток человека

После тестирования ретровирусной векторной системы, она была использована для трансдукции свежевыделенных НК-клеток человека. По литературным данным ретровирусные частицы не способны трансдуцировать первичные человеческие Т-клетки, которые требуют активации с помощью цитокинов и/или через рецептор CD3 для эффективной трансдукции (Bilal et al., 2015). В соответствии с этим наблюдением мы не смогли трансдуцировать первичные НК-клетки с измеримой эффективностью. Поэтому было решено стимулировать деление НК-клеток перед трансдукцией. Ранее было показано, что стимуляция НК-клеток с помощью IL-2 (500 ед/мл) повышает эффективность трансдукции (Alicci et al., 2009). Активированные НК-клетки были успешно трансдуцированы, однако эффективность заражения оказалась невелика (Рис. 27А).

Было сделано предположение, что эффективность трансдукции можно повысить за счет выключения противовирусной защиты клетки. Вещество VX795 – это ингибитор каталитической активности ТВК1/ИККε киназ, которые участвуют в запуске противовирусного ответа врожденного иммунитета. Ранее было показано, что применение VX795 может повысить эффективность трансдукции (Sutlu et al., 2012). Однако, нам не удалось добиться увеличения доли трансдуцированных НК-клеток при применении данного ингибитора.

3.5.2 Изучение эффективности трансдукции различных субпопуляций НК-клеток

Выше было показано на клональном уровне, что отдельные субпопуляции НК-клеток могут обладать повышенной пролиферативной активностью. На основе этих данных была проведена серия экспериментов по трансдукции субпопуляций НК-клеток. Была изучена восприимчивость к ретровирусной трансдукции высокодифференцированных $CD57^+$ НК-клеток, менее дифференцированных НК-клеток $CD57^-$ и слабодифференцированных $CD56^{\text{bright}}$, а также НК-клеток, различающихся по уровню экспрессии NKG2C.

Нативные НК-клетки были разделены по уровню свечения $CD56$ с помощью клеточной сортировки. Субпопуляции $CD56^{\text{bright}}$ и $CD56^{\text{dim}}$ культивировались в течении недели в среде с IL-2. В отличие от НК-клеток $CD56^{\text{dim}}$, НК-клетки с фенотипом $CD56^{\text{bright}}$ успешно подвергались трансдукции (Рис. 27Б).

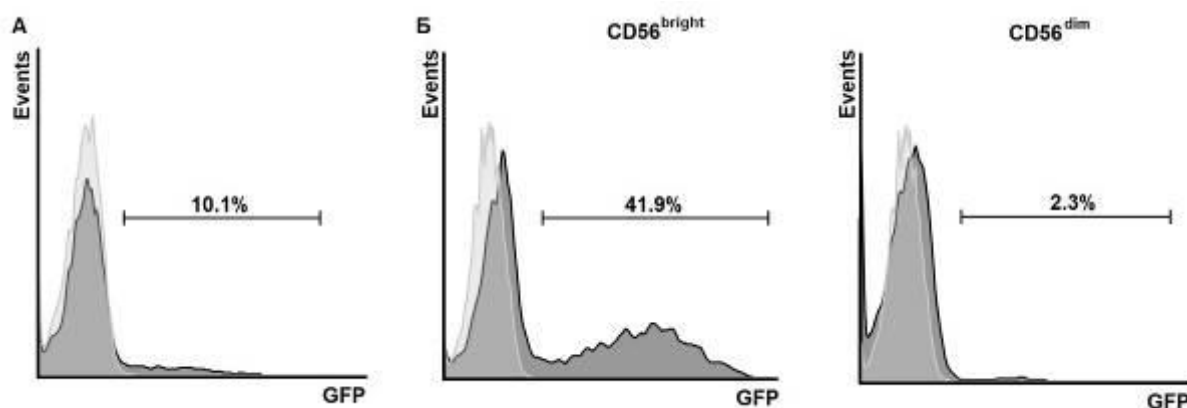


Рисунок 27. Уровень трансдукции стимулированных IL-2 НК-клеток. А) Уровень трансдукции общей популяции НК-клеток, стимулированных IL-2 в течении 7 дней. Б) Уровень трансдукции $CD56^{\text{bright}}$ НК-клеток (слева) и $CD56^{\text{dim}}$ НК-клеток (справа), отсортированных после 7 дней стимуляции IL-2.

В серии экспериментов НК-клетки были разделены на субпопуляции $CD57^-$ и $CD57^+$. В отличие от неактивированных контрольных клеток, $CD57^-$ НК-клетки, выделенные из стимулированных НК-клеток, были эффективно трансдуцированы ретровирусными частицами, тогда как субпопуляция $CD57^+$ не была трансдуцирована с измеримой эффективностью (Рис. 28Г). Это может быть связано с низкой пролиферативной активностью $CD57^+$ -НК-клеток. Была оценена пролиферативная активность и изучен клеточный цикл отличных по экспрессии $CD57$ НК-клеток. Показано, что уменьшение доли $CD57^+$ клеток связано с низкой пролиферативной активностью этих клеток во время культивирования (Рис. 28А,Б,В). НК-клетки $CD57^-$ в основном находились в S фазе клеточного цикла, тогда как большая часть НК-клеток с фенотипом

CD57⁺ оказалась в покое стадии G0 (Рис. 28В). Таким образом можно заключить, что пролиферативная активность клеток влияет на ретровирусную трансдукцию.

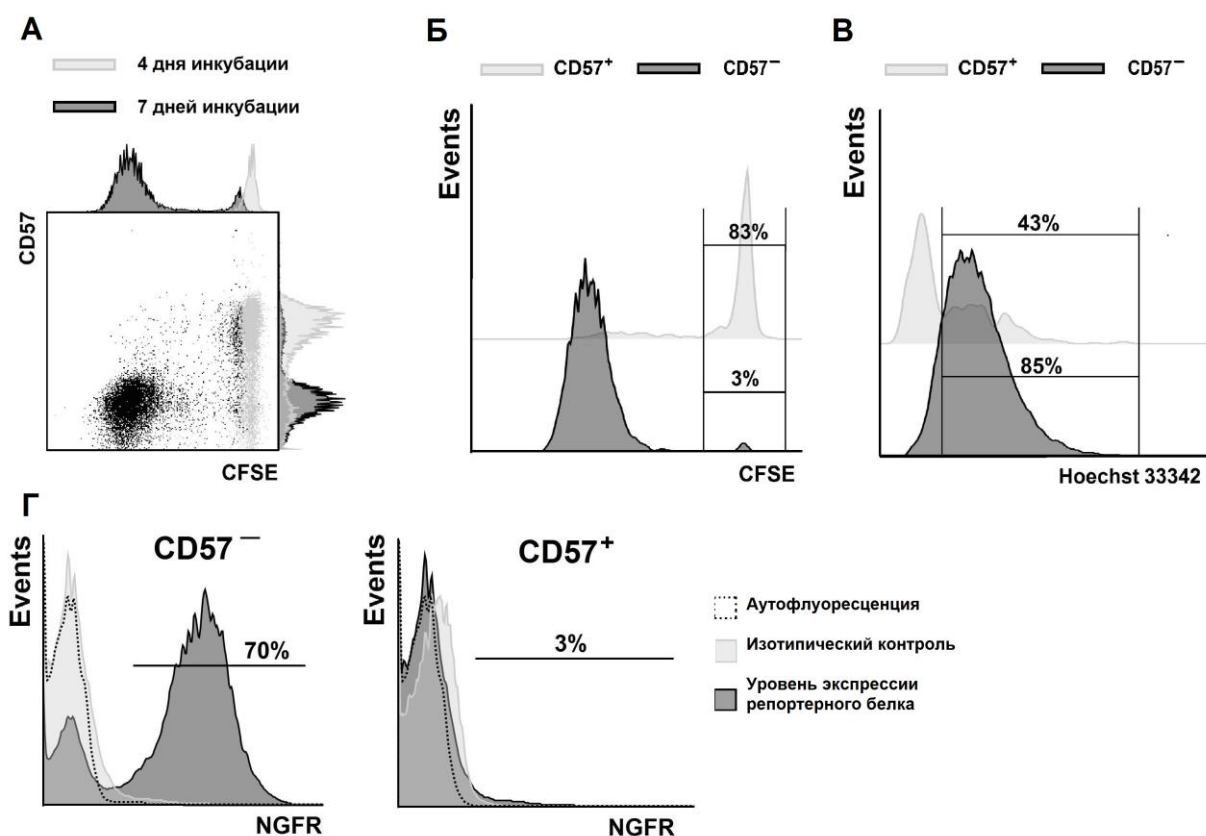


Рисунок 28. Трансдукция CD57-негативных и CD57-позитивных НК-клеток. А) Пролиферативная активность НК-клеток, измеренная с использованием CFSE-окрашивания на 4-й (светло-серый) и 7 (черный) день инкубации. Б) Сравнение пролиферативной активности CD57⁻ и CD57⁺ НК-клеток, измеренных по уровню свечения CFSE на 7-й день стимуляции. В) Анализ клеточного цикла, выполненный в CD57⁻ и CD57⁺ НК-клетках, стимулированных IL-2 и K562-mbIL21 в течение 7 дней. Г) Эффективность трансдукции CD57-негативных и CD57-позитивных НК-клеток.

Была проведена оценка эффективности трансдукции НК-клеток, различных по уровню экспрессии NKG2C. NKG2C-позитивные и NKG2C-негативные НК-клетки были получены от CMV-серопозитивных доноров. У части доноров NKG2C-позитивные НК-клетки лучше подвергались трансдукции, чем NKG2C-негативные (Рис. 29). Возможно, к этому приводила активная пролиферация NKG2C-позитивных клеток, которая наблюдалась у ряда доноров.

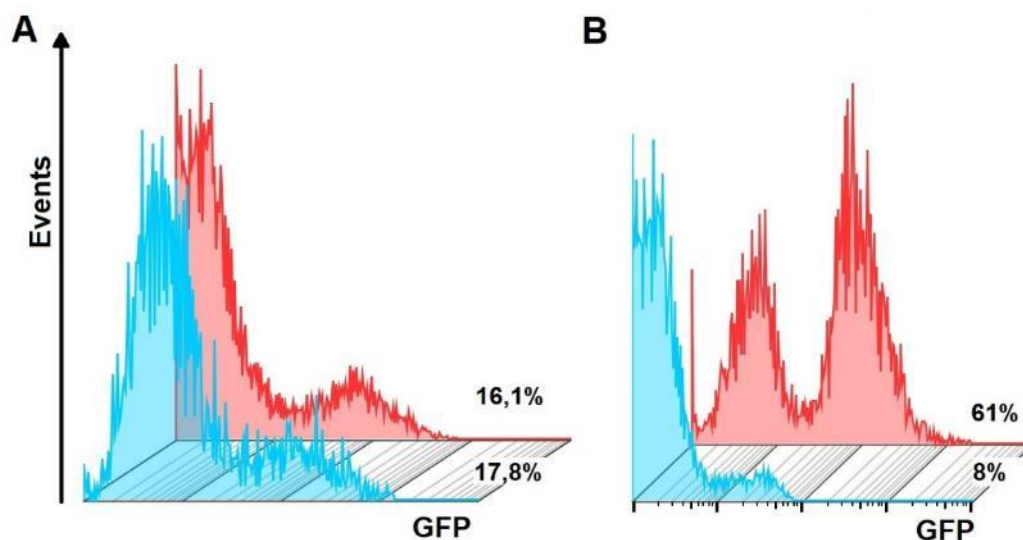


Рисунок 29. Уровень трансдукции активированных субпопуляций НК-клеток, зарегистрированный по флуоресценции GFP. Голубой - NKG2C-негативные НК-клетки, красный – NKG2C-позитивные НК-клетки.

3.5.2.1 Анализ влияния условий стимуляции НК-клеток на эффективность трансдукции

Была поставлена серия экспериментов по трансдукции стимулированных IL-2/K562-mbIL21 НК-клеток. Для оценки влияния стимуляции на фенотипические характеристики НК-клеток был проведен анализ нативных НК-клеток. Получены следующие доли клеток, позитивных по различным маркерам (среднее \pm SE): CD16⁺ (93,7% \pm 1,3), CD57⁺ (52,1% \pm 5,8), HLA-DR⁺ (3,6% \pm 1,7), NKG2A⁺ (43% \pm 5,6), KIR2DL2/DL3⁺ (36,2% \pm 3,1), NKG2C⁺ (7,6% \pm 1,2). Затем НК-клетки стимулировали модифицированными фидерными клетками K562-mbIL21 в сочетании с IL-2. Анализ уровня экспрессии поверхностных маркеров стимулированных НК-клеток выявил повышение уровня экспрессии молекулы HLA-DR ($P < 0,001$ по сравнению с начальной пропорцией HLA-DR) (Рис. 30). Таким образом НК-клетки находятся в активированном состоянии. Большинство клеток после стимуляции демонстрировали фенотип, характерный для менее дифференцированных НК-клеток. На это указывает значительно более низкая доля позитивных по CD57 клеток (7,6% \pm 2,2) и более высокая доля NKG2A-позитивных НК-клеток в культуре по сравнению с нативными НК-клетками ($P < 0,001$ и $P = 0,012$ соответственно). Данные НК-клетки также экспрессировали активирующие рецепторы CD16, NKG2D, NKp30 (Рис. 30). Интересно отметить, что параллельно с низким уровнем экспрессии CD57 в части стимулированных клеток наблюдалась значительная экспрессия активирующего лектинподобного рецептора NKG2C, который также является маркером специфической субпопуляции НК-клеток – адаптивных НК-

клеток (Muntasell et al., 2013). (Рис. 30). Предположительно, НК-клетки NKG2C⁺CD57⁻ избирательно пролиферировали в ответ на использованные раздражители. Однако, так как на клональном уровне было показано, что высокодифференцированные НК-клетки CD57^{bright} могут терять экспрессию молекулы CD57, мы не могли исключить возможность частичной потери экспрессии CD57 НК-клетками с изначальным фенотипом NKG2C⁺CD57⁺.

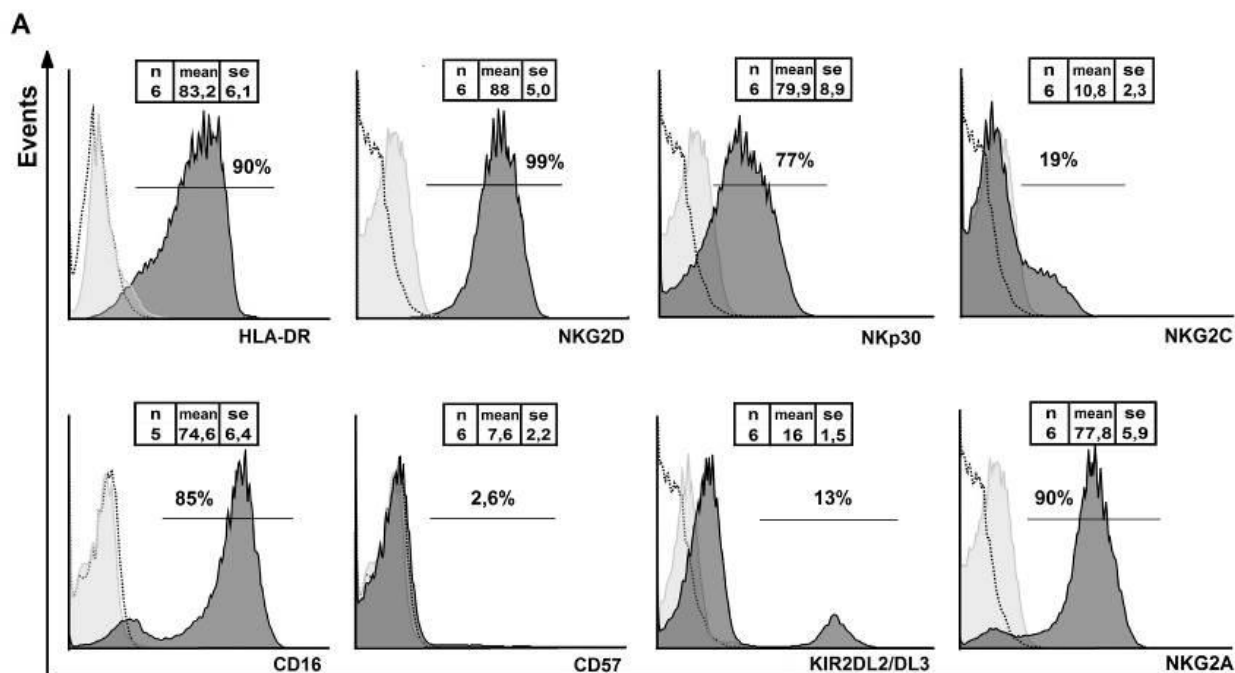


Рисунок 30. Фенотипические особенности НК-клеток, стимулированных K562-mbIL21 и IL-2. Фенотип НК-клеток был измерен с помощью проточной цитометрии на 7-й день стимуляции. Автофлуоресценция показана пунктирными линиями. Изотипический контроль показан светло-серым. Представлены данные, полученные от одного донора.

Был достигнут значительный уровень трансдукции для IL-2/K562-mbIL21-активированных НК-клеток (Рис. 31). Значительная доля позитивных НК-клеток была обнаружена на 3-й день инкубации с вирусными частицами. К 5 дню инкубации доля трансдуцированных клеток увеличивалась (Рис. 31Б). Эффективность трансдукции IL-2/K562-mbIL21-стимулированных НК-клеток возросла и стала сопоставимой с эффективностью трансдукции клеток CD56^{bright} (Рис. 27Б). Так как ретровирусной модификации подвергаются только пролиферирующие клетки, можно заключить, что метод стимуляции НК-клеток с помощью комбинации IL-2/K562-mbIL21 приводит к увеличению пролиферации НК-клеток и, следовательно, к увеличению эффективности трансдукции.

