

На правах рукописи

Стрельцова
Мария Алексеевна

**Получение долгоживущих популяций
NK-клеток человека, обладающих заданными характеристиками**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

МОСКВА – 2019

Работа выполнена в Лаборатории клеточных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Елена Ивановна КОВАЛЕНКО**

Официальные оппоненты:

Александр Васильевич ФИЛАТОВ, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения “Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства

Сергей Сергеевич ЛАРИН, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 30 октября 2019 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте ИБХ РАН <http://www.ibch.ru>.

Автореферат разослан ____ _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

В. А. Олейников

Характеристика работы

Актуальность проблемы

Натуральные киллеры (NK-клетки) представляют собой лимфоциты системы врожденного иммунитета и могут использоваться в клеточной иммунотерапии, так как способны проявлять цитотоксичность против поврежденных или трансформированных клеток. Значительным преимуществом терапевтического 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 применением NK-клеток 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 реципиента. Тем не менее, клиническое применение NK-клеток в ряде случаев оказывается малоэффективным по не всегда понятным причинам. Возможно, это связано с тем, что NK-клетки существенно меняют фенотип во время их дифференцировки и активации, образуя гетерогенные субпопуляции с различной экспрессией поверхностных рецепторов, эффекторных молекул, сигнальных белков. Механизмы дифференцировки NK-клеток не до конца 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 в связи с цитомегаловирусной инфекцией, высокодифференцированные NK-клетки образуют подмножества адаптивно-подобных клеток, интенсивно экспрессирующих рецепторы KIR и NKG2C. Все это может привести к изменению пролиферативной и функциональной активности NK-клеток, включая цитотоксичность и продукцию цитокинов. Получение путем селекции и накопления популяций NK-клеток, обладающих заданными характеристиками, включающими продолжительное выживание в культуре, высокий уровень экспансии и экспрессию определенных рецепторов и вспомогательных молекул NK-клеток, должно 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 НК-клеток на разных стадиях развития.

В последние годы для получения большого количества функционально-активных НК-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, обладающих определенным фенотипическим профилем и сохраняющих функциональную активность, 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 оверэкспрессия 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 школе "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.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из разделов "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты", "Обсуждение", "Выводы", списка сокращений, а также списка цитируемой литературы, в который входит 278 ссылок. Работа изложена на 149 страницах печатного текста, содержит 2 таблицы и 35 рисунков.

Основное содержание работы

1 Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя два раздела. Первый раздел посвящен описанию процессов развития и дифференцировки НК-клеток, а также фенотипическим и функциональным характеристикам данных клеток. Во втором разделе представлен обзор подходов по использованию НК-клеток в противоопухолевой иммунотерапии, методов стимуляции натуральных киллеров и их генетической модификации.

2 Экспериментальная часть

2.1 Подбор условий начальной стимуляции НК-клеток для клонирования

Для получения клонов НК-клеток был применен способ помещения единичных НК-клеток в лунки 96-луночного планшета с использованием клеточного сортировщика в режиме «single cell». Для выбора оптимального способа получения клональных культур НК-клеток было проведено сравнение нескольких вариантов стимуляции, включающих различные комбинации цитокинов IL-2 и IL-21 и фидерных клеток (Рис. 1А). Было показано, что стимуляция IL-2 и облученными клетками K562, экспрессирующими мембраносвязанный IL-21 (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 клонов НК-клеток.

Проведена оценка влияния концентрации клеток K562-mbIL21, используемой при культивировании, на эффективность образования клонов и их выживаемость в процессе культивирования (Рис. 1Б). Были выбраны концентрации 5×10^3 , 1×10^4 и 2×10^4 клеток/мл среды. Эффективность генерации клонов оказалась наивысшей при добавлении в культуры 10^4 фидерных клеток/мл.

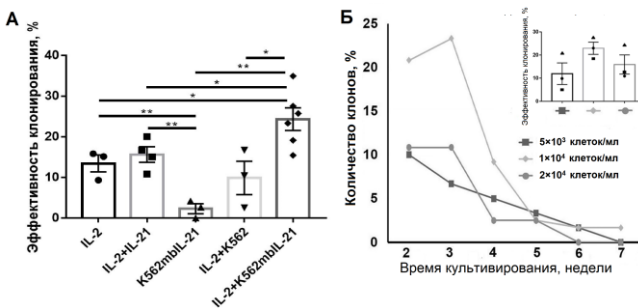


Рисунок 1. Выбор условий стимуляции и оптимизация метода клонирования НК-клеток. А) Эффективность образования клонов при различных условиях стимуляции. Б) Длительность жизни клонов после стимуляции

разным количеством K562-mbIL21. Значения эффективности образования клонов в 3-х независимых экспериментах представлены в столбцах разными символами.

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

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 10⁴ клеток/мл K562-mbIL21). Модель 1 включала еженедельное добавление фидерных клеток (10⁴ клеток/мл) вместе с IL-2 (Рис. 2). В модели 2 еженедельная рестимуляция производилась с применением только IL-2. Фидерные клетки добавлялись единожды через 6 недель культивирования (Рис. 2).



Рисунок 2. Схемы моделей культивирования клонов НК-клеток.

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). После 5-и недель культивирования общее количество клеток в клонах, полученных с помощью модели 1, достигало значений в диапазоне от 5 × 10⁴ до 3 × 10⁶ клеток на клон (Таблица 1). В отличие от способа культивирования клеток по модели 1, использование модели 2 приводило к значительному увеличению длительности жизни клонов до 14 недель. При этом, в клонах, культивируемых в соответствии с моделью 2, вариабельность уровня экспансии была намного выше. В 3-х индивидуальных клонах, культивируемых по модели 2, общее количество клеток достигало 1-2 × 10⁷ клеток в каждом (Рис. 6Б).

Таблица 1. Выживаемость и уровень экспансии клонов НК-клеток, культивируемых по модели 1 и по модели 2.

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

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

Был проанализирован фенотип полученных клонов НК-клеток. Для измерения уровня активации НК-клеток был выбран маркер HLA-DR (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. 3А). Сходные закономерности были показаны для рецептора CD16. Значительные изменения в интенсивности экспрессии CD16 и HLA-DR, наблюдаемые в обеих моделях культивирования, свидетельствуют о том, что данные молекулы не следует рассматривать как маркеры дифференцировки NK-клеток при культивировании *in vitro*. В целом, еженедельная рестимуляция с помощью IL-2/K562-mbIL21, способствовала формированию более активированного фенотипа NK-клеток. В клонах был проанализирован уровень продукции IFN- γ , и было выявлено значительное различие в секреции IFN- γ между клонами, выращенными в соответствии с моделями 1 и 2 (Рис. 3Б).

Так как клоны, выращенные по модели 2, демонстрировали низкие уровни секреции IFN- γ и менее активированный фенотип, далее был проведен поиск способа изменения фенотипических характеристик и функциональной активности клонов, культивируемых по данной модели. Еженедельное добавление фидерных клеток в течение двух недель значительно увеличивало уровни экспрессии маркеров активации HLA-DR и CD86, рецепторов натуральной цитотоксичности NKp44 и NKp46, ингибирующего NKG2A-рецептора, а также рецептора NKG2D. 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. 3В).

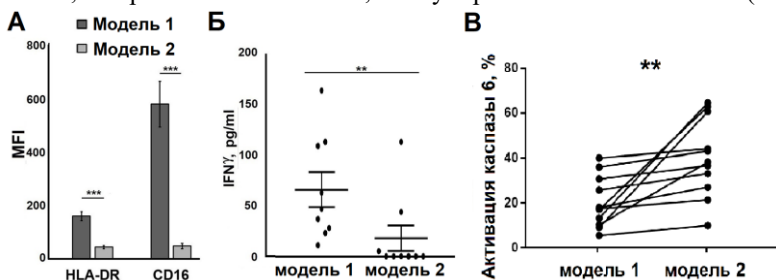


Рисунок 3. Экспрессия поверхностных маркеров и секреция IFN- γ в клонах NK-клеток зависит от модели культивирования. А) Различия в экспрессии поверхностных маркеров при культивировании клонов по моделям 1 и 2 (измерения проводились на 5-й неделе). Б) Сравнение уровня IFN- γ в супернатантах клонов, полученных в моделях 1 и 2. В) Натуральная цитотоксичность клонов, выращенных по модели 2 и стимулированных в течение двух недель IL-2 с добавлением фидерных клеток (слева) и только IL-2 (светло-серый; слева).

Таким образом, 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 исследованиях коллекций клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток.

2.4 Анализ эффективности образования клонов из НК-клеток, различных по степени дифференцировки, активации либо по уровню экспрессии рецептора NKG2C.

Было проведено 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⁺. Несмотря на существенные вариации в частоте образования клонов НК-клеток от разных доноров, в каждой коллекции величина эффективности клонирования НК-клеток в субпопуляции изменялась со следующей закономерностью: CD57^{bright} < CD56^{dim}CD57⁻ < CD56^{bright} (Рис. 4А). Можно заключить, что менее дифференцированные НК-клетки обладают более высоким пролиферативным ответом на стимуляцию IL-2/K562-mbIL21, по сравнению с более дифференцированными клетками.

Идентификацию активированных НК-клеток и их отделение от покоящихся на каждой из указанных стадий дифференцировки проводили, исходя из наличия поверхностной экспрессии HLA-DR. Клетки CD56^{dim}CD57^{bright} не были разделены на HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ из-за низкого уровня экспрессии HLA-DR. Кроме того, было сделано предположение, что НК-клетки NKG2C⁺ могут обладать большей пролиферативной активностью на клональном уровне. Чтобы проверить это предположение, в другом варианте проводили клонирование НК-клеток из субпопуляций NKG2C⁺ и NKG2C⁻. Однако, в пределах одной стадии дифференцировки нами не было обнаружено существенных различий в эффективности клонирования между HLA-DR-позитивными и HLA-DR-негативными НК-клетками, а также между НК-клетками, позитивными и негативными по NKG2C (Рис. 4Б,В). Таким образом, состояние активации НК-клеток, оцененное по уровню экспрессии HLA-DR, и наличие/отсутствие NKG2C на поверхности клеток, находящихся на одной стадии дифференцировки, по-видимому, не влияет на процесс генерации клонов в данных условиях стимуляции.