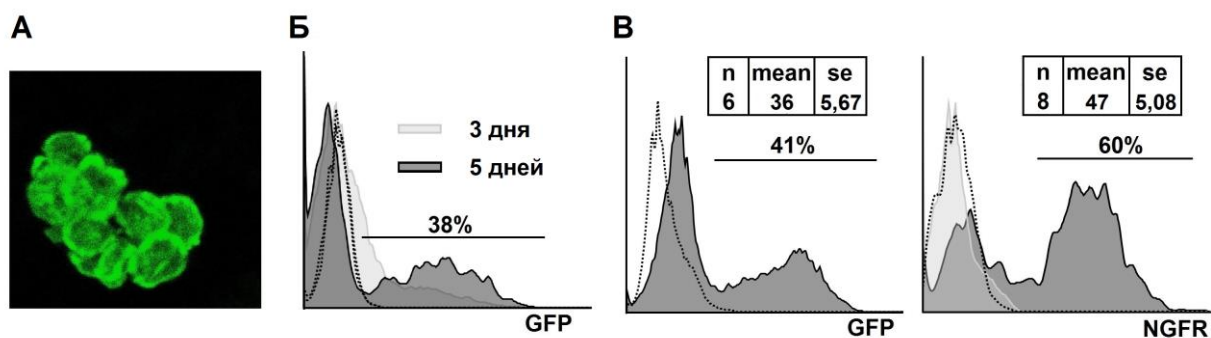


Рисунок 31. Трансдукция НК-клеток, стимулированных K562-mbIL21 и IL-2 в течение 11 дней. А) Флуоресценция белка GFP в трансдуцированных НК-клетках, обнаруженных с помощью конфокальной микроскопии на 3 день после трансдукции. Б) Динамика уровня трансдукции НК-клеток. Автофлуоресценция показана пунктирными линиями. В) Эффективность трансдукции двумя вирусными частицами, измеренная по уровню экспрессии репортерных белков GFP или NGFR на поверхности трансдуцированных НК-клеток. Показаны репрезентативные результаты. Автофлуоресценция показана пунктирными линиями. Изотипический контроль показан светло-серым.

Трансдуцированные клетки обладали высоким пролиферативным потенциалом, что позволило их отсортировать на клеточном сортировщике для увеличения процента трансдуцированных клеток.

3.5.3 Изучение продолжительности жизни, фенотипических и функциональных особенностей трансдуцированных НК-клеток

3.5.3.1 Изучение влияния трансдукции на фенотипические и функциональные характеристики трансдуцированных НК-клеток

Вирусная ДНК может вставляться в любой участок генома, поэтому трансдукция сопряжена с риском повреждения рабочих генов клетки. Клетки, в которых вставка нарушила работу жизненно важных генов или активировала программу апоптоза, погибали в течении первой недели после трансдукции. Остальная часть клеток имела хороший пролиферативный потенциал. Для проверки влияния трансдукции на характеристики клеток были проведены исследования фенотипа и функциональной активности НК-клеток. Позитивные по репортерному белку клетки были отсортированы через две недели после трансдукции. Далее они росли в полной среде с IL-2 в течении еще двух недель для того, чтобы полностью исключить возможность попадания клеток с поврежденным вирусом геномом. Был проведен анализ поверхностной экспрессии маркеров трансдуцированных и не трансдуцированных НК-клеток (Рис. 32А). Доля клеток, экспрессирующих CD57 и KIR2DL2/DL3 в трансдуцированных НК-клетках оказалась немного выше значений контрольных клеток. Доля NKG2A⁺ и HLA-DR⁺ клеток

наоборот была снижена по сравнению с не трансдуцированными клетками. Таким образом, из-за снижения экспрессии NKG2A и HLA-DR и повышения доли CD57 и KIR2DL2/DL3 трансдуцированных клеток можно заключить, что они становятся похожими на зрелые NK-клетки. Доля NKG2C⁺ трансдуцированных клеток оказалась в 2,48 раза меньше чем в не трансдуцированных клетках.

Изучении функционального потенциала также проводили через месяц после трансдукции (Рис. 32Б). Доля дегранулированных трансдуцированных клеток составляла 73.1%, 67.9% и 60.3% для трех независимых экспериментов, тогда как доля в не трансдуцированных клетках составили 55.7%, 48.0% и 53.0% соответственно.

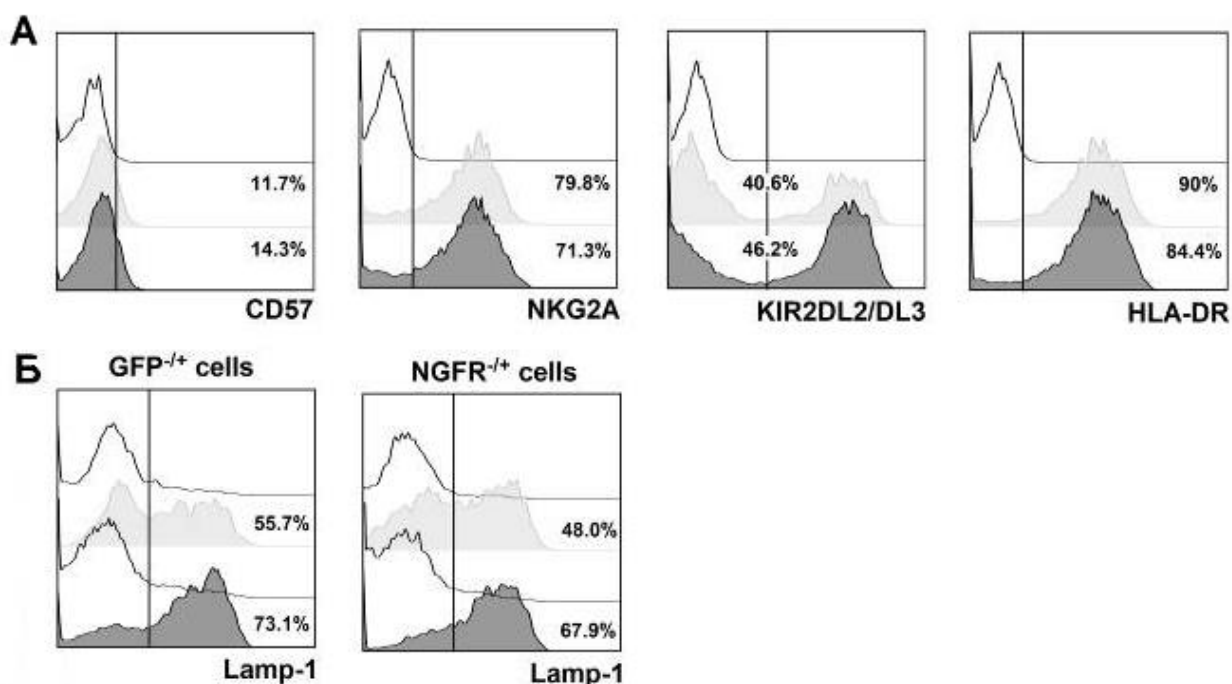


Рисунок 32. Сравнение фенотипических и функциональных характеристик трансдуцированных и не трансдуцированных NK-клеток. А) Сравнение поверхностной экспрессии маркеров. Аутофлуоресценция показана черными линиями, фенотип нетрансдуцированных NK-клеток показан светло-серым, трансдуцированных – темно-серым. Б) Анализ натуральной цитотоксичности против K562, измеренной по уровню дегрануляции. Черными линиями обозначена аутофлуоресценция, нетрансдуцированные NK-клетки показаны светло-серым, трансдуцированные – темно-серым.

3.5.3.2 Оценка уровня теломеразной активности в трансдуцированных NK-клетках

Далее были проведены эксперименты по измерению уровня теломеразной активности в трансдуцированных NK-клетках. Для этого была проведена сортировка клеток по уровню свечения репортерного белка GFP (Рис. 33А). В сортированных GFP⁺NK-клетках измерили уровень теломеразной активности и сравнили его с уровнем активности теломеразы в контрольных клетках. Измерение теломеразной активности

основано на выделении теломеразы из клеток, наращивание теломер в бесклеточной системе, с последующей амплификации теломерных повторов и детекции продукта с помощью вертикального гель-электрофореза. Чем выше активность теломеразы, тем больше максимальная длина теломер, полученных в бесклеточной системе. Поэтому, качественное определение уровня активности теломеразы заключается в визуальном сравнении ширины и количества полос в гель-электрофорезе с позитивным контролем, который предоставляется в коммерческом наборе. Было показано, что уровень теломеразной активности в трансдуцированных клетках сопоставим с позитивным контролем (Рис. 33Б) и сильно выше, чем в контрольных НК-клетках. Можно заключить, что модифицированные геном теломеразы НК-клетки обладают повышенным уровнем теломеразной активности.

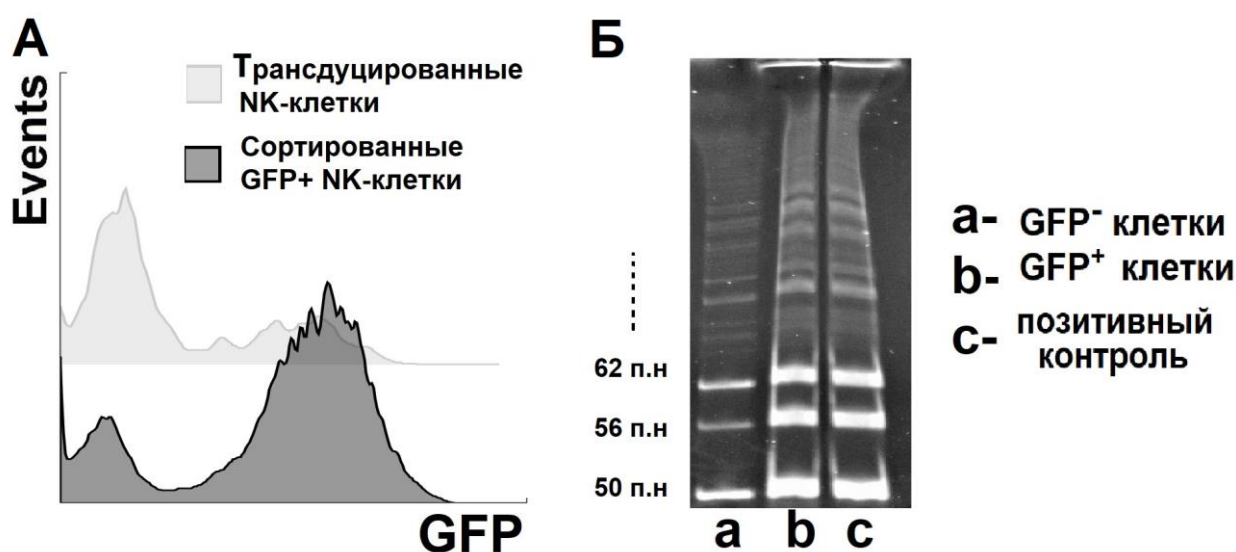


Рисунок 33 Определение теломеразной активности в сортированных GFP⁺ НК-клетках. А. Уровень свечения GFP в трансдуцированных клетках до (светло-серый) и после (темно-серый) сортировки. В. Сравнение теломеразной активности в трансдуцированных и не трансдуцированных НК-клетках.

3.5.3.3 Изучение влияния трансдукции на выживаемость и продолжительность жизни НК-клеток

Далее проводились исследования по изучению выживаемости и продолжительности жизни трансдуцированных НК-клеток. Анализ апоптоза в трансдуцированных и нетрансдуцированных клетках через 7 дней после трансдукции выполняли с использованием флуоресцентномеченого аннексина 5 и пропидия иодида. Данные о клеточной гибели были дополнительно подтверждены с помощью измерения уровня флуоресценции SYTOX Red Dead Cell Stain. Уровень апоптотических клеток не привешал 2% для всех изученных НК-клеток. Было показано, что hTERT-НК-клетки демонстрировали более низкий уровень смертности путем некроза, чем

немодифицированные клетки (Рис. 34А). Процент (среднее \pm SE) некротических модифицированных клеток составил $3\% \pm 1,1$ против $5,4\% \pm 0,4$ для немодифицированных клеток. Понижение доли некротических клеток после трансдукции можно объяснить тем, что ретровирусной трансдукции подвергаются только пролиферирующие клетки (Carlsten and Childs, 2015). Таким образом, процедура трансдукции не оказывала значительного влияния на жизнеспособность НК-клеток: как трансдуцированные, так и нетрансдуцированные клетки имели низкий уровень апоптоза, а количество модифицированных клеток, умирающих путем некроза было меньше, чем нетрансдуцированных клеток (Рис. 34А).

Для сравнения продолжительности жизни модифицированных и немодифицированных клеток было необходимо подобрать адекватный контроль. Была поставлена серия контрольных экспериментов, повторяющих процедуру трансдукции, но без вставки трансгена. Было обнаружено, что среднее время жизни части трансдуцированных клеток \pm SE составило (52,4д. \pm 9,6), тогда как продолжительность жизни контрольных клеток варьировало от 15 до 45 дней (24,6д. \pm 6,0). Таким образом можно заключить, что введение гена каталитической субъединицы теломеразы может продлевать жизнь отдельных НК-клеток (Рис. 34Б).

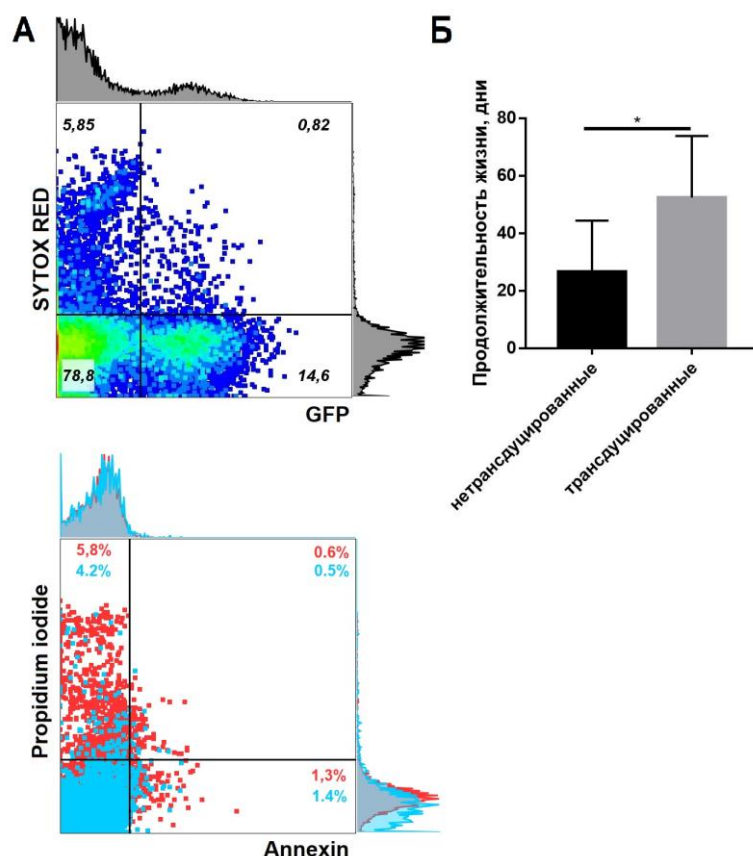


Рисунок 34. Жизнеспособность и продолжительность жизни трансдуцированных клеток. А) Жизнеспособность трансдуцированных НК-клеток, измеренная с помощью SYTOX RED (слева). Измерение жизнеспособности и по уровню флуоресцентного свечения annexin 5/propidium iodide справа показано на трансдуцированных (синие точки) и нетрансдуцированных (красные точки) клетках. Б) Сравнение продолжительности жизни трансдуцированных и нетрансдуцированных НК-клеток.

3.5.4 Трансдукция клонов НК-клеток

Были проведены эксперименты по трансдукции клонов НК-клеток. Основным критерием отбора клонов был высокий уровень пролиферации. Всего было трансдуцировано 16 клонов, 9 из которых были более подробно охарактеризованы (таблица 2). В том числе, для трансдукции были выбраны клоны, различающиеся по экспрессии рецептора NKG2C и рецепторов KIR. Анализ разных типов рецепторов KIR проводили с применением панелей антител, разработанных в ходе выполнения проекта с учетом кросс-реактивности известных антител к этим рецепторам. Часть проанализированных клонов экспрессировали ингибирующие рецепторы KIR2DL2/DL3, некоторые клоны не экспрессировали рецепторы KIR на поверхности, один из выбранных экспрессировал активирующий рецептор KIR2DS1 и KIR2DL5. Дополнительно в клонах проводился анализ экспрессии CD56, CD16, HLA-DR или других маркеров, а также оценивался уровень натуральной цитотоксичности и продукции IFN- γ .

Таблица 2. Фенотипический анализ клонов, отобранных для последующей трансдукции.

Клоны	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>CD56, %</i>	80,2	86	66			88	90,5	80	91
<i>CD56, MFI</i>	664	542	385			59	16,7	165	55
<i>NKG2C, %</i>	100	0	100			0	0	100	100
<i>NKG2C, MFI</i>	11,2	-	12,7			-	-	12	10,3
<i>CD16, %</i>	0	0	0			95,9	92,8	31,6	96
<i>CD16, MFI</i>	-	-	-			80,6	33,4	68,8	53,5
<i>HLA-DR, %</i>	100	100	100			19,7	8,85	17,5	41,6
<i>HLA-DR, MFI</i>	36,8	20,6	26,8			10	9,71	13,5	10,8
<i>NKG2D, %</i>	100	100	100			-	-	-	-
<i>NKG2D, MFI</i>	36,2	26,4	32,6			-	-	-	-
<i>KIR2DL2</i>	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg
<i>KIR2DL3</i>	pos	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	neg
<i>KIR2DS1</i>	-	-	-	pos	neg	neg	neg	pos	neg
<i>KIR2DL5</i>				-	-	neg	neg	pos	neg
<i>KIR3DL1</i>	-	-	-	pos	neg	neg	neg	neg	neg
<i>KIR3DL2</i>				pos	neg	neg	neg	neg	neg
<i>KIR2DL1</i>	-	-	-	pos	neg	neg	neg	neg	neg
<i>IFN-γ, pg/ml</i>				134	60,6				

Эффективность трансдукции в среднем составила $52.5 \pm 9.8\%$ (SE). Хорошо пролиферирующие клоны демонстрировали высокий уровень экспрессии репортерного белка GFP (Рис. 35А) через 3 дня после трансдукции. При культивировании трансдуцированных клонов уровень экспрессии GFP повышался (Рис. 35В).