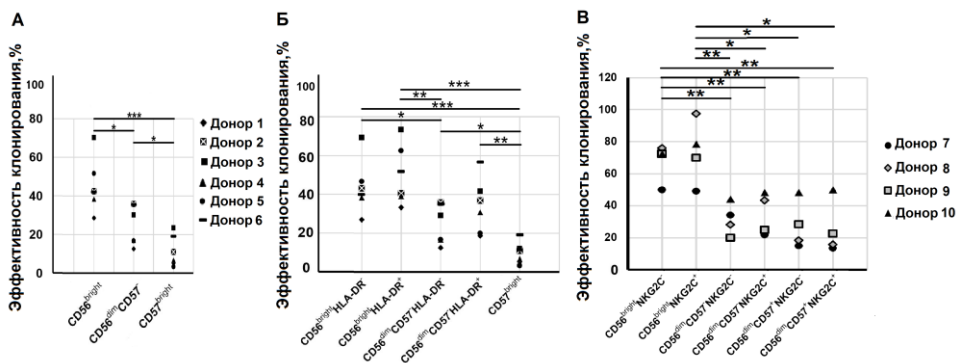


Рисунок 4. Частота образования клонов из субпопуляций НК-клеток, отличающихся только по степени дифференцированности (А), по степени дифференцированности и уровню активации (Б), по степени дифференцированности и уровню экспрессии NKG2C (В).

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

Был проведен анализ продолжительности жизни клонов, полученных из описанных выше субпопуляций. CD56^{dim}-НК-клетки образовывали меньше клонов, по сравнению с НК-клетками CD56^{bright} (Рис. 5), однако клоны из субпопуляции CD56^{dim} продемонстрировали лучшую выживаемость на более поздних неделях культивирования. Таким образом, можно заключить, что стадия дифференцировки влияет не только на эффективность образования клонов, но и на их продолжительность жизни.

Самая высокая выживаемость клонов была зарегистрирована в субпопуляции НК-клеток CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁻ (Рис. 5А). Срок жизни небольшой части клонов из этой субпопуляции достигал 13-14 недель при общем количестве клеток в клоне $1-2 \cdot 10^7$ (Рис. 6Б). Таким образом, только небольшое число клонов НК-клеток, в основном, клоны клеток CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁻, оказались способны к длительной пролиферации в ответ на предложенные стимулы.

Клоны, полученные из NKG2C-позитивных НК-клеток обладали большей продолжительностью жизни, по сравнению с клонами из субпопуляций NKG2C⁻ (Рис. 5Б). Выживаемость клонов, полученных из общей субпопуляции CD57⁺ была довольно низкой, однако, были получены статистические различия доли выживших клонов в субпопуляциях CD57⁺NKG2C⁻ и CD57⁺NKG2C⁺. Можно заключить, что экспрессия рецептора NKG2C в НК-клетках ассоциирована с более интенсивной пролиферацией и более высокой жизнеспособностью клонов

НК-клеток.

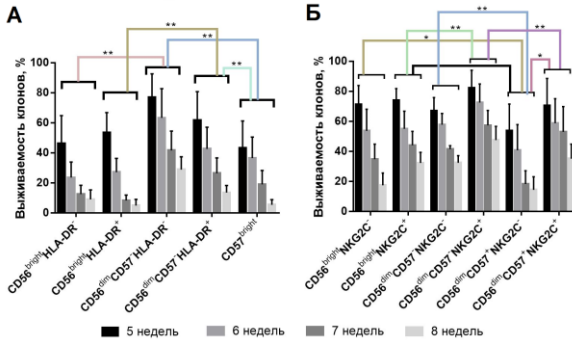


Рисунок 5. Доля выживших клонов НК-клеток, полученных из субпопуляций, различных по степени дифференцировки, уровню активации (А) или уровню экспрессии NKG2C (Б).

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

Были получены данные по общему количеству клеток и уровню экспансии клонов, полученных из отличных по степени дифференцированности и уровню активации НК-клеток. Наблюдалась большая вариабельность количества клеток в клонах из одной субпопуляции, полученных от разных доноров. Наибольшее количество клеток (до $2 \cdot 10^7$) было зарегистрировано в части клонов, полученных из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{-}HLA-DR^{-}$ (Рис. 6А). 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.

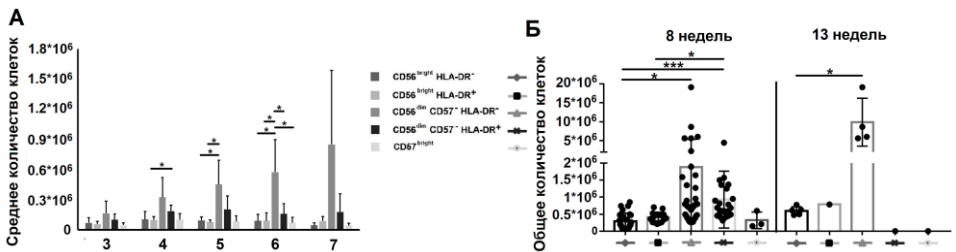


Рисунок 6. Количество клеток в клонах. А) Среднее количество клеток в клонах по четырем коллекциям. Б) Общее количество клеток в долгоживущих клонах через 8 и 13 недель культивирования.

2.5 Фенотипические особенности полученных клонов

Был выполнен анализ стабильности ряда фенотипических характеристик полученных клонов. После культивирования в течение первых недель уровень поверхностной экспрессии CD56 в большинстве клонов увеличивался, хотя и 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. Тем не менее, для активированных NK-клеток использование поверхностного уровня CD56 в качестве маркера дифференцировки, по-видимому, нецелесообразно.

Было показано, что только часть клеток каждого клона экспрессировала маркер CD57 (Рис. 7). Клоны, полученные из CD56^{bright} и CD56^{dim}CD57⁻NK-клеток, начинали экспрессировать молекулу CD57 на поверхности клеток, хотя среднее значение доли CD57⁺-клеток в этих клонах было значительно ниже, чем для клонов, полученных из клеток CD57^{bright}. С другой стороны, примерно в 30% проанализируемых клонов из субпопуляции CD57^{bright} только половина клеток экспрессировала CD57 (Рис. 7). Можно заключить, что часть клеток в клонах из субпопуляции CD57^{bright} теряют экспрессию CD57 в процессе культивирования.

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. 7Б). Возможно, большее процентное содержание CD57-позитивных клеток в клонах из неразделенной субпопуляции CD57^{bright} связано 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 сохраняло экспрессию данной молекулы. Этот факт, в совокупности с высоким уровнем выживаемости клонов из NK-клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺, косвенно указывает на то, что клоны из этой субпопуляции могут обладать чертами адаптивных NK-клеток.

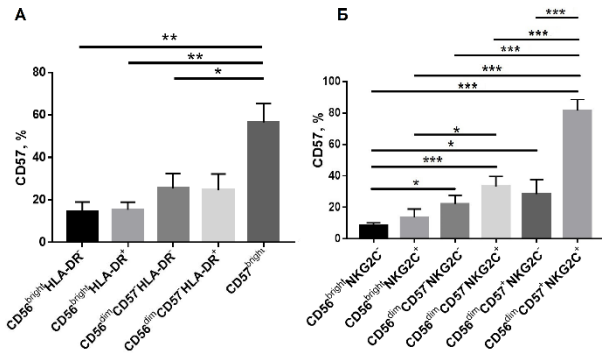


Рисунок 7. Поверхностная экспрессия CD57 в клонах, полученных из NK-клеток, различных по степени дифференцировки и уровню экспрессии HLA-DR (А) или уровню экспрессии NKG2C (Б).

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}. Клоны из субпопуляций CD56^{dim}NKG2C⁺ демонстрировали статистически более высокий уровень экспрессии HLA-DR, чем клоны из соответствующих негативных по NKG2C клеток. Таким образом, более дифференцированные клетки в ответ на этот тип стимуляции демонстрировали фенотип, соответствующий более активированному состоянию. С учетом данных, представленных на рисунке 3А, можно заключить что экспрессия HLA-DR в большей степени является реакцией клеток на стимуляцию K562-mbIL21.

2.5.1 Изучение экспрессии маркеров, влияющих на функциональную активность клонов

В ряде клонов была протестирована поверхностная экспрессия рецептора CD16. В большинстве клонов, включая клоны, полученные из CD16-негативной субпопуляции CD56^{bright}, была зарегистрирована поверхностная экспрессия CD16. Только часть клеток клона экспрессировали данный рецептор, а уровень экспрессии CD16 обычно уменьшался во время культивирования. 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. 3А).

Для определения экспрессии KIR было выбрано антитело, специфичное для аллельных форм KIR2DL2 и KIR2DL3, которые широко распространены в популяции человека (Leung et al., 2005). Полученные клоны были полностью либо KIR2DL2/DL3-позитивными, либо KIR2DL2/DL3-негативными. При этом, поверхностная экспрессия KIR2DL2/DL3 не исчезала во время культивирования в позитивных по этому маркеру клонах и не появлялась на клеточной поверхности в отрицательных клонах.