Была проведена оценка влияния фенотипических особенностей клонов на эффективность модификации. Было замечено, что эффективность модификации клонов может зависеть от уровня поверхностной экспрессии маркеров. Эффективность модификации клона №1 оказалась выше, чем в клонах №2 и 3 (Рис. 35А). Вместе с этим клетки клона №1 демонстрировали самый высокий уровень экспрессии маркеров CD56 HLA-DR и NKG2D (таблица 2), что говорит об активированном состоянии клона. В

результате можно заключить, что эффективность клонирования зависит от уровня активации клеток. Также было замечено, что эффективность трансдукции зависит от наличия экспрессии KIR2DL2/DL3 (Рис 35).

После трансдукции клоны проявляли натуральную цитотоксическую активность против стандартных клеток-мишеней K562 (Рис. 35Б). Активность теломеразы в клонах была проверена с помощью теломеразного теста. Было показано, что активность теломеразы в трансдуцированных клетках значительно выше, чем в нетрансдуцированном клоне (Рис. 35Г).

Для проверки возможности трансдукции замороженных клонов, были выбраны клоны №6, 7, 8 и 9, которые отличаются по экспрессии NKG2C и рецепторов KIR (таблица 2). Клоны были разморожены спустя полгода после заморозки и культивировались в полной среде с добавлением 100 ед/мл ИЛ-2 в течении 3 дней. Для проверки функциональной активности размороженных клонов была измерена натуральная цитотоксичность против клеток-мишеней K562 (Рис. 35Д). Было показано, что заморозка/разморозка клонов не препятствует трансдукции, однако уровень GFP-позитивных клеток значительно снижается (Рис. 35Е), что возможно связано со снижением пролиферативной активности после разморозки.

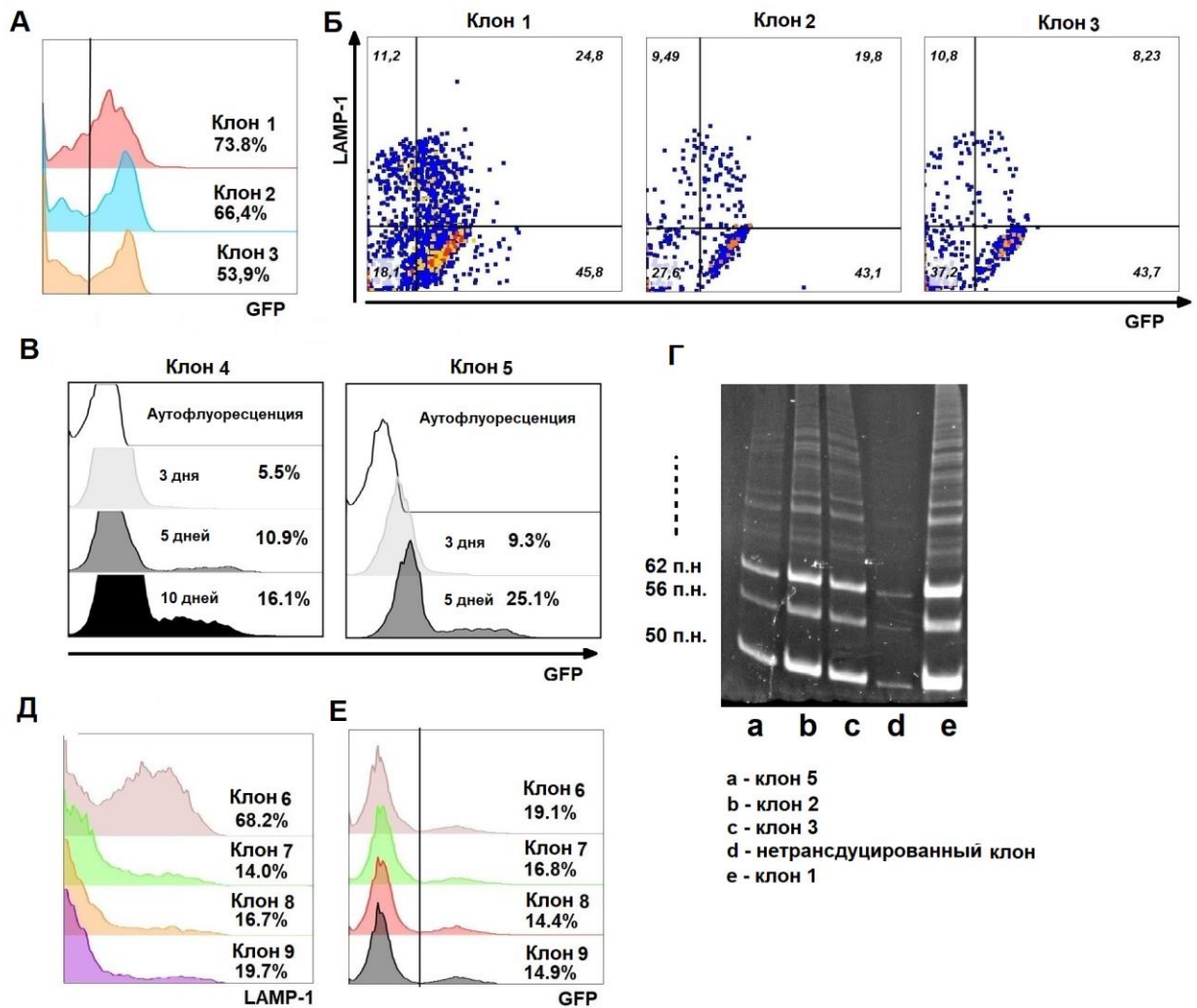


Рисунок 35. Трансдукция клонов НК-клеток человека. А) уровень экспрессии репортерного белка GFP в клетках клонов, измеренный через 3 дня после трансдукции. Б) Натуральная цитотоксичность, измеренная после трансдукции по уровню дегрануляции против клеток K562. В) Динамика экспрессии репортерного белка в трансдуцированных клонах НК-клеток, измеренная через 2 (свето-серый), 4 (темно-серый) и 9 (черный) дней после трансдукции. Г) Активность теломеразы в трансдуцированных (a,b,c,e) и не трансдуцированном клоне (d) НК-клеток человека. Д) Натуральная цитотоксичность, измеренная до трансдукции по уровню дегрануляции против клеток K562. Е) Уровень экспрессии репортерного белка GFP в клетках размороженных клонов, измеренный через 3 дня после трансдукции.

4 Обсуждение

Для получения долгоживущих популяций НК-клеток был выбран способ стимуляции комбинацией IL-2/K562-mbIL21 (Denman et al., 2012). Рецепторы IL-2 и IL-21 содержат общую γ -цепь, что объясняет частичное сходство в действии этих цитокинов на НК-клетки (Wendt et al., 2007). Баланс между сигналами лежит в основе комплексной регуляции активации и функционирования НК-клеток, опосредованной этими цитокинами. В нашей системе стимуляции IL-21 был представлен НК-клеткам на поверхности клеток K562. Эти фидерные клетки также экспрессировали лиганд 4-1BBL, рецептор которого также может быть экспрессироваться на поверхности НК-клеток (Melero et al., 1998).

НК-клетки, активированные с помощью IL-2/K562-mbIL21, обладали большей продолжительностью жизни, чем клетки, которые были стимулированы только IL-2. В литературе упоминается значительная донор-опосредованная вариабельность экспансии НК-клеток (от 600 до 6362 раз) при использовании данного способа стимуляции (Liu et al., 2013b). Описанная вариабельность может быть связана с различным процентным соотношением субпопуляций циркулирующих НК-клеток у различных индивидов. Одной из задач данной работы было изучить влияние стимуляции IL-2/K562-mbIL21 на НК-клетки с разными исходными фенотипическими характеристиками. Для получения более гомогенных культур НК-клеток была выбрана модель клонирования, где вся популяция является потомком одной клетки. Культивирование единичных НК-клеток позволяет исключить влияние исходного соотношения субпопуляций циркулирующих в периферической крови НК-клеток на клеточную экспансию, а также детально изучить взаимосвязь фенотипа НК-клеток с уровнем их пролиферации. Кроме того, использование клонирования может позволить отобрать более гомогенные популяции клеток с желаемыми свойствами.

К настоящему времени существует несколько протоколов, описывающих метод стабильной продукции клонов НК-клеток. Метод сортировки единичных клеток непосредственно в лунки культурального планшета, используемый в настоящем исследовании, позволяет получать однородные клеточные популяции с более высокой точностью, чем метод лимитирующих разведений, описанный в протоколе Cella и Colonna (Cella and Colonna, 2000). Эмпирически нами была определена оптимальная доза фидерных клеток (1×10^4 клеток на мл), достаточная для стимуляции экспансии НК-клеток (Рис. 5В). Результаты согласуются с данными предыдущих работ, описывающих ко-стимулирующие эффекты IL-21 на индуцированную IL-2 пролиферацию НК-клеток (Lim et al., 2014; Parrish-Novak et al., 2000).

С использованием клонов НК-клеток нами было показано, что условия культивирования оказывают большое влияние как на фенотип и функциональные характеристики, так и на уровень экспансии и общую продолжительность жизни культур НК-клеток. Еженедельная рестимуляция клонов НК-клеток с помощью IL-2/K562-mbIL21, применяемая в модели культивирования 1, не приводила к получению долгоживущих популяций НК-клеток. В нескольких более ранних исследованиях было показано, что влияние добавления IL-21 на скорость экспансии и изменение фенотипических характеристик НК-клеток зависит от дозы и, что наиболее важно, от времени и продолжительности воздействия. Например, добавление IL-21 только в течение первой недели культивирования приводило к увеличению количества НК-клеток (Lim et al., 2014), тогда как повторная стимуляция IL-21 в сочетании с IL-2 пролиферации не вызывала (Brady et al., 2010; Lim et al., 2014). Более того, было показано, что непрерывное культивирование в среде с IL-21 может вызывать апоптоз НК-клеток (Kasaian et al., 2002). Частое добавление фидерных клеток также может приводить к чрезмерной дегрануляции НК-клеток, что истощает их внутриклеточные цитолитические ресурсы и отрицательно сказывается на их выживании. Наиболее значительная экспансия НК-клеток (10^{11} раз после шести недель культивирования), описанная в литературе, наблюдалась при однократной стимуляции IL-21 на первом этапе культивирования (Granzin et al., 2016). Нами был проведен поиск оптимального графика рестимуляции клонов НК-клеток. Однократная стимуляция НК-клетки фидерными клетками K562-mbIL21 инициировала формирование клона и приводила к значительному увеличению количества клеток в течение первых нескольких недель культивирования, но без рестимуляции скорость пролиферации НК-клеток после 6-й недели замедлялась и приводила к гибели клонов. Добавление мембраносвязанного IL-21 на начальном этапе и через 6 недель культивирования (модель 2) приводило к появлению клонов с общим количеством клеток, достигающим 2×10^7 (Рис. 15Б) с продолжительностью жизни до 14 недель. Более частое добавление фидерных клеток приводило к снижению срока жизни клонов.

Ранее был описан метод получения долгоживущих клонов, сохраняющих жизнеспособность в течение 8-16 недель (Carr, 2002). Однако данная методика требует еженедельного добавления к клонам двух типов облученных фидерных клеток (аллогенных периферических мононуклеаров и линии В-лимфобластоидных клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барра (EBV)). Накопление фидерных клеток из аллогенных периферических мононуклеаров связано с дополнительными трудозатратами. В отличие от этого метода, предлагаемая в работе модель для стабильного производства долгоживущих клонов требует только двукратного добавления одного типа фидерных

клеток, полученных из клеточной линии K562-mbIL21. Производство таких фидерных клеток является более доступным и проще в реализации. Поскольку фидерные клетки элиминируются в течение недели после добавления, можно получить более чистую культуру NK-клеток, которая не требует специальной очистки от фидерных клеток, например, на градиенте фиколла или с помощью магнитной сепарации. Также стоит отметить, что эффективность клонирования общей популяции NK-клеток в разработанных условиях стимуляции составляла от 17% до 35%, тогда как в некоторых экспериментах по получению клонов субпопуляции CD56^{bright} это значение достигало 70%.

Стимуляция IL-2 и/или IL-21 приводит к увеличению экспрессии HLA-DR на поверхности NK-клеток (J H Evans et al., 2011b; Loyon et al., 2016; Skak et al., 2008). В данной работе HLA-DR был использован как маркер активации NK-клеток. Кроме того, IL-21 как в растворимой, так и в мембранно-связанной форме увеличивает продукцию IFN- γ в NK-клетках (Li et al., 2015; Lim et al., 2014). Более высокий уровень экспрессии HLA-DR наблюдался в клонах, выращенных с использованием еженедельного добавления фидерных клеток и IL-2, а не только IL-2 (Рис. 7Б, Рис. 8). Самые долгоживущие клоны были зарегистрированы, в основном, в клонах, полученных из HLA-DR-негативных NK-клеток. Можно заключить, что экспрессия HLA-DR на поверхности NK-клеток не имеет прямой связи с пролиферацией. Применение в данной работе модели культивирования 2, предполагающей отсутствие рестимуляции фидерными клетками на первых неделях культивирования, приводило к более низким показателям уровня экспрессии CD16 и секреции IFN- γ , по сравнению с клонами, выращенными по модели 1, включающей еженедельное добавление фидерных клеток (Рис. 7В, Рис. 9В). Эти данные поддерживают результаты другого исследования, где также наблюдалось снижение экспрессии CD16 при однократной стимуляции клеток IL-21 в начале культивирования (Lim et al., 2014; Loyon et al., 2016). Значительное изменение интенсивности экспрессии CD16, наблюдаемое в обеих моделях культивирования, указывает на то, что CD16 не следует рассматривать как маркер дифференцировки NK-клеток при культивировании *in vitro*.

Так как клоны, выращенные по модели 2 демонстрировали низкие уровни секреции IFN- γ и менее активированный фенотип, далее проводился поиск способа повышения функциональной активности клонов, культивируемых по модели 2. Известно, что рестимуляция NK-клеток цитокинами приводит к повышению их функциональной активности. В частности, могут быть таким способом получены цитокин-индуцированные NK-клетки памяти (Romee et al., 2012). Было сделано предположение, что мембранно-связанный IL-21 может влиять на функции NK-клеток аналогичным образом. Поэтому были проведены исследования по активации клонов NK-клеток в более поздний период

клональной экспансии путем повторной стимуляции фидерными клетками. -Еженедельное добавление фидерных клеток в течении двух недель значительно увеличивало уровни экспрессии маркеров, ассоциированных с активацией (Рис. 8).

Согласно широко распространенной гипотезе, клетки с фенотипом CD56^{bright} являются незрелыми предшественниками клеток CD56^{dim} (Abel et al., 2018; Freud et al., 2014). При этом происходит непрерывный процесс дифференцировки NK-клеток, характеризующийся потерей одних маркеров и приобретением других (Abel et al., 2018). В ходе дифференцировки клетки CD56^{bright} теряют экспрессию NKG2A и приобретают экспрессию рецепторов KIR и молекулы CD57. До последнего времени этот процесс считался необратимым (Bjorkstrom et al., 2010). К настоящему времени появляется все больше данных, свидетельствующих о пластичности фенотипических характеристик NK-клеток в условиях стимуляции (Freud et al., 2014; Lim et al., 2014). В нашей работе было показано, что двухнедельная стимуляция K562-mbIL21 клонов NK-клеток даже на поздних неделях культивирования может приводить к увеличению уровня экспрессии таких маркеров, как CD56, NKG2A, HLA-DR и CD86 (Рис. 8). Это соответствует данным о появлении экспрессии NKG2A и исчезновении поверхностной экспрессии CD57 у высокодифференцированных клеток CD57⁺. Таким образом фенотипический профиль K562-mbIL21-активированных клонов больше похож на малодифференцированные CD56^{bright}, чем на зрелые NK-клетки CD56^{dim}. Можно заключить, что NK-клетки могут проявлять клеточную пластичность. Возможно, процесс дифференцировки зрелых NK-клеток не имеет жесткой последовательности и может подстраиваться под конкретные условия стимуляции.

При изучении цитотоксической активности было показано, что еженедельная рестимуляция клонов фидерными клетками может приводить к снижению уровня натуральной цитотоксичности, по-видимому, из-за истощения цитолитического потенциала NK-клеток при культивировании с фидерными клетками (Рис. 9А). Интересно, что эти клоны имели более высокий внутриклеточный уровень гранзима В, одного из основных медиаторов гранул-опосредованной цитотоксичности NK-клеток (Рис. 9Б). Возможно контактные взаимодействия приводят к увеличению экспрессии и накоплению гранзима В в цитоплазме клеток. Это соотносится с результатами по увеличению уровня гранзима В при постоянном культивировании NK-клеток с K562-mbIL21 (Lim et al., 2014). Клоны, полученные с помощью модели 2, не секретируют достаточного количества IFN- γ без дополнительной стимуляции (Рис 7В). Метод предварительной кратковременной стимуляции NK-клеток комбинацией IL-12+IL-15 (Erokhina et al., 2018) значительно повышал уровни продукции IFN- γ . Это является еще одним подтверждением того, что

клоны, выращенные по модели 2, способны быстро повышать свои функциональные характеристики в ответ на стимул.