2.5.2 Оценка стабильности уровня экспрессии NKG2A

Только часть CD56^{dim}-NK-клеток *ex vivo* экспрессируют рецептор NKG2A на своей поверхности (Рис. 8А). Однако анализ экспрессии NKG2A на клетках клонов показал, что 98% клонов из всех субпопуляций NK-клеток, проанализированных в разные моменты культивирования, были позитивны по NKG2A (Рис. 8Б). Было сделано предположение, что NKG2A-негативные NK-клетки приобретают экспрессию NKG2A на клональном уровне. Была проведена серия клонирования NK-клеток CD56^{dim}NKG2A⁻. 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.8В). Этот результат указывает на способность высокодифференцированных NK-клеток экспрессировать NKG2A *de novo* в условиях стимуляции IL-2 и K562-mbIL21. Таким образом, высокодифференцированные NK-клетки NKG2A⁻ могут приобретать фенотип менее дифференцированных клеток NKG2A⁺.

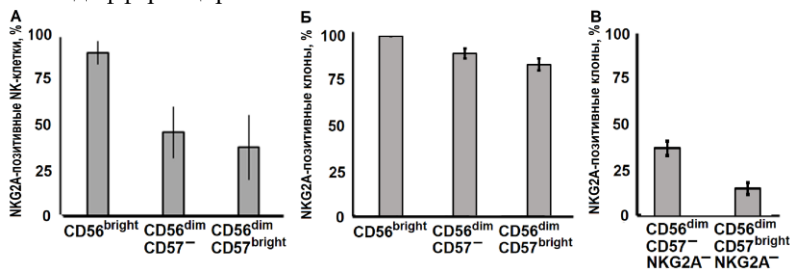


Рисунок 8. Поверхностная экспрессия NKG2A в клонах NK-клеток. А) Доля NKG2A-позитивных клеток в свежeweделенных субпопуляциях NK-клеток CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57^{bright}. Б) Анализ экспрессии NKG2A в клонах, полученных из разных субпопуляций. В) Анализ экспрессии NKG2A в клонах, полученных из клеток CD56^{dim}CD57^{-/bright}NKG2A⁻.

2.6 Функциональная активность полученных клонов NK-клеток

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. 3Б). В нашей лаборатории был отработан метод детекции IFN- γ в популяциях NK-клеток, которые были предварительно стимулированы IL-12 и IL-15 (Erokhina et al., 2018). Данный способ стимуляции был применен к клонам. Было показано, что все анализируемые клоны продуцировали IFN- γ в ответ на стимуляцию IL-12+IL-15. Интересно, что клоны, полученные из субпопуляций CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁻ продуцировали больше IFN- γ , по сравнению с клонами, полученными из субпопуляции CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁺ (Рис. 9А). Во втором варианте клонирования прослеживалась тенденция более высокого уровня продукции IFN- γ в клонах из субпопуляции CD56^{dim}NKG2C⁺, по сравнению с клонами из субпопуляции CD56^{dim}NKG2C⁻ (Рис. 9Б).

В нескольких хорошо растущих клонах был измерен уровень натуральной цитотоксичности против клеток K562. Все тестируемые клоны вызывали запуск апоптоза в клетках-мишенях, демонстрируя таким образом цитотоксическую активность (Рис. 9В). 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 $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^+$, по сравнению с клонами из субпопуляции $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^-$. Таким образом, можно заключить, что все исследованные клоны, полученные с помощью стимуляции IL-2/K562-mbIL21, оказались функционально активными.

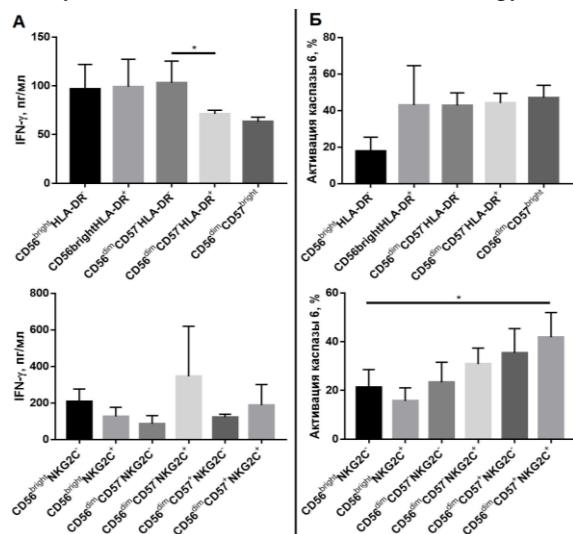


Рисунок 9. Функциональная активность клонов НК-клеток. А) Уровень продукции IFN-γ в супернатантах клонов различных субпопуляций. Б) Уровень натуральной цитотоксической активности клонов, полученных из различных субпопуляций НК-клеток, измеренный по уровню активации каспазы-6 в клетках-мишенях K562.

2.6.1 Изучение особенностей клонов после замораживания/размораживания

Поскольку в литературе имеются данные о сниженной выживаемости и активности НК-клеток после замораживания, была проведена серия экспериментов по изучению влияния заморозки клонов НК-клеток на их фенотип и функциональную активность. Было показано, что при замораживании $2-3 \times 10^6$ клеток высокопролиферирующих клонов, они легко переносят заморозку и способны пролиферировать после размораживания. Все исследуемые клоны были охарактеризованы как $\text{CD56}^+\text{CD57}^-\text{NKG2A}^+$, следовательно, имели фенотип слабодифференцированных НК-клеток. Кроме того, размороженные клоны демонстрировали высокий уровень как натуральной, так и антитело-зависимой клеточной цитотоксичности.