Таким образом, клоны, культивируемые по модели 1 обладают более активированным фенотипом и увеличенным уровнем продукции IFN- γ . Однако уровень цитотоксической активности у них оказался сниженным по сравнению с клонами, культивируемыми по модели 2. Клоны, полученные с помощью модели 2 обладали большей экспансией и продолжительностью жизни, что в совокупности с повышенной цитотоксической активностью, по сравнению с клонами, полученными по модели 1, повышает их значимость для клинического применения. В то же время, увеличенная продолжительность жизни клонов, культивируемых с использованием модели 2, сопровождается более низкой поверхностной экспрессией CD16 и уровнем продукции IFN- γ , что сказывается на функциональном потенциале клеток.

Ранее было показано, что NK-клетки из субпопуляций CD56^{dim} и CD56^{bright} отличаются по уровню активации в ответ на стимуляцию IL-2 и IL-21 (Wendt et al., 2007). Субпопуляция высокодифференцированных CD57⁺-NK-клеток, которая увеличивается пропорционально возрасту и при наличии определенных хронических инфекций (Nielsen et al., 2013), также может реагировать на стимуляцию по-своему. Эффективность ответа NK-клеток на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21 может в некоторой степени быть опосредовано различным соотношением более или менее дифференцированных клеток между донорами. Поэтому был изучен ответ на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21 NK-клеток из субпопуляций CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻ и CD57^{bright}. Клоны, полученные из эти субпопуляций, отличались по эффективности генерации клонов, времени жизни и фенотипическим характеристикам. Самая высокая частота формирования клонов была зарегистрирована в субпопуляции CD56^{bright}. Вероятно, это связано с тем, что клетки CD56^{bright} имеют рецептор с высоким сродством к IL-2, что приводит к лучшей реакции на стимуляцию (Poli et al., 2009). Важно отметить, что у шести доноров частота образования клонов из субпопуляции CD56^{bright} значительно варьировала в пределах от 28% у донора 1 от 1 до 70% у донора 3 (Рис. 12А). Низкую воспроизводимость частоты генерации клонов можно частично объяснить неучтенными различиями NK-клеток внутри выбранных субпопуляции. Возможно также, что другие факторы, не зависящие от дифференцировки NK-клеток, также могут влиять на эффективность клонирования. Было сделано предположение, что уровень активации свежевыделенных NK-клеток может влиять на эффективность клонообразования. Для того, чтобы распознать и отделить активированные NK-клетки от покоящихся, было предложено использовать уровень экспрессии HLA-DR. Также известно, что заражение организма CMV может сопровождаться значительным

увеличением числа НК-клеток с фенотипом NKG2C⁺, которые могут обладать повышенной пролиферативной активностью (Muntasell et al., 2013). Поэтому было решено также изучить эффективность клонирования и продолжительность жизни клонов, полученных из субпопуляций, отличных по степени дифференцировки и уровню активации, а также отличных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C. Не было обнаружено значительных изменений эффективности генерации клонов из различных субпопуляций НК-клеток. Интересно, что частота образования клонов из субпопуляций НК-клеток CD57^{bright}, полученных по второму варианту клонирования, оказалась статистически выше ($p=0,033$) по сравнению с частотой образования клонов из НК-клеток CD57^{bright}, полученных по первому варианту клонирования. Возможно это связано с тем, что для получения клонов из НК-клеток, различных по степени дифференцировки и уровню экспрессии NKG2C были выбраны серопозитивные по CMV доноры с высоким изначальным уровнем экспрессии NKG2C. Таким образом повышенный уровень экспрессии NKG2C на поверхности НК-клеток может быть ассоциирован с повышением эффективности клонирования из высокодифференцированных клеток CD57^{bright}.

Другим важным параметром, рассматриваемым в данной работе, является продолжительность жизни клонов, включая пролиферативную активность и выживаемость клеток. Интересно отметить, что клоны, полученные из субпопуляции CD56^{bright}, характеризующиеся лучшей способностью генерировать клоны, продемонстрировали более низкий уровень выживаемости по сравнению с клонами, полученными из субпопуляций CD56^{dim}. Самые долгоживущие клоны были в основном получены из не активированной субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻ (Рис. 13Б). Это может быть связано с тем, что субпопуляция CD56^{dim} лучше реагирует на стимуляцию K562-mbIL-21. При этом, стоит отметить, что выживаемость клонов из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺ была статистически выше, по сравнению с клонами из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁻. Возможно это связано с тем, что часть клонов из субпопуляции CD57⁺NKG2C⁺ приобрела черты адаптивности в данных условиях стимуляции.

Интересно, что продукция IFN- γ была значительно выше в кломах из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻ по сравнению с CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁺ (Рис. 23А). Кроме того, клоны из субпопуляции CD56^{dim} обладали более высокой экспрессией активационного маркера HLA-DR, чем клоны из субпопуляции CD56^{bright} (Рис. 19А). В другой работе по изучению стимуляции НК-клеток IL-21 был зарегистрирован высокий уровень экспрессии маркера активации CD69 в субпопуляции CD56^{dim} по сравнению с CD56^{bright} (Wendt et al., 2007). Следует отметить, что в среднем продолжительность жизни превышала 8 недель

только менее чем у 30% клонов из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻. Выжившие клоны обычно характеризовались более высокой экспансией. Причины более высокой продолжительности жизни таких клонов из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻ по сравнению с клонами из субпопуляции CD56^{bright} пока неизвестны.

В клонах NK-клеток, полученных из CD57⁻-субпопуляций, часть клеток приобретает экспрессию CD57 во время культивирования. Это можно объяснить «старением» культуры NK-клеток. Доля CD57⁺ клеток в таких клонах в большинстве случаев обратно коррелирует с продолжительностью жизни клона. Это наблюдение хорошо согласуется с ранее описанными результатами, свидетельствующими о том, что экспрессия CD57 NK-клетками приводит к снижению пролиферативной способности (Lichtfuss et al., 2012b).

Интересно, что значительная часть клонов (около 30%), полученных из субпопуляции CD57^{bright}, содержала клетки, не экспрессирующие CD57 (Рис 18B). Это наблюдение указывает на то, что в определенных условиях NK-клетки могут потерять экспрессию CD57 во время клонирования. Ранее считалось, что экспрессия CD57 не может исчезать с поверхности клеток (Bjorkstrom et al., 2010). Это расхождение может быть объяснено различными экспериментальными условиями, используемыми в работах. Различные уровни экспрессии CD57 среди клонов могут отражать стадию дифференцировки, функциональное состояние клеток клона или присутствие клеток с чертами адаптивности. Интересно, что среди долгоживущих клонов был обнаружен клон, демонстрирующий некоторые фенотипические характеристики, типичные для адаптивных NK-клеток. Он был охарактеризован как NKG2C⁺NKG2A⁻, однако, в отличие от классического фенотипа адаптивных NK-клеток (Guma et al., 2004; Kovalenko and Streltsova, 2016), практически не имел экспрессию CD57.

Подавляющее большинство клонов экспрессировали на поверхности лектиноподобный рецептор NKG2A, который характерен для менее дифференцированных NK-клеток. Это соответствует более ранним данным, показывающим, что инкубация NK-клеток с IL-21 приводит к увеличению числа NKG2A-позитивных NK-клеток и экспрессии гена NKG2A (Li et al., 2015). Очевидно, что IL-21 не индуцирует дифференцировку NK-клеток, а скорее способствует экспансии клеток с менее зрелым фенотипом. Высокая доля NKG2A-экспрессирующих NK-клеток (около 70%) ранее также была описана в стимулированных IL-2/K562-mbIL21 культурах NK-клеток. В этих культурах было также зарегистрировано увеличение длины теломер (Denman et al., 2012). В нашей работе было показано, что NKG2A⁻-NK-клетки, даже при наличии экспрессии CD57, могут начать экспрессировать NKG2A *de novo* в ответ на стимуляцию IL-2/K562-

mbIL21. Это может быть связано с потерей (по крайней мере частичной) поверхностной экспрессии CD57. В то же время следует отметить, что экспрессия NKG2A не является обязательным условием образования клонов НК-клеток (Рис. 22Г).

В одной из работ было показано, что поверхностная экспрессия различных рецепторов KIR увеличивается при дифференцировке НК-клеток и достигает максимума в субпопуляции CD57^{bright} (Bjorkstrom et al., 2010). Распределение экспрессии KIR2DL2/DL3 в клонах (Рис. 21) в основном соответствовало схеме, описанной в этой работе. Одинаковая экспрессия KIR в клетках отдельных клонов (все клетки клона были либо отрицательные или положительные по экспрессии KIR) подтверждает, что экспрессия KIR сохраняется во время культивирования. Однако клоны, образованные из субпопуляции CD56^{bright}HLA-DR⁻, по-видимому, являются исключением. Доля позитивных по KIR2DL2/DL3 клонов была намного выше, чем в клонах из субпопуляции CD56^{bright}HLA-DR⁺ и была сопоставима с долей KIR2DL2/DL3⁺-клонов, полученных из CD57^{bright}. Усиление уровня пролиферации CD56^{bright}HLA-DR⁻НК-клеток в ответ на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21 или/и повышение жизнеспособности полученных клонов можно рассматривать как наиболее возможные причины для этого факта, хотя экспрессия *de novo* молекул KIR не может быть формально исключено (Bjorkstrom et al., 2010). Нельзя исключить, что преимущество в клональной экспансии KIR⁺-клеток из CD56^{bright}HLA-DR⁻ субпопуляции может быть связано с взаимодействием KIR2DL2/DL3 с лигандами HLA-S1, выставленными на соседних НК-клетках.

Стимуляция IL-2 и/или IL-21 приводит к увеличению экспрессии HLA-DR на поверхности НК-клеток (J H Evans et al., 2011b; Loyon et al., 2016; Skak et al., 2008). Экспрессия HLA-DR была предложена в качестве маркера активации НК-клеток. Кроме того, IL-21 как в растворимой, так и в мембранно-связанной форме увеличивает продукцию IFN- γ в НК-клетках (Li et al., 2015; Lim et al., 2014). Поэтому была изучена эффективность генерации клонов из HLA-DR⁺НК-клеток в ответ на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21. Известно, что HLA-DR-позитивные клетки составляют лишь небольшую долю НК-клеток здоровых людей, хотя их доля увеличивается в некоторых патологических состояниях, связанных с хроническим воспалением или инфекцией (Fogli et al., 2004b; Lichtfuss et al., 2012b), рассеянный склероз (T Aranami et al., 2006) и IgA-нефропатия (Yano et al., 1996b). Недавно было показано, что уровень HLA-DR⁺НК-клеток коррелирует с клиническими улучшениями у опухолевых пациентов (Charput et al., 2013). Эти клетки, возможно, уже подверглись активации *in vivo* под влиянием определенных раздражителей. В данной работе HLA-DR-позитивные НК-клетки не имели преимущества при формировании клонов в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21. Более того, самый

низкий процент долгоживущих клонов после 7-8 недель культивирования наблюдался в клонах из субпопуляции CD56^{bright}HLA-DR⁺ (Рис. 13Б). В клонах из субпопуляций CD56^{dim}, полученные из HLA-DR-позитивных НК-клеток, также погибали быстрее. Поэтому первоначально высокий процент циркулирующих HLA-DR-позитивных НК-клеток, вероятно, будет отрицательным фактором для экспансии таких клеток. С другой стороны, клоны, полученные из HLA-DR-позитивных клеток, как правило, имеют более высокий уровень экспрессии CD16 (Рис. 20А). Самый высокий уровень HLA-DR после 5-6 недель культивирования наблюдался в нескольких хорошо растущих клонах, полученных из клеток CD57^{bright}. Эта субпопуляция может содержать субпопуляцию адаптивных НК-клеток CD57^{bright}NKG2C⁺, которые, как было показано ранее, демонстрируют увеличение уровня HLA-DR (Kovalenko et al., 2017).

Согласно многочисленным исследованиям, естественная цитотоксичность НК-клеток увеличивается при стимуляции IL-21 (Skak et al., 2008; Strbo et al., 2008; Wendt et al., 2007). НК-клетки, активированные стимуляцией IL-2 и IL-21 в сочетании с EBV-LCL фидерными клетками, проявляли цитотоксичность против множества опухолевых мишеней (Granzin et al., 2016). В данной работе во всех случайно выбранных клонах был зарегистрирован различный уровень натуральной цитотоксичности на 6-й неделе культивирования, что подтвердило их функциональную активность (Рис. 23Г,Д).

Использование метода клонирования при получении гомогенной популяции НК-клеток для персонализированной иммунотерапии возможно только в том случае, если клетки сохраняют свои характеристики после заморозки/разморозки. Это потенциальное ограничивает использования НК-клеток в иммунотерапии, так как в отличие от Т-клеток, они очень чувствительны к процессу замораживания, что приводит к потере их функциональной активности. Ряд групп изучали стратегии оптимальной криоконсервации НК-клеток и показали, что активность замороженных НК-клеток может быть восстановлена путем инкубации в течение ночи с IL-2 (Dominguez et al., 1997; Domogala et al., 2016; Holubova et al., 2016). На данный момент нет опубликованных исследований по использованию аналогичной стратегии для восстановления функции замороженных клонов НК-клеток. Результаты данной работы показали, что даже длительное замораживание (в течение одного года) не влияет на фенотип и не снижает функциональную активность клонов НК-клеток. Клоны, извлеченные после криоконсервации, продемонстрировали высокие уровни экспрессии ряда поверхностных маркеров и хорошую пролиферативную способность (Рис. 25). Они также проявляли высокий уровень натуральной и антитело-зависимой цитотоксической активности. Таким образом, замораживание/размораживание клонов, полученных с помощью IL2/K562mbIL-

21, не влияет на их фенотипические и функциональные характеристики. Возможность заморозить такие клоны НК-клеток без потери функциональной активности позволяет создать банк НК-клеток для персонализированной иммунотерапии.

Одной из причин ограниченной пролиферации большинства зрелых клеток организма является репликативное старение, связанное с укорочением теломер. НК-клетки обладают ограниченным пролиферативным потенциалом в том числе из-за малой длины теломер (Ouyang et al., 2007; Romagnani et al., 2007). Стимуляция НК-клеток комбинацией IL-2/K562-mbIL21 приводит к увеличению пролиферации клеток. По литературным данным в условиях стимуляции комбинацией IL-2/K562-mbIL21 длина теломер в НК-клетках значительно увеличивается по сравнению со свежими НК-клетками (Denman et al., 2012). Положительная тенденция к увеличению длины теломер, вероятно, обусловлена активацией IL-21 транскрипционного фактора STAT3 (Spolski and Leonard, 2008), который, в свою очередь, регулирует экспрессию каталитической субъединицы обратной транскриптазы теломеразы (Konnikova et al., 2005). Возможно, увеличение пролиферации НК-клеток связано в том числе и с удлинением теломер. Поэтому было сделано предположение о том, что внедрение в геном НК-клеток каталитической субъединицы теломеразы может увеличить получаемое количество НК-клеток при культивировании.

Для встраивания гена hTERT была выбрана система ретровирусных частиц, так как данные частицы приводят к более высокой экспрессии трансгена, чем частицы на основе лентивирусных векторов (Suerth et al., 2016). Поэтому данный метод был применен для трансдукции человеческих НК-клеток. При отработке методики на клетках Jurkat было показано, что добавление избыточного количества вирусных частиц (концентрированных более чем в 15 раз) не повышает уровень трансдукции и приводит к преждевременной смерти. Предположительно, внедрение чрезмерного количества вирусных частиц в клетки приводило к повреждению ДНК. Дополнительным фактором могло служить закисление среды при добавлении большого количества вирусных частиц. Оптимальный для последующей трансдукции титр вирусных частиц достигался при концентрировании полученного супернатанта в 10 раз.

Уровень трансдукции клеток Jurkat варьировал между 45-70% для GFP-содержащего вектора. Эффективность трансдукции NGFR-содержащего вектора была еще выше, достигая 80-90% (Рис. 26). Небольшое различие в эффективности этих векторов может быть объяснено частичной гибелью клеток с высоким уровнем экспрессии белка GFP из-за его небольшой токсичности, описанной ранее (Liu et al., 1999). Несмотря на токсичность белка, после трансдукции не было обнаружено значительной элиминации

GFP-трансдуцированных клеток. Поскольку, как известно, на упаковку и последующую трансдукцию ретровирусных векторов влияет природа вставленной последовательности ДНК, разница в титрах вирусных частиц с GFP и NGFR может объяснить некоторые различия в эффективности заражения клеток.

Ранее было показано, что в условиях стимуляции IL-2 NK-клетки с фенотипом CD56^{bright} успешно подвергаются трансдукции, что возможно связано с наличием на их поверхности IL-2R (Caligiuri et al., 1990). Ретровирусные частицы способны проникать в ядро клетки только во время деления (Carlsten and Childs, 2015). Активация через IL-2R приводит к увеличению пролиферации клеток CD56^{bright}, что и повышает эффективность модификации. Однако, так как процентное соотношение клеток CD56^{bright} в периферической крови здоровых доноров от общего количества NK-клеток редко достигает более 10-15% (Michel et al., 2016), это делает процесс наработки большого количества активированных CD56^{bright}-NK-клеток достаточно трудоемким и требующим большого количества донорной крови. Также было показано, что низкая эффективность трансдукции NK-клеток с фенотипом CD57⁺ связана с тем, что большинство клеток из данной субпопуляции находятся в фазе клеточного цикла G₀. Для достижения поставленной в работе задачи был проведен поиск других условий стимуляции, которые могли бы увеличить эффективность трансдукции цельных NK-клеток.

В данной работе было установлено, что комбинация стимулов IL-2/K562-mbIL21 приводит к увеличению продолжительности жизни NK-клеток в сравнении со стимуляцией IL-2 (Рис. 4). Фенотипический анализ IL-2/K562-mbIL21-активированных NK-клеток на клональном уровне выявил снижение уровня экспрессии молекулы CD57 и увеличение уровня экспрессии NKG2A, что соответствует фенотипу менее дифференцированных клеток. Поэтому было сделано предположение, что данный способ стимуляции приведет к увеличению эффективности трансдукции NK-клеток. В результате анализа фенотипа стимулированных IL-2/K562-mbIL21 NK-клеток было показано статистическое уменьшение доли CD57⁺-NK-клеток, что может быть связано как с потерей этого маркера, так и с активным размножением субпопуляции CD57⁻. Это косвенно может свидетельствовать о хорошей жизнеспособности клеточных культур, так как экспрессия CD57 часто ассоциирована с уменьшением пролиферативной активности клеток (Bjorkstrom et al., 2010). Было показано значительное увеличение доли клеток HLA-DR⁺ что соотносится с данными, полученными в нашей лаборатории ранее (Erokhina et al., 2018).

Около 85-95% NK-клеток в периферической крови составляют высокодифференцированные NK-клетки CD56^{dim}, которые обычно экспрессируют на

своей поверхности CD16 (Cooper et al., 2001). Уменьшение процентного содержания клеток CD16⁺ после стимуляции IL-2/K562-mbIL21 свидетельствует в пользу приобретения фенотипа, сходного с фенотипом малодифференцированных клеток. Было зарегистрировано увеличение доли клеток NKG2A⁺ и уменьшение доли клеток, экспрессирующих KIR2DL2/DL3⁺, что также соответствует слабодифференцированному фенотипу. Эти данные соотносятся с результатами, полученными на клональных культурах.

При анализе фенотипа трансдуцированных НК-клеток, было показано увеличение доли клеток CD57⁺ и KIR2DL2/DL3⁺ и уменьшение доли клеток NKG2A⁺ и HLA-DR⁺. Таким образом, трансдуцированные НК-клетки демонстрировали фенотип более дифференцированных клеток. Вирусная ДНК может встраиваться в любой участок хромосомы, поэтому есть вероятность того, что вставка вирусной ДНК может снижать или увеличивать пролиферативный потенциал клеток. Малая субпопуляция НК-клеток может приобрести дополнительное преимущество в выживании перед другими, что повысит гомогенность популяции трансдуцированных клеток и отразится на фенотипе. Зарегистрированное увеличение доли CD57⁺ и KIR2DL2/DL3⁺ может быть связано с тем, что часть клеток с более дифференцированным фенотипом получила преимущество в выживании и пролиферации после трансдукции. Но выше было показано, что клетки CD57⁺ хуже подвергаются генетической модификации, чем клетки CD57⁻. Анализ фенотипических изменений проводили через месяц после трансдукции. Не исключено, что увеличение экспрессии CD57 и KIR2DL2/DL3 произошло уже после генетической модификации. На клональном уровне было показано, что уровень экспрессии молекулы CD57 постепенно увеличивается в процессе культивирования. Поэтому увеличение количества CD57-позитивных модифицированных клеток может быть связано с длительностью культивирования. Однако выше было показано, что экспрессия рецепторов KIR2DL2/DL3 не появляется на поверхности клональных культур в процессе культивирования. Было сделано предположение, что KIR2DL2/DL3-позитивные клетки возможно более подвержены генетической модификации. Эти данные были частично подтверждены в экспериментах по трансдукции клонов с фенотипом KIR2DL2/DL3⁻ и KIR2DL2/DL3⁺. Возможно это связано с лучшей пролиферативной активностью KIR2DL2/DL3⁺ клеток, что было показано на клональных культурах.

Введение гена каталитической субъединицы теломеразы может позволить преодолеть лимит Хейфлика и увеличить возможное количество делений клетки (Bodnar et al., 1998). Однако неограниченный пролиферативный потенциал не гарантирует увеличение пролиферативной активности клетки, а только позволяет бесконечно

удваивать хромосомы без потери функциональных участков генома. Модифицированные клетки продемонстрировали высокие уровни теломеразной активности. Однако это привело к увеличению продолжительности жизни генетически-модифицированных NK-клеток по сравнению с нетрансдуцированными клетками в среднем только в 2 раза. Такая низкая продолжительность жизни hTERT-NK-клеток может быть связано с неоптимальными условиями культивирования. Необходим дополнительный подбор условий культивирования модифицированных клеток, которые бы приводили к более значительному увеличению продолжительности жизни.

5 Выводы

1. Разработан эффективный способ получения клонов НК-клеток человека с использованием IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21.
2. С использованием разных моделей культивирования выявлено, что частота рестимуляции с помощью клеток K562-mbIL21 влияет на фенотип, функциональные характеристики, уровень экспансии и продолжительность жизни клонов, которая может достигать 14 недель.
3. Установлено, что эффективность образования клонов зависит от стадии дифференцировки НК-клеток с закономерностью: $CD56^{bright} > CD56^{dim}CD57^{-} > CD57^{+}$. Наиболее долгоживущие клоны могут быть получены из неактивированных НК-клеток с фенотипом $CD56^{dim}CD57^{-}HLA-DR^{-}$.
4. Установлено, что экспрессия рецептора NKG2A может возникать *de novo* в потомстве изначально NKG2A-негативных НК-клеток, а маркер CD57 может полностью исчезать с клеточной поверхности при культивировании в условиях стимуляции IL-2/K562-mbIL21.
5. Выявлено, что менее дифференцированные НК-клетки $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}$, негативные по CD57, наиболее чувствительны к ретровирусной трансдукции. Таким образом, эффективность ретровирусной генетической модификации зависит от степени дифференцировки НК-клеток.
6. С помощью ретровирусной трансдукции в НК-клетки включен ген hTERT, и доказано, что модифицированные клетки обладают повышенной активностью теломеразы. Продолжительность жизни культур трансдуцированных НК-клеток значительно увеличивалась, по сравнению с культурами немодифицированных клеток, и превышала 1 месяц.

6 Благодарности

Я выражаю огромную благодарность моему научному руководителю и наставнику Коваленко Елене Ивановне не только за замечательную организацию научного процесса, но и за обучение искусству письма и грамотного изложения материала. Я хотела бы сказать отдельное спасибо Барсову Евгению за предоставленные конструкции и помощь в освоении методик по модификации клеток, и Вильяму Телфорду (William Telford) за постоянную помощь по наладке оборудования, с помощью которого у нас была возможность проводить эксперименты по клонированию клеток. Также я хотела бы поблагодарить Каневского Леонида и Ерохину Софью за помощь в подготовке экспериментов, а весь коллектив лаборатории клеточных взаимодействий за постоянную мотивацию и моральную поддержку.

7 Список сокращений

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»;

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity – антителозависимая клеточная цитотоксичность;

ALL – acute lymphocytic leukemia – острый лимфоидный лейкоз;

AML – acute myeloid leukemia – острый миелоидный лейкоз;

CAR – chimeric antigen receptor – химерный антигенный рецептор;

CLP – common lymphoid progenitor – общий лимфоидный предшественник;

CMV – cytomegalovirus – цитомегаловирус;

cNK – conventional NK cell – конвенциональные или циркулирующие NK-клетки;

DC – dendritic cell – дендритная клетка;

HCMV – human cytomegalovirus – цитомегаловирус человека;

HLA – human leukocyte antigen – человеческий лейкоцитарный антиген;

HPC – hematopoietic progenitor cell – гематопоэтическая клетка-предшественник;

hTERT – Human telomerase reverse transcriptase – ген каталитической субъединицы теломеразы;

IFN- γ – Interferon Gamma – γ -интерферон;

Ig – immunoglobulin – иммуноглобулин;

IL – interleukin – интерлейкин;

ILC – Innate lymphoid cell – группа 1 лимфоидных клеток врожденного иммунитета;

ILC – innate lymphoid cells – лимфоидные клетки врожденного иммунитета;

iNK – immature NK cell – незрелая NK-клетка;

ITAM – immunoreceptor tyrosine-based activation motif – активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина;

ITIM – immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif – ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина;

KIR – killer-cell immunoglobulin-like receptor – иммуноглобулин-подобный рецептор киллерных клеток;

LTi клетки – группа лимфоидных ткане-индуцируемых клеток;

mb – membrane-bound – мембраносвязанный;

MHC – major histocompatibility complex class – главный комплекс гистосовместимости;

MM – multiple myeloma – множественная миелома;

mNK – mature NK cell – зрелая NK-клетка;

NCR – natural cytotoxicity receptor – рецептор натуральной цитотоксичности;

NKG2 – natural killer group 2 – группа лектин-подобных рецепторов;
NKP – NK lineage restricted progenitor – предшественник НК-клеток;
НК-клетки – natural killer cells – натуральные киллеры;
PBMC – peripheral blood mononuclear cell – периферические мононуклеары;
TNF – tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли;
Treg – regulatory T cell – регуляторные Т-клетки;
trNK – tissue-resident NK cell – ткане-резидентные НК-клетки;

8 Литература

1. Демидов, Л.В., Михайлова, И.Н., Синельников, И.Е., Шубина, И.Ж., Черемушкин, Е.А., Виршке, Э.Р., Петенко, Н.Н., Огородникова, Е.В., Арустамян, Л.Ю., Киселевский, М.В., 2005. Проблемы клинического применения ИЛ-2/ЛАК-терапии. *Российский биотерапевтический журнал* 4, 29–37.
2. Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.* 9, 1869. doi:10.3389/fimmu.2018.01869
3. Alici, E., Sutlu, T., Sirac Dilber, M., 2009. Retroviral gene transfer into primary human natural killer cells. *Methods Mol. Biol.* 506, 127–37. doi:10.1007/978-1-59745-409-4_10
4. Alter, G., Malenfant, J.M., Altfeld, M., 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 294, 15–22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
5. Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., Vivier, E., 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331–342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013
6. Antony, G.K., Dudek, A.Z., 2010. Interleukin 2 in cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 17, 3297–302.
7. Aranami, T., Miyake, S., Yamamura, T., 2006. Differential Expression of CD11c by Peripheral Blood NK Cells Reflects Temporal Activity of Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* 177, 5659–5667. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5659
8. Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D.G., Mandelboim, O., 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* 6, 515–523. doi:10.1038/ni1190
9. Baetu, T.M., Hiscott, J., 2002. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13, 199–207.
10. Baggio, L., Laureano, Á.M., Silla, L.M. da R., Lee, D.A., 2017. Natural killer cell adoptive immunotherapy: Coming of age. *Clin. Immunol.* 177, 3–11. doi:10.1016/j.clim.2016.02.003
11. Barsov, E. V., 2011. Immortalization of human and rhesus macaque primary antigen-specific T cells by retrovirally transduced telomerase reverse transcriptase. *Curr. Protoc. Immunol.* 1–20. doi:10.1002/0471142735.im0721bs95
12. Baum, C., Fehse, B., 2003. Mutagenesis by retroviral transgene insertion: risk assessment and potential alternatives. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5, 458–62.
13. Benlahrech, A., Donaghy, H., Rozis, G., Goodier, M., Klavinskis, L., Gotch, F., Patterson, S., 2009. Human NK Cell up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon γ secretion and cytotoxic activity by plasmacytoid dendritic cells is regulated through overlapping but different pathways. *Sensors (Basel)*. 9, 386–403. doi:10.3390/s90100386
14. Berg, M., Lundqvist, A., McCoy, P., Samsel, L., Fan, Y., Tawab, A., Childs, R., Childs, R., 2009. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytherapy* 11, 341–55. doi:10.1080/14653240902807034

15. Beziat, V., Hervier, B., Achour, A., Boutolleau, D., Marfain-Koka, A., Vieillard, V., 2011. Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells. *Blood* 117, 4394–4396. doi:10.1182/blood-2010-11-319194
16. Beziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Bjorklund, A.T., Retiere, C., Sverremark-Ekstrom, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D.A., Trowsdale, J., Michaelsson, J., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., 2013. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121, 2678–2688. doi:10.1182/blood-2012-10-459545
17. Bilal, M.Y., Vacaflares, A., Houtman, J.C., 2015. Optimization of methods for the genetic modification of human T cells. *Immunol. Cell Biol.* 93, 896–908. doi:10.1038/icb.2015.59
18. Billot, K., Parizot, C., Arrouss, I., Mazier, D., Debre, P., Rogner, U.C., Rebollo, A., 2010. Differential aiolos expression in human hematopoietic subpopulations. *Leuk. Res.* 34, 289–93. doi:10.1016/j.leukres.2009.05.016
19. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., 1999. NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 189–220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189
20. Bjorkstrom, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Bjorklund, A.T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M.E., Guzman, C.A., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853–3864. doi:10.1182/blood-2010-04-281675
21. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W.E., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–52.
22. Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., Bordignon, C., 1997. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719–24.
23. Boulenouar, S., Michelet, X., Duquette, D., Alvarez, D., Hogan, A.E., Dold, C., O'Connor, D., Stutte, S., Tavakkoli, A., Winters, D., Exley, M.A., O'Shea, D., Brenner, M.B., von Andrian, U., Lynch, L., 2017. Adipose Type One Innate Lymphoid Cells Regulate Macrophage Homeostasis through Targeted Cytotoxicity. *Immunity* 46, 273–286. doi:10.1016/j.immuni.2017.01.008
24. Brady, J., Carotta, S., Thong, R.P.L., Chan, C.J., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Nutt, S.L., 2010. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J. Immunol.* 185, 6679–6688. doi:10.4049/jimmunol.0903354
25. Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D., 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503. doi:10.1084/jem.20090681
26. Brehm, C., Huenecke, S., Quaiser, A., Esser, R., Bremm, M., Kloess, S., Soerensen, J., Kreyenberg, H., Seidl, C., Becker, P.S.A., Mühl, H., Klingebiel, T., Bader, P., Passweg, J.R., Schwabe, D., Koehl, U., 2011. IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study. *PLoS One* 6, e27351. doi:10.1371/journal.pone.0027351

27. Brodin, P., Kärre, K., Höglund, P., 2009. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* 30, 143–149. doi:10.1016/j.it.2009.01.006
28. Bryceson, Yenan T., March, M.E., Ljunggren, H.-G., Long, E.O., 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214, 73–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
29. Bryceson, Y T, March, M.E., Ljunggren, H.-G., Long, E.O., 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159–166. doi:10.1182/blood-2005-04-1351
30. Burga, R.A., Nguyen, T., Zulovich, J., Madonna, S., Ylisastigui, L., Fernandes, R., Yvon, E., 2016. Improving efficacy of cancer immunotherapy by genetic modification of natural killer cells. *Cytotherapy* 18, 1410–1421. doi:10.1016/j.jcyt.2016.05.018
31. Burt, B.M., Plitas, G., Nguyen, H.M., Stableford, J.A., Bamboat, Z.M., Dematteo, R.P., 2008. Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Hum. Immunol.* 69, 469–74. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.009
32. Byrd, A., Hoffmann, S.C., Jarahian, M., Momburg, F., Watzl, C., 2007. Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44. *PLoS One* 2, e1339. doi:10.1371/journal.pone.0001339
33. Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T.J., Levine, H., Smith, K.A., Ritz, J., 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J. Exp. Med.* 171, 1509–26.
34. Campbell, K.S., Hasegawa, J., 2013. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 536–44. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006
35. Carlens, S., Gilljam, M., Chambers, B.J., Aschan, J., Guven, H., Ljunggren, H.G., Christensson, B., Dilber, M.S., 2001. A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3-CD56+ natural killer cells. *Hum. Immunol.* 62, 1092–8.
36. Carlsten, M., Childs, R.W., 2015. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front. Immunol.* 6, 266. doi:10.3389/fimmu.2015.00266
37. Carr, W., 2002. NK Cell-Mediated Lysis of Autologous HCMV-Infected Skin Fibroblasts Is Highly Variable among NK Cell Clones and Polyclonal NK Cell Lines. *Clin. Immunol.* 105, 126–140. doi:10.1006/clim.2002.5273
38. Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M.A., 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 180, 1395–403.
39. Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., Watier, H., 2002. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754–8.
40. Cella, M., Colonna, M., 2000. Cloning human natural killer cells. *Methods Mol Biol* 121, 1–4. doi:10.1385/1-59259-044-6:1
41. Chan, A., Hong, D.-L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A.D., Buckley, C.D., McMichael, A., Enver, T., Bowness, P., 2007. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J. Immunol.* 179, 89–94.