2.7 Увеличение продолжительности жизни НК-клеток с использованием генетических манипуляций

Было сделано предположение о том, что внедрение в геном НК-клеток каталитической субъединицы теломеразы может увеличить получаемое количество НК-клеток при культивировании за счет продления жизни клеточной

культуры. Был выбран способ доставки гена в НК-клетки с помощью ретровирусной трансдукции, которая эффективна в отношении цитотоксических Т-клеток (Barsov, 2011). Для генетической модификации НК-клеток были использованы ретровирусные плазмиды xLox-GFP-TERT и xLox-NGFR-TERT, содержащие ген hTERT и плаزمида PhRD114-TERT, которая содержит белок вирусной оболочки RD114, имеющий тропизм к клеткам гематопоезического ряда. Трансфекцию проводили в клетках GP2-293 и Phoenix Ampro с использованием Са-фосфатного буфера.

2.7.1 Оптимизация метода трансдукции НК-клеток

Первоначально работа ретровирусной векторной системы формировать вирусные частицы с последующей генетической трансдукцией была проверена с использованием линии Т-клеточной лимфомы Jurkat. Уровень трансдукции клеток Jurkat варьировал между 45-70% для GFP-содержащего вектора и 80-90% для NGFR-содержащего вектора.

После тестирования данная ретровирусная векторная система, была использована для трансдукции свежесыведенных НК-клеток человека. Нам не удалось трансдуцировать первичные НК-клетки с измеримой эффективностью. Поэтому было решено стимулировать деление НК-клеток перед трансдукцией с помощью IL-2 (500 ед/мл). Активированные НК-клетки были успешно трансдуцированы, однако эффективность заражения оказалась невелика (Рис. 10А).

2.7.2 Изучение эффективности трансдукции различных субпопуляций НК-клеток

Так как на клональном уровне было показано, что клетки CD56^{bright} обладают высокой пролиферативной активностью, было сделано предположение о том, что они будут успешно подвергаться трансдукции. Субпопуляции CD56^{bright} и CD56^{dim} культивировались в течении недели в среде с IL-2. В отличие от НК-клеток CD56^{dim}, НК-клетки с фенотипом CD56^{bright} успешно подвергались трансдукции (Рис. 10Б).

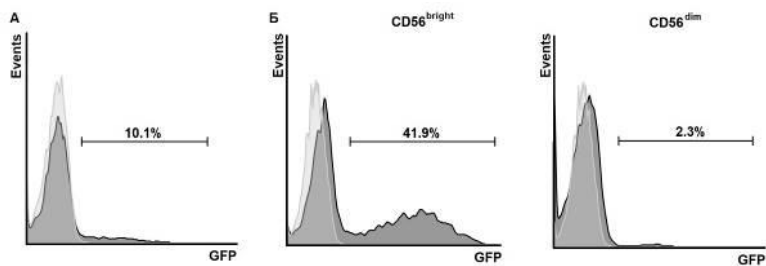


Рисунок 10. Уровень трансдукции стимулированных ИЛ-2 НК-клеток. А) Уровень трансдукции общей популяции НК-клеток, стимулированных ИЛ-2 в течение 7 дней. Б) Уровень трансдукции CD56^{bright}-НК-клеток (слева) и CD56^{dim}-НК-клеток (справа), отсортированных после 7 дней стимуляции ИЛ-2.

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, оказались значительно более чувствительны к ретровирусной трансдукции, чем субпопуляция CD57⁺ (Рис. 11Г). Было предположено, что 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 во время культивирования связано с низкой пролиферативной активностью этих клеток (Рис. 11А,Б,В). НК-клетки CD57⁻ в основном находились в S-фазе клеточного цикла, тогда как большая часть НК-клеток с фенотипом CD57⁺ оказалась в стадии покоящихся клеток G0 (Рис. 11В). Таким образом, устойчивость НК-клеток CD57⁺ к ретровирусной трансдукции во многом связана с низкой пролиферативной активностью этих клеток.