42. Chang, Y.-H., Connolly, J., Shimasaki, N., Mimura, K., Kono, K., Campana, D., 2013. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances Natural Killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res.* 73, 1777–1786. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3558
43. Chaput, N., Flament, C., Locher, C., Desbois, M., Rey, A., Rusakiewicz, S., Poirier-Colame, V., Pautier, P., Le Cesne, A., Soria, J.-C., Paci, A., Rosenzweig, M., Klatzmann, D., Eggermont, A., Robert, C., Zitvogel, L., 2013. Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2: HLA-DR(+) NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology* 2, e23080. doi:10.4161/onci.23080
44. Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M., Vivier, E., 2018. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 671–688. doi:10.1038/s41577-018-0061-z
45. Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., Kabelitz, D., 2013. Generation of Soluble NKG2D Ligands: Proteolytic Cleavage, Exosome Secretion and Functional Implications. *Scand. J. Immunol.* 78, 120–129. doi:10.1111/sji.12072
46. Cho, D., Shook, D.R., Shimasaki, N., Chang, Y.-H., Fujisaki, H., Campana, D., 2010. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 16, 3901–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0735
47. Cichocki, F., Cooley, S., Davis, Z., DeFor, T.E., Schlums, H., Zhang, B., Brunstein, C.G., Blazar, B.R., Wagner, J., Diamond, D.J., Verneris, M.R., Bryceson, Y.T., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2016. CD56dimCD57+NKG2C+ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia* 30, 456–463. doi:10.1038/leu.2015.260
48. Conlon, K.C., Lugli, E., Welles, H.C., Rosenberg, S.A., Fojo, A.T., Morris, J.C., Fleisher, T.A., Dubois, S.P., Perera, L.P., Stewart, D.M., Goldman, C.K., Bryant, B.R., Decker, J.M., Chen, J., Worthy, T.A., Figg, W.D., Peer, C.J., Sneller, M.C., Lane, H.C., Yovandich, J.L., Creekmore, S.P., Roederer, M., Waldmann, T.A., 2015. Redistribution, Hyperproliferation, Activation of Natural Killer Cells and CD8 T Cells, and Cytokine Production During First-in-Human Clinical Trial of Recombinant Human Interleukin-15 in Patients With Cancer. *J. Clin. Oncol.* 33, 74–82. doi:10.1200/JCO.2014.57.3329
49. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., Caligiuri, M.A., 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–51. doi:10.1182/blood.V97.10.3146
50. Cortez, V.S., Fuchs, A., Cella, M., Gilfillan, S., Colonna, M., 2014. Cutting edge: Salivary gland NK cells develop independently of Nfil3 in steady-state. *J. Immunol.* 192, 4487–91. doi:10.4049/jimmunol.1303469
51. Croy, B.A., van den Heuvel, M.J., Borzychowski, A.M., Tayade, C., 2006. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. *Immunol. Rev.* 214, 161–85. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00447.x
52. Davies, F.E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y.T., Lin, B., Podar, K., Gupta, D., Chauhan, D., Treon, S.P., Richardson, P.G., Schlossman, R.L., Morgan, G.J., Muller, G.W., Stirling, D.I., Anderson, K.C., 2001. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* 98, 210–6.
53. De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., Moretta, L., 2011. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 728–32. doi:10.1073/pnas.1012356108

54. De Meyer, S.F., Vanhoorelbeke, K., Chuah, M.K., Pareyn, I., Gillijns, V., Hebbel, R.P., Collen, D., Deckmyn, H., VandenDriessche, T., 2006. Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor. *Blood* 107, 4728–4736. doi:10.1182/blood-2005-09-3605
55. de Rham, C., Ferrari-Lacraz, S., Jendly, S., Schneiter, G., Dayer, J.-M., Villard, J., 2007. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res. Ther.* 9, R125. doi:10.1186/ar2336
56. Denman, C.J., Senyukov, V. V., Somanchi, S.S., Phatarpekar, P. V., Kopp, L.M., Johnson, J.L., Singh, H., Hurton, L., Maiti, S.N., Huls, M.H., Champlin, R.E., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., 2012. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 7, e30264. doi:10.1371/journal.pone.0030264
57. Di Stasi, A., Tey, S.-K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A.G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C.R., Savoldo, B., Gee, A.P., Schindler, J., Krance, R.A., Heslop, H.E., Spencer, D.M., Rooney, C.M., Brenner, M.K., 2011. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med.* 365, 1673–1683. doi:10.1056/NEJMoA1106152
58. Diefenbach, A., Colonna, M., Koyasu, S., 2014. Development, Differentiation, and Diversity of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 41, 354–365. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.005
59. Dominguez, E., Lowdell, M.W., Perez-Cruz, I., Madrigal, A., Cohen, S.B., 1997. Natural killer cell function is altered by freezing in DMSO. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 175S.
60. Domogala, A., Madrigal, J.A., Saudemont, A., 2016. Cryopreservation has no effect on function of natural killer cells differentiated in vitro from umbilical cord blood CD34 + cells. *Cytotherapy* 18, 754–759. doi:10.1016/j.jcyt.2016.02.008
61. Dulphy, N., Haas, P., Busson, M., Belhadj, S., Peffault de Latour, R., Robin, M., Carmagnat, M., Loiseau, P., Tamouza, R., Scieux, C., Rabian, C., Di Santo, J.P., Charron, D., Janin, A., Socié, G., Toubert, A., 2008. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol.* 181, 2227–37.
62. Dybkaer, K., Iqbal, J., Zhou, G., Geng, H., Xiao, L., Schmitz, A., d'Amore, F., Chan, W.C., 2007. Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways. *BMC Genomics* 8, 230. doi:10.1186/1471-2164-8-230
63. E. Liu, Y. Tong, G. Dotti, B. Savoldo, M. Muftuoglu, K. Kondo, M. Mukherjee, J.S. Orange, C. Sobieski, A.A., 2016. Cord blood derived natural killer cells engineered with a chimeric antigen receptor targeting CD19 and expressing IL-15 have long term persistence and exert potent anti-leukemia activity. *Blood* 126, 3091.
64. El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., Morgan, G.J., Cook, G.P., 2007. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* 67, 8444–8449. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4230
65. El Sobky, S.A., El-Ekiaby, N.M., Mekky, R.Y., Elemam, N.M., Mohey Eldin, M.A., El-sayed, M., Esmat, G., Abdelaziz, A.I., 2016. Contradicting roles of miR-182 in both NK cells and their host target hepatocytes in HCV. *Immunol. Lett.* 169, 52–60. doi:10.1016/j.imlet.2015.10.013

66. Eriksson, M., Leitz, G., Fällman, E., Axner, O., Ryan, J.C., Nakamura, M.C., Sentman, C.L., 1999. Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J. Exp. Med.* 190, 1005–12.
67. Erokhina, S.A., Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2018. HLA-DR+ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity. *Immunol. Cell Biol.* 96, 212–228. doi:10.1111/imcb.1032
68. Evans, J Henry, Horowitz, A., Mehrabi, M., Wise, E.L., Pease, J.E., Riley, E.M., Davis, D.M., 2011. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur. J. Immunol.* 41, 1924–33. doi:10.1002/eji.201041180
69. Evans, J H, Horowitz, A., Mehrabi, M., Wise, E.L., Pease, J.E., Riley, E.M., Davis, D.M., 2011a. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur J Immunol* 41, 1924–1933. doi:10.1002/eji.201041180
70. Farag, S.S., Fehniger, T.A., Ruggeri, L., Velardi, A., Caligiuri, M.A., 2002. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100, 1935–47. doi:10.1182/blood-2002-02-0350
71. Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., Costello, R.T., 2007. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109, 323–30. doi:10.1182/blood-2005-08-027979
72. Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., Bryceson, Y.T., 2010. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176. doi:10.1182/blood-2009-08-238469
73. Fehniger, T.A., Bluman, E.M., Porter, M.M., Mrózek, E., Cooper, M.A., VanDeusen, J.B., Frankel, S.R., Stock, W., Caligiuri, M.A., 2000. Potential mechanisms of human natural killer cell expansion in vivo during low-dose IL-2 therapy. *J. Clin. Invest.* 106, 117–24. doi:10.1172/JCI6218
74. Ferlazzo, G., Morandi, B., D’Agostino, A., Meazza, R., Melioli, G., Moretta, A., Moretta, L., 2003. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 306–13. doi:10.1002/immu.200310004
75. Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., Münz, C., 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 172, 1455–62.
76. Ferlazzo, G., Tsang, M.L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R.M., Münz, C., 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195, 343–51. doi:10.1084/jem.20011149
77. Feuchtinger, T., Pfeiffer, M., Pfaffle, a, Teltschik, H.-M., Wernet, D., Schumm, M., Lotfi, R., Handgretinger, R., Lang, P., 2009. Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones. *Bone Marrow Transplant.* 43, 875–81. doi:10.1038/bmt.2008.398

78. Firth, M.A., Madera, S., Beaulieu, A.M., Gasteiger, G., Castillo, E.F., Schluns, K.S., Kubo, M., Rothman, P.B., Vivier, E., Sun, J.C., 2013. Nfil3-independent lineage maintenance and antiviral response of natural killer cells. *J. Exp. Med.* 210, 2981–90. doi:10.1084/jem.20130417
79. Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Setti, M., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., De Maria, A., 2004a. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur. J. Immunol.* 34, 2313–21. doi:10.1002/eji.200425251
80. Freud, A.G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Nuovo, G.J., Hughes, T.L., Marburger, T.B., Sung, J., Baiocchi, R.A., Guimond, M., Caligiuri, M.A., 2005. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22, 295–304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013
81. Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., Caligiuri, M.A., 2006. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 203, 1033–43. doi:10.1084/jem.20052507
82. Freud, A.G., Yu, J., Caligiuri, M.A., 2014. Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin. Immunol.* 26, 132–137. doi:10.1016/j.smim.2014.02.008
83. Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., Colonna, M., 2013. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. *Immunity* 38, 769–81. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.010
84. Fujisaki, H., Kakuda, H., Imai, C., Mullighan, C., Campana, D., 2009. Replicative Potential of Human Natural Killer Cells. *Br J Haematol.* 145, 606–613. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07667.x.REPLICATIVE
85. Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W.H., Campana, D., 2009. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res.* 69, 4010–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3712
86. Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W.H., Campana, D., 2009. Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell Therapy. *Cancer Res.* 69, 4010–4017. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3712
87. Galea-Lauri, J., Darling, D., Gan, S.U., Krivochchapov, L., Kuiper, M., Gäken, J., Souberbielle, B., Farzaneh, F., 1999. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J. Immunol.* 163, 62–70.
88. Gascoyne, D.M., Long, E., Veiga-Fernandes, H., de Boer, J., Williams, O., Seddon, B., Coles, M., Kioussis, D., Brady, H.J.M., 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat. Immunol.* 10, 1118–1124. doi:10.1038/ni.1787
89. Gasser, S., Raulet, D.H., 2006. Activation and self-tolerance of natural killer cells. *Immunol. Rev.* 214, 130–142. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00460.x
90. Geary, C.D., Sun, J.C., 2017. Memory responses of natural killer cells. *Semin. Immunol.* 31, 11–19. doi:10.1016/j.smim.2017.08.012
91. Geiger, T.L., Sun, J.C., 2016. Development and maturation of natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* 39, 82–9. doi:10.1016/j.coi.2016.01.007

92. Geller, M.A., Miller, J.S., 2011. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 3, 1445–59. doi:10.2217/imt.11.131
93. Gineau, L., Cognet, C., Kara, N., Lach, F.P., Dunne, J., Veturi, U., Picard, C., Trouillet, C., Eidenschenk, C., Aoufouchi, S., Alcaïs, A., Smith, O., Geissmann, F., Feighery, C., Abel, L., Smogorzewska, A., Stillman, B., Vivier, E., Casanova, J.-L., Jouanguy, E., 2012. Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J. Clin. Invest.* 122, 821–32. doi:10.1172/JCI61014
94. Girart, M. V, Fuertes, M.B., Domaica, C.I., Rossi, L.E., Zwirner, N.W., 2007. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J. Immunol.* 179, 3472–9.
95. Glasner, A., Ghadially, H., Gur, C., Stanietzky, N., Tsukerman, P., Enk, J., Mandelboim, O., 2012. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J. Immunol.* 188, 2509–15. doi:10.4049/jimmunol.1102461
96. Gong, W., Xiao, W., Hu, M., Weng, X., Qian, L., Pan, X., Ji, M., 2010. Ex vivo expansion of natural killer cells with high cytotoxicity by K562 cells modified to co-express major histocompatibility complex class I chain-related protein A, 4-1BB ligand, and interleukin-15. *Tissue Antigens* 76, 467–75. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01535.x
97. Gordon, S.M., Chaix, J., Rupp, L.J., Wu, J., Madera, S., Sun, J.C., Lindsten, T., Reiner, S.L., 2012. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 36, 55–67. doi:10.1016/j.immuni.2011.11.016
98. Granzin, M., Stojanovic, A., Miller, M., Childs, R., Huppert, V., Cerwenka, A., 2016. Highly efficient IL-21 and feeder cell-driven ex vivo expansion of human NK cells with therapeutic activity in a xenograft mouse model of melanoma. *Oncoimmunology* 5, e1219007. doi:10.1080/2162402X.2016.1219007
99. Gras Navarro, A., Björklund, A.T., Chekenya, M., 2015. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. *Front. Immunol.* 6, 202. doi:10.3389/fimmu.2015.00202
100. Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N., Lopez-Botet, M., 2004. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* 104, 3664–3671. doi:10.1182/blood-2004-05-2058
101. Guven, H., Konstantinidis, K. V, Alici, E., Aints, A., Abedi-Valugerdi, M., Christensson, B., Ljunggren, H.-G., Dilber, M.S., 2005. Efficient gene transfer into primary human natural killer cells by retroviral transduction. *Exp. Hematol.* 33, 1320–8. doi:10.1016/j.exphem.2005.07.006
102. Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., Allshire, R.C., 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866–868. doi:10.1038/346866a0
103. Hayakawa, K., Salmeron, M.A., Kornbluth, J., Bucana, C., Itoh, K., 1991. The role of IL-4 in proliferation and differentiation of human natural killer cells. Study of an IL-4-dependent versus an IL-2-dependent natural killer cell clone. *J. Immunol.* 146, 2453–60.
104. Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
105. Höglund, P., Brodin, P., 2010. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 724–734. doi:10.1038/nri2835

106. Holubova, M., Miklikova, M., Leba, M., Georgiev, D., Jindra, P., Caprnda, M., Ciccocioppo, R., Kruzliak, P., Lysak, D., 2016. Cryopreserved NK cells in the treatment of haematological malignancies: preclinical study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 2561–2567. doi:10.1007/s00432-016-2247-8
107. Horowitz, A., Strauss-Albee, D.M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O.C., Dekker, C.L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G.E., Davis, M.M., Norman, P.J., Guethlein, L.A., Desai, M., Parham, P., Blish, C.A., 2013. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci. Transl. Med.* 5, 208ra145. doi:10.1126/scitranslmed.3006702
108. Horton, N.C., Mathew, P.A., 2015. NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Front. Immunol.* 6, 31. doi:10.3389/fimmu.2015.00031
109. Hwang, I., Zhang, T., Scott, J.M., Kim, A.R., Lee, T., Kakarla, T., Kim, A., Sunwoo, J.B., Kim, S., 2012. Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRgamma and specialized for antibody-dependent immune functions. *Int Immunol* 24, 793–802. doi:10.1093/intimm/dxs080
110. Imai, C., Iwamoto, S., Campana, D., 2005. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106, 376–83. doi:10.1182/blood-2004-12-4797
111. Imamura, M., Shook, D., Kamiya, T., Shimasaki, N., Chai, S.M.H., Coustan-Smith, E., Imai, C., Campana, D., 2014. Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15. *Blood* 124, 1081–1088. doi:10.1182/blood-2014-02
112. Iwaszko, M., Bogunia-Kubik, K., 2011. Clinical Significance of the HLA-E and CD94/NKG2 Interaction. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 59, 353–367. doi:10.1007/s00005-011-0137-y
113. Jenne, C.N., Enders, A., Rivera, R., Watson, S.R., Bankovich, A.J., Pereira, J.P., Xu, Y., Roots, C.M., Beilke, J.N., Banerjee, A., Reiner, S.L., Miller, S.A., Weinmann, A.S., Goodnow, C.C., Lanier, L.L., Cyster, J.G., Chun, J., 2009. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 206, 2469–81. doi:10.1084/jem.20090525
114. Jiang, B., Wu, X., Li, X.-N., Yang, X., Zhou, Y., Yan, H., Wei, A.-H., Yan, W., 2014. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21. *Cell. Immunol.* 290, 10–20. doi:10.1016/j.cellimm.2014.04.011
115. Jiang, H., Zhang, W., Shang, P., Zhang, H., Fu, W., Ye, F., Zeng, T., Huang, H., Zhang, X., Sun, W., Man-Yuen Sze, D., Yi, Q., Hou, J., 2014. Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol. Oncol.* 8, 297–310. doi:10.1016/j.molonc.2013.12.001
116. Jin, F., Lin, H., Gao, S., Hu, Z., Zuo, S., Sun, L., Jin, C., Li, W., Yang, Y., 2016. The anti-tumor role of NK cells in vivo pre-activated and re-stimulated by interleukins in acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 7, 79187–79202. doi:10.18632/oncotarget.13007
117. Kailayangiri, S., Altvater, B., Spurny, C., Jamitzky, S., Schelhaas, S., Jacobs, A.H., Wiek, C., Roellecke, K., Hanenberg, H., Hartmann, W., Wiendl, H., Pankratz, S., Meltzer, J., Farwick, N., Greune, L., Fluegge, M., Rossig, C., 2017. Targeting Ewing sarcoma with activated and GD2-specific chimeric antigen receptor-engineered human NK cells induces

- upregulation of immune-inhibitory HLA-G. *Oncoimmunology* 6, e1250050. doi:10.1080/2162402X.2016.1250050
118. Kamizono, S., Duncan, G.S., Seidel, M.G., Morimoto, A., Hamada, K., Grosveld, G., Akashi, K., Lind, E.F., Haight, J.P., Ohashi, P.S., Look, A.T., Mak, T.W., 2009. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206, 2977–86. doi:10.1084/jem.20092176
 119. Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2013. Lipopolysaccharide induces IFN- γ production in human NK cells. *Front. Immunol.* 4, 11. doi:10.3389/fimmu.2013.00011
 120. Kasaian, M.T., Whitters, M.J., Carter, L.L., Lowe, L.D., Jussif, J.M., Deng, B., Johnson, K.A., Witek, J.S., Senices, M., Konz, R.F., Wurster, A.L., Donaldson, D.D., Collins, M., Young, D.A., Grusby, M.J., 2002. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* 16, 559–69.
 121. Kellner, J.N., Cruz, C.R., Bollard, C.M., Yvon, E.S., 2016. Gene Modification of Human Natural Killer Cells Using a Retroviral Vector. Springer Science+Business Media New York 2016, pp. 203–213. doi:10.1007/978-1-4939-3684-7_17
 122. Kikuchi-Maki, A., Catina, T.L., Campbell, K.S., 2005. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J. Immunol.* 174, 3859–63.
 123. Klingemann, H., Boissel, L., Toneguzzo, F., 2016. Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front. Immunol.* 7, 91. doi:10.3389/fimmu.2016.00091
 124. Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T.A., Tagaya, Y., 2005. Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* 105, 721–7. doi:10.1182/blood-2003-12-4187
 125. Konjević, G., Vuletić, A., Mirjačić Martinović, K., 2016. Natural killer cell receptors: alterations and therapeutic targeting in malignancies. *Immunol. Res.* 64, 25–35. doi:10.1007/s12026-015-8695-4
 126. Konnikova, L., Simeone, M.C., Kruger, M.M., Kotecki, M., Cochran, B.H., 2005. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res.* 65, 6516–20. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0924
 127. Kovalenko, E.I., Streltsova, M.A., 2016. Adaptive Features of Natural Killer Cells – Lymphocytes of Innate Immunity. *Russ. J. Bioorganic Chem.* 42, 649–667. doi:10.7868/S0132342316060063
 128. Kovalenko, E.I., Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Erokhina, S.A., Telford, W.G., 2017. Identification of Human Memory-Like NK Cells. *Curr. Protoc. Cytom.* 79, 9.50.1–9.50.11. doi:10.1002/cpcy.13
 129. Kremer, V., Ligtenberg, M., Zendejdel, R., Seitz, C., Duivenvoorden, A., Wennerberg, E., Colón, E., Scherman-Plogell, A.-H., Lundqvist, A., 2017. Genetic engineering of human NK cells to express CXCR2 improves migration to renal cell carcinoma. *J. Immunother. cancer* 5, 73. doi:10.1186/s40425-017-0275-9

130. Krueger, P.D., Narayanan, S., Surette, F.A., Brown, M.G., Sung, S.-S.J., Hahn, Y.S., 2017. Murine liver-resident group 1 innate lymphoid cells regulate optimal priming of anti-viral CD8⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 101, 329–338. doi:10.1189/jlb.3A0516-225R
131. Lanier, L.L., 2005. NK CELL RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 225–274. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526
132. Lanier, L.L., 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 308–14. doi:10.1016/S0952-7915(03)00039-6
133. Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H., 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391, 703–707. doi:10.1038/35642
134. Lapteva, N., Duret, A.G., Sun, J., Rollins, L.A., Huye, L.L., Fang, J., Dandekar, V., Mei, Z., Jackson, K., Vera, J., Ando, J., Ngo, M.C., Coustan-Smith, E., Campana, D., Szmania, S., Garg, T., Moreno-Bost, A., Vanrhee, F., Gee, A.P., Rooney, C.M., 2012. Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 14, 1131–43. doi:10.3109/14653249.2012.700767
135. Lapteva, N., Parihar, R., Rollins, L.A., Gee, A.P., Rooney, C.M., 2016. Large-Scale Culture and Genetic Modification of Human Natural Killer Cells for Cellular Therapy. *Methods Mol. Biol.* 1441, 195–202. doi:10.1007/978-1-4939-3684-7_16
136. Leboeuf, C., Maily, L., Wu, T., Bour, G., Durand, S., Brignon, N., Ferrand, C., Borg, C., Tiberghien, P., Thimme, R., Pessaux, P., Marescaux, J., Baumert, T.F., Robinet, E., 2014. In vivo proof of concept of adoptive immunotherapy for hepatocellular carcinoma using allogeneic suicide gene-modified killer cells. *Mol. Ther.* 22, 634–644. doi:10.1038/mt.2013.277
137. Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J.M., Kamimura, Y., Lanier, L.L., Kim, S., 2015. Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity* 42, 431–442. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.013
138. Leivas, A., Perez-Martinez, A., Blanchard, M.J., Martín-Clavero, E., Fernández, L., Lahuerta, J.J., Martínez-Lopez, J., 2016. Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology* 5, e1250051. doi:10.1080/2162402X.2016.1250051
139. Leong, J.W., Chase, J.M., Romee, R., Schneider, S.E., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., Fehniger, T.A., 2014. Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 Induces CD25 and a Functional High-Affinity IL-2 Receptor on Human Cytokine-Induced Memory-like Natural Killer Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 20, 463–473. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.006
140. Leung, W., Iyengar, R., Triplett, B., Turner, V., Behm, F.G., Holladay, M.S., Houston, J., Handgretinger, R., 2005. Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol* 174, 6540–6545.
141. Levy, E.R., Carlsten, M., Childs, R.W., 2016. mRNA transfection to improve NK Cell homing to tumors. *Methods Mol. Biol.* 1441, 231–240. doi:10.1007/978-1-4939-3684-7_19
142. Li, L., Liu, L.N., Feller, S., Allen, C., Shivakumar, R., Fratantoni, J., Wolfraim, L.A., Fujisaki, H., Campana, D., Chopas, N., Dzekunov, S., Peshwa, M., 2010. Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory-compliant non-viral method. *Cancer Gene Ther.* 17, 147–54. doi:10.1038/cgt.2009.61

143. Li, Q., Ye, L.-J., Ren, H.-L., Huyan, T., Li, J., Shi, J.-L., Huang, Q.-S., 2015. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology* 220, 876–888. doi:10.1016/j.imbio.2015.01.009
144. Lichtfuss, G.F., Cheng, W.-J., Farsakoglu, Y., Paukovics, G., Rajasuriar, R., Velayudham, P., Kramski, M., Hearps, A.C., Cameron, P.U., Lewin, S.R., Crowe, S.M., Jaworowski, A., 2012a. Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation. *J. Immunol.* 189, 1491–9. doi:10.4049/jimmunol.1200458
145. Lim, D.-P., Jang, Y.-Y., Kim, S., Koh, S.S., Lee, J.-J., Kim, J.-S., Thi Phan, M.-T., Shin, D.-J., Shin, M.-G., Lee, S.-H., Yoon, M., Kim, S.-K., Yoon, J.-H., Park, M.-H., Cho, D., 2014. Effect of exposure to interleukin-21 at various time points on human natural killer cell culture. *Cytotherapy* 16, 1419–30. doi:10.1016/j.jcyt.2014.04.008
146. Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., Cech, T.R., 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561–7.
147. Litwin, V., Gumperz, J., Parham, P., Phillips, J.H., Lanier, L.L., 1993. Specificity of HLA class I antigen recognition by human NK clones: evidence for clonal heterogeneity, protection by self and non-self alleles, and influence of the target cell type. *J. Exp. Med.* 178, 1321–36.
148. Liu, H.-S., Jan, M.-S., Chou, C.-K., Chen, P.-H., Ke, N.-J., 1999. Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 712–717. doi:10.1006/bbrc.1999.0954
149. Liu, L.L., Landskron, J., Ask, E.H., Enqvist, M., Sohlberg, E., Traherne, J.A., Hammer, Q., Goodridge, J.P., Larsson, S., Jayaraman, J., Oei, V.Y.S., Schaffer, M., Taskén, K., Ljunggren, H.-G., Romagnani, C., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., Béziat, V., 2016. Critical role of CD2 co-stimulation in adaptive natural killer cell responses revealed in NKG2C-deficient humans. *Cell Rep.* 15, 1088–1099. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.005
150. Liu, Y., Wu, H.-W., Sheard, M.A., Spoto, R., Somanchi, S.S., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., Seeger, R.C., 2013a. Growth and activation of natural killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy. *Clin. Cancer Res.* 19, 2132–43. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1243
151. Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., Rajagopalan, S., 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 227–58. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005
152. López-Larrea, C., Suárez-Alvarez, B., López-Soto, A., López-Vázquez, A., Gonzalez, S., 2008. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol. Med.* 14, 179–189. doi:10.1016/j.molmed.2008.02.004
153. Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Pandey, S., York, V.A., Arakawa-Hoyt, J., Pircher, H., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2010. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 116, 3865–74. doi:10.1182/blood-2010-04-282301
154. Lotzová, E., Savary, C.A., Herberman, R.B., 1987. Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leuk. Res.* 11, 1059–66.
155. Loyon, R., Picard, E., Mauvais, O., Queiroz, L., Mougey, V., Pallandre, J.-R., Galaine, J., Mercier-Letondal, P., Kellerman, G., Chaput, N., Wijdenes, J., Adotévi, O., Ferrand, C., Romero, P., Godet, Y., Borg, C., 2016. IL-21-induced MHC Class II+ NK Cells promote the

- expansion of human uncommitted CD4⁺ central memory T cells in a macrophage migration inhibitory factor-dependent manner. *J. Immunol.* 197, 85–96. doi:10.4049/jimmunol.1501147
156. Loza, M.J., Perussia, B., 2004. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56⁺ high stage and effector functions. *J. Immunol.* 172, 88–96.
157. Luetke-Eversloh, M., Hammer, Q., Durek, P., Nordstrom, K., Gasparoni, G., Pink, M., Hamann, A., Walter, J., Chang, H.D., Dong, J., Romagnani, C., 2014. Human cytomegalovirus drives epigenetic imprinting of the IFNG locus in NKG2Chi natural killer cells. *PLoS Pathog* 10, e1004441. doi:10.1371/journal.ppat.1004441
158. Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., Paris, L., Abalsamo, L., Colone, M., Molinari, A., Podo, F., Rivoltini, L., Ramoni, C., Fais, S., 2012. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *J. Immunol.* 189, 2833–2842. doi:10.4049/jimmunol.1101988
159. Lysakova-Devine, T., O’Farrelly, C., 2014. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J. Leukoc. Biol.* 96, 981–90. doi:10.1189/jlb.1RU0514-241R
160. Maasho, K., Marusina, A., Reynolds, N.M., Coligan, J.E., Borrego, F., 2004. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J. Immunol. Methods* 284, 133–40.
161. Mace, E.M., Hsu, A.P., Monaco-Shawver, L., Makedonas, G., Rosen, J.B., Dropulic, L., Cohen, J.I., Frenkel, E.P., Bagwell, J.C., Sullivan, J.L., Biron, C.A., Spalding, C., Zerbe, C.S., Uzel, G., Holland, S.M., Orange, J.S., 2013. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood* 121, 2669–77. doi:10.1182/blood-2012-09-453969
162. Maciejewski-Duval, A., Meuris, F., Bignon, A., Aknin, M.-L., Balabanian, K., Faivre, L., Pasquet, M., Barlogis, V., Fieschi, C., Bellanné-Chantelot, C., Donadieu, J., Schlecht-Louf, G., Marin-Esteban, V., Bachelier, F., 2016. Altered chemotactic response to CXCL12 in patients carrying GATA2 mutations. *J. Leukoc. Biol.* 99, 1065–76. doi:10.1189/jlb.5MA0815-388R
163. Male, V., Nisoli, I., Kostrzewski, T., Allan, D.S.J., Carlyle, J.R., Lord, G.M., Wack, A., Brady, H.J.M., 2014. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *J. Exp. Med.* 211, 635–642. doi:10.1084/jem.20132398
164. Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., Viens, P., Birnbaum, D., Bertucci, F., Moretta, A., Olive, D., 2011. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 121, 3609–22. doi:10.1172/JCI45816
165. Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., Porgador, A., 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055–1060. doi:10.1038/35059110
166. Mandelboim, O., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G., Strominger, J.L., 1996. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 184, 913–22.

167. Martín-Antonio, B., Suñe, G., Perez-Amill, L., Castella, M., Urbano-Ispizua, A., 2017. Natural Killer Cells: Angels and Devils for Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, E1868. doi:10.3390/ijms18091868
168. Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., Kreamsner, P.G., 2007. A Duffy Binding-Like Domain Is Involved in the NKp30-Mediated Recognition of *Plasmodium falciparum* – Parasitized Erythrocytes by Natural Killer Cells. *J. Infect. Dis.* 195, 1521–1531. doi:10.1086/515579
169. McClory, S., Hughes, T., Freud, A.G., Briercheck, E.L., Martin, C., Trimboli, A.J., Yu, J., Zhang, X., Leone, G., Nuovo, G., Caligiuri, M.A., 2012. Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil. *J. Clin. Invest.* 122, 1403–15. doi:10.1172/JCI46125
170. Melero, I., Johnston, J. V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., Chen, L., 1998. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell. Immunol.* 190, 167–172. doi:10.1006/cimm.1998.1396
171. Michaëlsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L.L., Kärre, K., Söderström, K., 2002. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J. Exp. Med.* 196, 1403–14.
172. Michel, T., Poli, A., Cuapio, A., Briquemont, B., Iserentant, G., Ollert, M., Zimmer, J., 2016. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J. Immunol.* 196, 2923–31. doi:10.4049/jimmunol.1502570
173. Micucci, F., Zingoni, A., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A., Galandrini, R., 2006. High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells. *Exp. Hematol.* 34, 1344–1352. doi:10.1016/j.exphem.2006.06.001
174. Miller, Jeffrey S, Soignier, Y., Panoskaltis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., Orchard, P.J., Blazar, B.R., Wagner, J.E., Slungaard, A., Weisdorf, D.J., Okazaki, I.J., McGlave, P.B., 2005. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051–7. doi:10.1182/blood-2004-07-2974
175. Mirjačić Martinović, K., Konjević, G., Babović, N., Inić, M., 2011. The Stage Dependent Changes in NK Cell Activity and the Expression of Activating and Inhibitory NK Cell Receptors in Melanoma Patients. *J. Surg. Res.* 171, 637–649. doi:10.1016/j.jss.2010.05.012
176. Mitsumoto, Y., Oka, S., Sakuma, H., Inazawa, J., Kawasaki, T., 2000. Cloning and chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Genomics* 65, 166–173. doi:10.1006/geno.2000.6152
177. Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., Parham, P., 2008. Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3. *J. Immunol.* 180, 3969–79.
178. Montaldo, E., Vacca, P., Vitale, C., Moretta, F., Locatelli, F., Mingari, M.C., Moretta, L., 2016. Human innate lymphoid cells. *Immunol. Lett.* 179, 2–8. doi:10.1016/j.imlet.2016.01.007
179. Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orenco, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E., 1990. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J. Exp. Med.* 172, 1589–98.

180. Moretta, L., 2010. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood* 116, 3689–3691. doi:10.1182/blood-2010-09-303057
181. Moroso, V., Famili, F., Papazian, N., Cupedo, T., van der Laan, L.J.W., Kazemier, G., Metselaar, H.J., Kwekkeboom, J., 2011. NK cells can generate from precursors in the adult human liver. *Eur. J. Immunol.* 41, 3340–3350. doi:10.1002/eji.201141760
182. Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., Wu, J.R., 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6622–6.
183. Müller, N., Michen, S., Tietze, S., Töpfer, K., Schulte, A., Lamszus, K., Schmitz, M., Schackert, G., Pastan, I., Temme, A., 2015. Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific Chimeric Antigen Receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting glioblastoma. *J. Immunother.* 38, 197–210.
184. Muntasell, A., Pupuleku, A., 2016. Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets.
185. Muntasell, A., Vilches, C., Angulo, A., López-Botet, M., 2013. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur. J. Immunol.* 43, 1133–41. doi:10.1002/eji.201243117
186. Nagashima, S., Mailliard, R., Kashii, Y., Reichert, T.E., Herberman, R.B., Robbins, P., Whiteside, T.L., 1998. Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization in vitro and in vivo. *Blood* 91, 3850–61.
187. Nielsen, C.M., White, M.J., Goodier, M.R., Riley, E.M., 2013. Functional significance of CD57 expression on human NK cells and relevance to disease. *Front. Immunol.* 4, 422. doi:10.3389/fimmu.2013.00422
188. Ochi, M., Ohdan, H., Mitsuta, H., Onoe, T., Tokita, D., Hara, H., Ishiyama, K., Zhou, W., Tanaka, Y., Asahara, T., 2004. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *Hepatology* 39, 1321–31. doi:10.1002/hep.20204
189. Ochoa, M.C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inogés, S., Melero, I., Berraondo, P., 2017. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol. Cell Biol.* 95, 347–355. doi:10.1038/icb.2017.6
190. Oei, V.Y.S., Siernicka, M., Graczyk-Jarzynka, A., Hoel, H.J., Yang, W., Palacios, D., Almåsbak, H., Bajor, M., Clement, D., Brandt, L., Önfelt, B., Goodridge, J., Winiarska, M., Zagozdzon, R., Olweus, J., Kyte, J.-A., Malmberg, K.-J., 2018. Intrinsic Functional Potential of NK-Cell Subsets Constrains Retargeting Driven by Chimeric Antigen Receptors. *Cancer Immunol. Res.* 6, 467–480. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0207
191. Ouyang, Q., Baerlocher, G., Vulto, I., Lansdorp, P.M., 2007. Telomere length in human natural killer cell subsets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 240–52. doi:10.1196/annals.1392.001
192. Pallandre, J.R., Krzewski, K., Bedel, R., Ryffel, B., Caignard, A., Rohrlich, P.S., Pivot, X., Tiberghien, P., Zitvogel, L., Strominger, J.L., Borg, C., 2008. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* 112, 4420–4. doi:10.1182/blood-2007-12-126888
193. Pardo, J., Balkow, S., Anel, A., Simon, M.M., 2002. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perfacilitated tumor control. *Eur. J. Immunol.* 32, 2881–2886. doi:10.1002/1521-4141(200210)32:10

194. Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D., 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63. doi:10.1038/35040504
195. Pedroza-Pacheco, I., Madrigal, A., Saudemont, A., 2013. Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 10, 222–229. doi:10.1038/cmi.2013.2
196. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., Kershaw, M.H., 2011. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* 89, 216–224. doi:10.1038/icb.2010.78
197. Peng, H., Tian, Z., 2017. Diversity of tissue-resident NK cells. *Semin. Immunol.* 3–10. doi:10.1016/j.smim.2017.07.006
198. Pérez-Villar, J.J., Melero, I., Rodríguez, A., Carretero, M., Aramburu, J., Sivori, S., Orengo, A.M., Moretta, A., López-Botet, M., 1995. Functional ambivalence of the Kp43 (CD94) NK cell-associated surface antigen. *J. Immunol.* 154, 5779–88.
199. Pfeiffer, M., Schumm, M., Feuchtinger, T., Dietz, K., Handgretinger, R., Lang, P., 2007. Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 138, 97–100. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06631.x
200. Phatarpekar, P. V., Lee, D.A., Somanchi, S.S., 2016. Electroporation of siRNA to Silence Gene Expression in Primary NK Cells, in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 267–276. doi:10.1007/978-1-4939-3684-7_22
201. Phillips, J.H., Chang, C., Mattson, J., Gumperz, J.E., Parham, P., Lanier, L.L., 1996. CD94 and a novel associated protein (94AP) form a NK cell receptor involved in the recognition of HLA-A, HLA-B, and HLA-C allotypes. *Immunity* 5, 163–172. doi:10.1016/S1074-7613(00)80492-6
202. Pillet, A.-H., Bugault, F., Thèze, J., Chakrabarti, L.A., Rose, T., 2009. A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells. *J. Immunol.* 182, 6267–77. doi:10.4049/jimmunol.0801933
203. Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., Zimmer, J., 2009. CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology* 126, 458–465. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x
204. Radaeva, S., Sun, R., Jaruga, B., Nguyen, V.T., Tian, Z., Gao, B., 2006. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 130, 435–52. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.055
205. Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E.O., 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J. Immunol.* 167, 1877–81.
206. Renoux, V.M., Zriwil, A., Peitzsch, C., Michaëlsson, J., Friberg, D., Soneji, S., Sitnicka, E., 2015. Identification of a human natural killer cell lineage-restricted progenitor in fetal and adult tissues. *Immunity* 43, 394–407. doi:10.1016/J.IMMUNI.2015.07.011

207. Rock, K.L., Reits, E., Neeffjes, J., 2016. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol.* 37, 724–737. doi:10.1016/j.it.2016.08.010
208. Roda, J.M., Parihar, R., Lehman, A., Mani, A., Tridandapani, S., Carson, W.E., 2006. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *J. Immunol.* 177, 120–9. doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.1.120
209. Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Münz, C., Thiel, A., Moretta, L., Ferlazzo, G., 2007. CD56brightCD16– Killer Ig-Like Receptor– NK Cells Display Longer Telomeres and Acquire Features of CD56dim NK Cells upon Activation. *J. Immunol.* 178, 4947–4955. doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4947
210. Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., Jewell, B.A., Schappe, T., Leong, J.W., Abdel-Latif, S., Schneider, S.E., Willey, S., Neal, C.C., Yu, L., Oh, S.T., Lee, Y.-S., Mulder, A., Claas, F., Cooper, M.A., Fehniger, T.A., 2016. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* 8, 357ra123. doi:10.1126/scitranslmed.aaf2341
211. Romee, R., Schneider, S.E., Leong, J.W., Chase, J.M., Keppel, C.R., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., Fehniger, T.A., 2012. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120, 4751–60. doi:10.1182/blood-2012-04-419283
212. Roncarolo, M.G., Bigler, M., Haanen, J.B., Yssel, H., Bacchetta, R., de Vries, J.E., Spits, H., 1991. Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J. Immunol.* 147, 781–7.
213. Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., Di Santo, J.P., 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 31, 1900–9. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::
214. Ross, M.E., Caligiuri, M.A., 1997. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* 89, 910–8.
215. Rouce, R.H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Ku, S., Barese, C., Murali, V., Wu, M.-F., Liu, H., Shpall, E.J., Bollard, C.M., Rabin, K.R., Rezvani, K., 2016. The TGF- β /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 30, 800–811. doi:10.1038/leu.2015.327
216. Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., Velardi, A., 1999. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94, 333–9.
217. Rusakiewicz, S., Semeraro, M., Sarabi, M., Desbois, M., Locher, C., Mendez, R., Vimond, N., Concha, A., Garrido, F., Isambert, N., Chaigneau, L., Le Brun-Ly, V., Dubreuil, P., Cremer, I., Caignard, A., Poirier-Colame, V., Chaba, K., Flament, C., Halama, N., Jäger, D., Eggermont, A., Bonvalot, S., Commo, F., Terrier, P., Opolon, P., Emile, J.-F., Coindre, J.-M., Kroemer, G., Chaput, N., Le Cesne, A., Blay, J.-Y., Zitvogel, L., 2013. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 73, 3499–510. doi:10.1158/0008-5472.
218. Sahm, C., Schönfeld, K., Wels, W.S., 2012. Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 1451–61. doi:10.1007/s00262-012-1212-x

219. Samson, S.I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A.J., Colucci, F., Buer, J., Grosveld, F., Godin, I., Di Santo, J.P., 2003. GATA-3 promotes maturation, IFN- γ production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19, 701–11.
220. Sanchez-Correa, B., Morgado, S., Gayoso, I., Bergua, J.M., Casado, J.G., Arcos, M.J., Bengochea, M.L., Duran, E., Solana, R., Tarazona, R., 2011. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1195–1205. doi:10.1007/s00262-011-1050-2
221. Sandra Lopez-Vergès, Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2011. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14725–32. doi:10.1073/pnas.95.24.14326
222. Satwani, P., Bavishi, S., Saha, A., Zhao, F., Ayello, J., van de Ven, C., Chu, Y., Cairo, M.S., 2014. Upregulation of NKG2D ligands in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma cells by romidepsin and enhanced in vitro and in vivo natural killer cell cytotoxicity. *Cytotherapy* 16, 1431–40. doi:10.1016/j.jcyt.2014.03.008
223. Schiavoni, G., Gabriele, L., Mattei, F., 2013. The Tumor Microenvironment: A Pitch for Multiple Players. *Front. Oncol.* 3, 90. doi:10.3389/fonc.2013.00090
224. Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T.D., Han, H., Chiang, S.C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K.J., Ljunggren, H.G., Miller, J.S., Bryceson, Y.T., 2015. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 42, 443–456. doi:10.1016/j.immuni.2015.02.008
225. Schmidt, R.E., Hercend, T., Fox, D.A., Bensussan, A., Bartley, G., Daley, J.F., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L., Ritz, J., 1985. The role of interleukin 2 and T11 E rosette antigen in activation and proliferation of human NK clones. *J. Immunol.* 135, 672–678.
226. Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2019. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr. Opin. Immunol.* 56, 100–106. doi:10.1016/j.coi.2018.11.003
227. Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2017. Modeling human natural killer cell development in the era of innate lymphoid cells. *Front. Immunol.* 8, 360. doi:10.3389/fimmu.2017.00360
228. Semino, C., Ceccarelli, J., Lotti, L. V., Torrissi, M.R., Angelini, G., Rubartelli, A., 2007. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 81, 92–99. doi:10.1189/jlb.0306172
229. Shah, N., Martin-Antonio, B., Yang, H., Ku, S., Lee, D.A., Cooper, L.J.N., Decker, W.K., Li, S., Robinson, S.N., Sekine, T., Parmar, S., Gribben, J., Wang, M., Rezvani, K., Yvon, E., Najjar, A., Burks, J., Kaur, I., Champlin, R.E., Bollard, C.M., Shpall, E.J., 2013. Antigen presenting cell-mediated expansion of human umbilical cord blood yields log-scale expansion of Natural Killer Cells with anti-myeloma activity. *PLoS One* 8, e76781. doi:10.1371/journal.pone.0076781
230. Shoaee-Hassani, A., Hamidieh, A.A., Behfar, M., Mohseni, R., Mortazavi-Tabatabaei, S.A., Asgharzadeh, S., 2017. NK Cell-derived exosomes from NK cells previously exposed to neuroblastoma cells augment the antitumor activity of cytokine-activated NK cells. *J. Immunother.* 40, 265–276. doi:10.1097/CJI.0000000000000179

231. Shook, D.R., Campana, D., 2011. Natural killer cell engineering for cellular therapy of cancer. *Tissue Antigens* 78, 409–15. doi:10.1111/j.1399-0039.2011.01796.x
232. Sivori, S., Pende, D., Bottino, C., Marcenaro, E., Pessino, A., Biassoni, R., Moretta, L., Moretta, A., 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 1656–66. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05
233. Skak, K., Frederiksen, K.S., Lundsgaard, D., 2008. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 123, 575–583. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02730.x
234. Sobanov, Y., Brostjan, C., Bello, T., Lo, M., 2002. Differential expression of inhibitory and activating CD94 / NKG2 receptors on NK cell clones 264, 109–119.
235. Sotiriadou, N.N., Perez, S.A., Gritzapis, A.D., Mahaira, L.G., Salagianni, M., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., 2005. Beneficial effect of short-term exposure of human NK cells to IL15/IL12 and IL15/IL18 on cell apoptosis and function. *Cell. Immunol.* 234, 67–75. doi:10.1016/j.cellimm.2005.05.002
236. Spanholtz, J., Preijers, F., Tordoir, M., Trilsbeek, C., Paardekooper, J., de Witte, T., Schaap, N., Dolstra, H., 2011. Clinical-grade generation of active NK cells from cord blood hematopoietic progenitor cells for immunotherapy using a closed-system culture process. *PLoS One* 6, e20740. doi:10.1371/journal.pone.0020740
237. Spits, H., Yssel, H., 1996. Cloning of human T and natural killer cells. *Methods* 9, 416–421. doi:S104620239690047X [pii]
238. Spolski, R., Leonard, W.J., 2008. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 57–79. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090316
239. Stern-Ginossar, N., Mandelboim, O., 2009. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 128, 1–6. doi:10.1111/j.1365-2567.2009.03147.x
240. Strbo, N., de Armas, L., Liu, H., Kolber, M.A., Lichtenheld, M., Pahwa, S., 2008. IL-21 augments natural killer effector functions in chronically HIV-infected individuals. *AIDS* 22, 1551–60. doi:10.1097/QAD.0b013e3283089367
241. Streltsova, M.A., Barsov, E., Erokhina, S.A., Kovalenko, E.I., 2017. Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. *J. Immunol. Methods* 450, 90–94. doi:10.1016/j.jim.2017.08.003
242. Streltsova, M. A., Barsov, E. V., Erokhina, S.A., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2018. Current approaches to engineering of NK cells for cancer immunotherapy. *Curr. Pharm. Des.* 24, 2810–2824. doi:10.2174/1381612824666180829113013
243. Streltsova, Maria A, Erokhina, S.A., Kanevskiy, L.M., Lee, D.A., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I., 2018. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A. *PLoS One* 13, e0208469. doi:10.1371/journal.pone.0208469
244. Stringaris, K., Barrett, A.J., 2017. The importance of natural killer cell killer immunoglobulin-like receptor-mismatch in transplant outcomes. *Curr. Opin. Hematol.* 1. doi:10.1097/MOH.0000000000000384
245. Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., Marin, D., Mielke, S., Apperley, J.F., Shpall,

- E.J., Barrett, A.J., Rezvani, K., 2014. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 99, 836–47. doi:10.3324/haematol.2013.087536
246. Suerth, J.D., Morgan, M.A., Kloess, S., Heckl, D., Neudörfl, C., Falk, C.S., Koehl, U., Schambach, A., 2016. Efficient generation of gene-modified human natural killer cells via alpharetroviral vectors. *J. Mol. Med.* 94, 83–93. doi:10.1007/s00109-015-1327-6
247. Sun, J.C., Beilke, J.N., Lanier, L.L., 2009. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557–61. doi:10.1038/nature07665
248. Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M., Cosman, D., 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J. Immunol.* 168, 671–9. doi:10.4049/jimmunol.168.2.671
249. Sutlu, T., Nyström, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S.E., Alici, E., 2012. Inhibition of Intracellular Antiviral Defense Mechanisms Augments Lentiviral Transduction of Human Natural Killer Cells: Implications for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 23, 1090–1100. doi:10.1089/hum.2012.080
250. Swift, B.E., Williams, B.A., Kosaka, Y., Wang, X.-H., Medin, J.A., Viswanathan, S., Martinez-Lopez, J., Keating, A., 2012. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica* 97, 1020–1028. doi:10.3324/haematol.2011.054254
251. Tesi, B., Schlums, H., Cichocki, F., Bryceson, Y.T., 2016. Epigenetic regulation of adaptive NK cell diversification. *Trends Immunol.* xx, 1–11. doi:10.1016/j.it.2016.04.006
252. Thompson, A.J. V, Locarnini, S.A., 2007. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol. Cell Biol.* 85, 435–445. doi:10.1038/sj.icb.7100100
253. Tran, J., Kung, S.K.P., 2007. Lentiviral vectors mediate stable and efficient gene delivery into primary murine natural killer cells. *Mol. Ther.* 15, 1331–9. doi:10.1038/sj.mt.6300184
254. Tu, M.M., Mahmoud, A.B., Makrigiannis, A.P., 2016. Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control. *Front Immunol* 7, 166. doi:10.3389/fimmu.2016.00166
255. Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., Parham, P., 1997. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753–63.
256. Varbanova, V., Naumova, E., Mihaylova, A., 2016. Killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and ligands and their role in hematologic malignancies. *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 427–40. doi:10.1007/s00262-016-1806-9
257. Vogler, I., Newrzela, S., Hartmann, S., Schneider, N., von Laer, D., Koehl, U., Grez, M., 2010. An improved bicistronic CD20/tCD34 vector for efficient purification and in vivo depletion of gene-modified T cells for adoptive immunotherapy. *Mol. Ther.* 18, 1330–8. doi:10.1038/mt.2010.83
258. Vosshenrich, C.A.J., García-Ojeda, M.E., Samson-Villéger, S.I., Pasqualetto, V., Enault, L., Goff, O.R.-L., Corcuff, E., Guy-Grand, D., Rocha, B., Cumano, A., Rogge, L., Ezine, S., Di Santo, J.P., 2006. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat. Immunol.* 7, 1217–1224. doi:10.1038/ni1395

259. Waldmann, T.A., Lugli, E., Roederer, M., Perera, L.P., Smedley, J. V., Macallister, R.P., Goldman, C.K., Bryant, B.R., Decker, J.M., Fleisher, T.A., Lane, H.C., Sneller, M.C., Kurlander, R.J., Kleiner, D.E., Pletcher, J.M., Figg, W.D., Yovandich, J.L., Creekmore, S.P., 2011. Safety (toxicity), pharmacokinetics, immunogenicity, and impact on elements of the normal immune system of recombinant human IL-15 in rhesus macaques. *Blood* 117, 4787–4795. doi:10.1182/blood-2010-10-311456
260. Wallin, R.P.A., Screpanti, V., Michaëlsson, J., Grandien, A., Ljunggren, H.-G., 2003. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 33, 2727–2735. doi:10.1002/eji.200324070
261. Wang, K.S., Frank, D.A., Ritz, J., 2000. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 95, 3183–90.
262. Wendt, K., Wilk, E., Buyny, S., Schmidt, R.E., Jacobs, R., 2007. Interleukin-21 differentially affects human natural killer cell subsets. *Immunology* 122, 486–95. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02675.x
263. Wennerberg, E., Kremer, V., Childs, R., Lundqvist, A., 2015. CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. *Cancer Immunol. Immunother.* 64, 225–235. doi:10.1007/s00262-014-1629-5
264. Winter, C.C., Long, E.O., 1997. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J. Immunol.* 158, 4026–8.
265. Wu, C., Dunbar, C.E., 2011. Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front. Med.* 5, 356–71. doi:10.1007/s11684-011-0159-1
266. Yano, N., Endoh, M., Nomoto, Y., Sakai, H., Rifai, A., 1996a. Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Hum. Immunol.* 49, 64–70.
267. Yano, N., Endoh, M., Nomoto, Y., Sakai, H., Rifai, A., 1996b. Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. *Hum. Immunol.* 49, 64–70.
268. Yao, L., Sgadari, C., Furuke, K., Bloom, E.T., Teruya-Feldstein, J., Tosato, G., 1999. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood* 93, 1612–21.
269. Yokota, Y., Mansouri, A., Mori, S., Sugawara, S., Adachi, S., Nishikawa, S., Gruss, P., 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397, 702–6. doi:10.1038/17812
270. Yokoyama, W.M., Kim, S., French, A.R., 2004. The Dynamic Life of Natural Killer Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 405–429. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104711
271. Yokoyama, W.M., Sojka, D.K., Peng, H., Tian, Z., 2013. Tissue-resident natural killer cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 78, 149–56. doi:10.1101/sqb.2013.78.020354
272. Yron, I., Wood, T.A., Spiess, P.J., Rosenberg, S.A., 1980. In vitro growth of murine T cells. V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J. Immunol.* 125, 238–45.

273. Yssel, H., De Vries, J.E., Koken, M., Van Blitterswijk, W., Spits, H., 1984. Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J. Immunol. Methods* 72, 219–27.
274. Yvon, E.S., Burga, R., Powell, A., Cruz, C.R., Fernandes, R., Barese, C., Nguyen, T., Abdel-Baki, M.S., Bollard, C.M., 2017. Cord blood natural killer cells expressing a dominant negative TGF- β receptor: Implications for adoptive immunotherapy for glioblastoma. *Cytotherapy* 19, 408–418. doi:10.1016/j.jcyt.2016.12.005
275. Zafirova, B., Wensveen, F.M., Gulin, M., Polić, B., 2011. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 3519–29. doi:10.1007/s00018-011-0797-0
276. Zhang, J., Scordi, I., Smyth, M.J., Lichtenheld, M.G., 1999. Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *J. Exp. Med.* 190, 1297–308.
277. Zhang, Jian, Sun, R., Wei, H., Zhang, Jianhua, Tian, Z., 2004. Characterization of stem cell factor gene-modified human natural killer cell line, NK-92 cells: implication in NK cell-based adoptive cellular immunotherapy. *Oncol. Rep.* 11, 1097–106.
278. Zwirner, N.W., Domaica, C.I., 2010. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors* 36, 274–288. doi:10.1002/biof.107