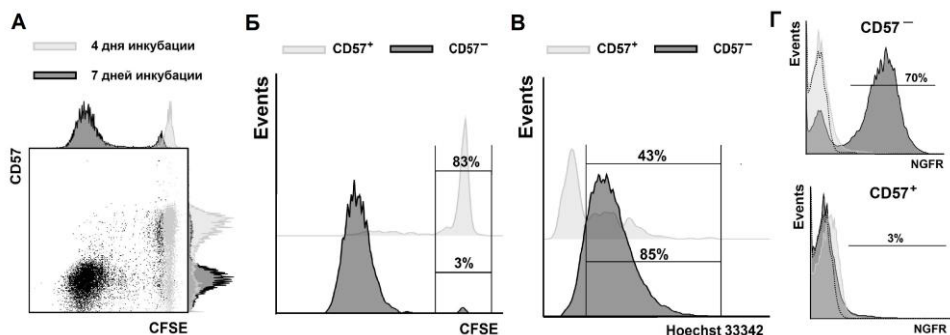


Рисунок 11. Генетическая трансдукция CD57-негативных и CD57-позитивных НК-клеток. А) Проллиферативная активность НК-клеток, измеренная с использованием CFSE-окрашивания на 4-й (светло-серый) и 7-й (черный) день инкубации. Б) Сравнение пролиферативной активности НК-клеток CD57⁻ и CD57⁺, оцененной по уровню свечения CFSE на 7-й день стимуляции. В) Анализ клеточного цикла, выполненный в НК-клетках CD57⁻ и CD57⁺, стимулированных IL-2 и K562-mbIL21 в течение 7 дней. Г) Эффективность ретровирусной трансдукции CD57-негативных и CD57-позитивных НК-клеток. Пунктирной линией обозначена аутофлуоресценция, светло-серым – изотипический контроль, темно-серым – образец.

2.7.3 Анализ влияния условий стимуляции НК-клеток на эффективность трансдукции

На клональном уровне было показано, что при стимуляции IL-2/K562-mbIL21 доля CD57⁻-клеток снижается, поэтому этот способ был выбран для дальнейшей работы. Данный способ стимуляции повысил эффективность трансдукции (Рис. 12А). Так как ретровирусной модификации подвергаются только пролиферирующие клетки, можно предположить, что метод стимуляции с помощью комбинации IL-2/K562-mbIL21, вызывающий устойчивую пролиферацию НК-клеток, как следствие, приводит к увеличению эффективности трансдукции активированных НК-клеток.

На следующем этапе ретровирусной трансдукции были подвергнуты клоны НК-клеток. Нам не удалось трансдуцировать клоны, обладающие низким пролиферативным потенциалом. Основным критерием отбора клонов был высокий уровень пролиферации. Всего было трансдуцировано 16 клонов, 9 из которых были более подробно охарактеризованы. Эффективность трансдукции хорошо пролиферирующих клонов в среднем составила $52.5 \pm 9.8\%$ (SE) (Рис. 12Б). При культивировании трансдуцированных клонов в течение 10 дней уровень экспрессии GFP повышался. После трансдукции клоны проявляли натуральную цитотоксическую активность против стандартных клеток-мишеней K562.

Для проверки возможности трансдукции замороженных клонов, были

выбраны клоны № 6, 7, 8 и 9, которые отличаются по экспрессии NKG2C и рецепторов KIR. Клоны были разморожены спустя полгода после заморозки и культивировались в полной среде с добавлением 100 ед./мл IL-2 в течение 3 дней. Было показано, что замораживание/размораживание клонов не препятствует трансдукции, однако уровень GFP-позитивных клеток значительно уменьшался (Рис. 12В), что возможно связано с пониженной пролиферативной активности данных клонов.

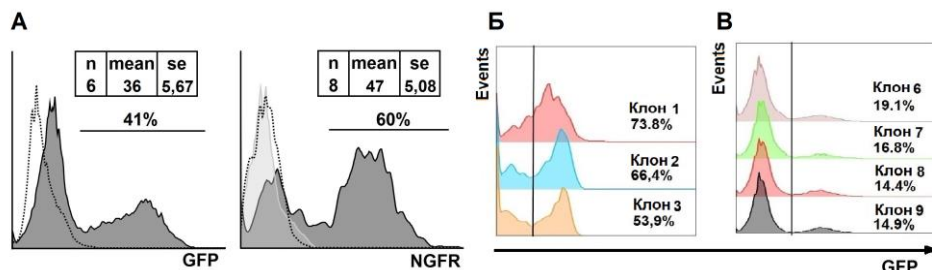


Рисунок 12. Ретровирусная трансдукция NK-клеток и клонов NK-клеток человека после стимуляции IL-2/K562-mbIL21. А) Эффективность трансдукции NK-клеток. Б) Эффективность трансдукции клонов NK-клеток. В) Эффективность трансдукции клонов NK-клеток, после процесса замораживания/оттаивания.

2.7.4 Изучение продолжительности жизни, фенотипических и функциональных особенностей трансдуцированных NK-клеток

2.7.5 Изучение влияния трансдукции на фенотипические и функциональные характеристики трансдуцированных NK-клеток

Для проверки влияния трансдукции на характеристики клеток были проведены исследования фенотипа и функциональной активности NK-клеток через месяц после трансдукции. Доля клеток, экспрессирующих CD57 и KIR2DL2/DL3, в трансдуцированных NK-клетках оказалась несколько выше значений контрольных клеток. Доля клеток NKG2A⁺ и HLA-DR⁺, напротив, была снижена, по сравнению с нетрансдуцированными клетками. Таким образом, NK-клетки, подвергшиеся генетической модификации, имели фенотип более зрелых клеток. 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 или, возможно, это связано с лучшей пролиферативной активностью KIR2DL2/DL3⁺ - клеток.

Проверку функциональной активности трансдуцированных NK-клеток также проводили через месяц после трансдукции. Не было выявлено значительных различий в уровне натуральной цитотоксической активности между

модифицированными и немодифицированными клетками.

2.7.6 Оценка уровня теломеразной активности в трансдуцированных НК-клетках

В трансдуцированных НК-клетках была оценена теломеразная активность. Для этого было проведено разделение клеток путем сортировки на позитивные и негативные по уровню свечения репортерного белка GFP (Рис. 13А). Было проведено сравнение уровня теломеразной активности в отсортированных GFP⁺НК-клетках с уровнем активности теломеразы в контрольных GFP-негативных клетках. Показано, что уровень теломеразной активности в трансдуцированных клетках сопоставим с позитивным контролем (Рис. 13Б) и значительно выше, чем в контрольных НК-клетках. С помощью теломеразного теста была также проверена активность теломеразы в трансдуцированных клонах. Показано, что активность теломеразы в трансдуцированных клетках клонов значительно выше, чем в контрольном клоне (Рис. 13В). Таким образом, модифицированные геном теломеразы НК-клетки и клоны НК-клеток обладали повышенным уровнем теломеразной активности.

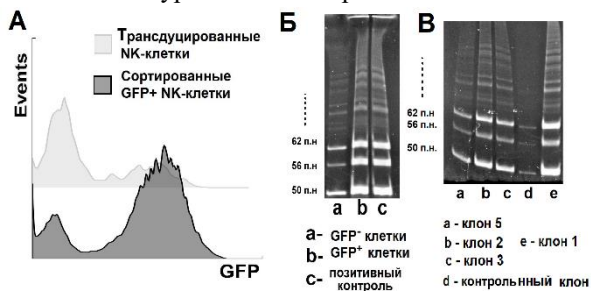


Рисунок 13 Определение теломеразной активности в отсортированных GFP⁺ НК-клетках. А. Уровень свечения GFP в трансдуцированных клетках до (светло-серый) и после (темно-серый) сортировки. Сравнение теломеразной активности в трансдуцированных и не

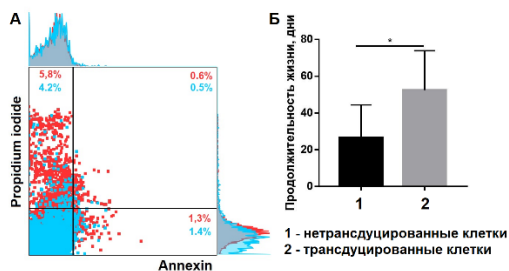
трансдуцированных НК-клетках (Б) и в клонах НК-клеток (В).

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

Трансдукция не оказывала значительного влияния на жизнеспособность НК-клеток: как трансдуцированные, так и нетрансдуцированные клетки имели низкий уровень апоптоза, а количество трансдуцированных клеток, умирающих путем некроза было меньше, чем нетрансдуцированных клеток (Рис. 14А). Понижение доли некротических клеток после трансдукции можно объяснить тем, что ретровирусной трансдукции подвергаются только пролиферирующие, а значит, жизнеспособные клетки.

Для сравнения продолжительности жизни модифицированных и немодифицированных НК-клеток было необходимо подобрать адекватный контроль. Была поставлена серия контрольных экспериментов, повторяющих

процедуру трансдукции, но без вставки трансгена. Среднее время жизни культур трансдуцированных клеток составило $52,4 \pm 9,6$ (количество дней \pm SE), тогда как продолжительность жизни контрольных клеток варьировала от 15 до 45 дней ($24,6 \pm 6,0$). Можно заключить, что введение гена каталитической субъединицы теломеразы увеличивало время культур трансдуцированных НК-клеток (Рис. 14Б).



клетках. Б) Сравнение продолжительности жизни трансдуцированных и нетрансдуцированных НК-клеток.

Рисунок 14. Жизнеспособность и продолжительность жизни трансдуцированных клеток. А) Жизнеспособность трансдуцированных НК-клеток, измеренная по уровню флуоресцентного свечения annexin V/propidium iodide справа показано на трансдуцированных (синие точки) и нетрансдуцированных (красные точки)

Таким образом, в данной работе нами был разработан метод клонирования НК-клеток и описаны популяции, состоящие из потомства единичных НК-клеток, находящихся на разных стадиях созревания. Получены знания о взаимосвязи фенотипических особенностей НК-клеток и их выживаемости, способности к экспансии и функционального потенциала. Получены данные об изменчивости экспрессии ряда дифференцировочных маркеров НК-клеток при культивировании в условиях стимуляции. Оптимизирован способ ретровирусной трансдукции НК-клеток и получены генномодифицированные НК-клетки, высокоэкспрессирующие ген hTERT.

3 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.

4 Список работ, опубликованных по теме диссертации

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. V.79, p.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:

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 ИЛ-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 стендовый доклад.
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 - устный доклад.
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. стендовый доклад.
 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. стендовый доклад.
 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.