

На правах рукописи

Паламарчук Анастасия Игоревна

**Оверэкспрессия гена каталитической субъединицы теломеразы как фактор,  
влияющий на транскрипционную и функциональную активность NK-  
клеток, а также их чувствительность к направленной элиминации**

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
Кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена в лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

**Стрельцова Мария Алексеевна**, кандидат биологических наук.

**Официальные оппоненты:**

**Иванов Александр Владимирович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Нуштаева Анна Андреевна**, кандидат биологических наук, руководитель группы III категории научного центра генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус».

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (Пироговский университет)

Защита состоится «30» сентября 2026 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2026г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук В.А. Олейников



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы исследования и степень ее разработанности*

В настоящее время НК-клетки признаны многообещающей базой для развития клеточной иммунотерапии рака. При применении в адоптивной терапии НК-клетки обладают следующими преимуществами: пониженными, в сравнении с Т-клеточной терапией, рисками развития тяжёлых побочных явлений; возможностью применения аллогенных НК-клеток; врождённой способностью распознавать и уничтожать злокачественные новообразования без предварительной сенсibilизации. Тем не менее, использование НК-клеток связано с рядом ограничений. Для наработки достаточных количеств терапевтических НК-клеток необходимо проводить дополнительные манипуляции *in vitro*. Однако, интенсивная и длительная пролиферация приводит к функциональному истощению НК-клеток (Hematol et al., 2021; Islam et al., 2021).

Генетическая инженерия открывает возможности повышения эффективности функционального ответа терапевтических НК-клеток, но может способствовать развитию непредсказуемых осложнений (Lanza & Seghatchian, 2020; Weber et al., 2022). Модификация НК-клеток геном *hTERT*, кодирующим каталитическую субъединицу теломеразы человека, представляет перспективный подход к поддержанию продолжительной выживаемости и пролиферации НК-клеток, наряду с сохранением активированного функционального состояния во времени (Fujisaki et al., 2009; Streltsova et al., 2021). Применение модифицированных клеток с генетически улучшенными функциональными и пролиферативными характеристиками, в частности, с оверэкспрессией *hTERT*, без соответствующего контроля или предварительного облечения небезопасно.

Генетические конструкции, позволяющие контролируемо отключать и даже полностью элиминировать модифицированные клетки, способны повысить терапевтическую безопасность и снизить риски как немедленных, так и отсроченных побочных эффектов (Kennedy-nasser et al., 2011; Teу, 2014). Дополнительная модификация НК-клеток геном «суицидной» конструкции *iCasp9* может обеспечить надлежащий контроль над *hTERT*-НК-клетками. Данная конструкция активирует в клетках апоптоз при добавлении химического индуктора димеризации (CID) и уже применяется в терапии. В отличие от других систем «клеточного суицида», запуск апоптоза на уровне каспазы-9 позволяет избежать ингибирования многими противоапоптотическими факторами, поскольку активация клеточной гибели происходит на финальных стадиях апоптотического сигнального пути. С другой стороны, в последнее время появляются работы, свидетельствующие о неполной элиминации *iCasp9*-модифицированных клеток при добавлении CID. Взаимодействие *hTERT* и *iCasp9* в модуляции

внутриклеточных сигнальных путей на различных уровнях к настоящему времени практически не изучено. До сих пор полностью не ясен механизм подавления гибели клеток, характеризующихся повышенной экспрессией hTERT, особенно важно понимание данного процесса при взаимном влиянии hTERT и iCasp9 в клетках. Предположительно, сложный комплекс внутриклеточных взаимодействий между hTERT и другими участниками основных сигнальных путей, а также различная внутриклеточная локализация hTERT расширяет потенциальный спектр функциональных возможностей этого белка. Несмотря на эти факты, большая часть современных исследований по-прежнему сосредоточена на внутриядерных канонических функциях hTERT, связанных с достраиванием теломерных повторов, в то время как относительно мало данных о неканонических свойствах этого белка, заключенных в модуляции транскрипции генов, а также в цитоплазматической и митохондриальной активности hTERT. Таким образом, неканонические функции hTERT требуют дальнейшего изучения.

В данной работе проведена ретровирусная модификация первичных НК-клеток геном *hTERT* и *iCASP9*. Исследованы молекулярные механизмы, связанные с выживаемостью и клеточной гибелью, а также ролью hTERT и iCasp9 в этих процессах.

*Цель исследования:* изучение роли повышенной экспрессии теломеразы в клетках, модифицированных геном *hTERT*, для получения длительно пролиферирующих, высокоактивных НК-клеток с возможностью их быстрой направленной элиминации с использованием суицидной конструкции на основе iCasp9.

*В рамках данной цели были сформулированы следующие задачи:*

1. Получить НК-клетки, модифицированные генами *hTERT* и *iCASP9*, и оценить влияние трансгенов на их выживаемость и пролиферативную активность;
2. Выявить изменения транскрипционной и функциональной активности в НК-клетках, модифицированных генами *hTERT* и *iCASP9*;
3. Оценить развитие истощения iCasp9-НК-клеток с гиперэкспрессией hTERT после продолжительного культивирования;
4. Изучить возможность направленной элиминации iCasp9-НК-клеток с гиперэкспрессией hTERT химическим индуктором димеризации (CID);
5. Охарактеризовать выжившие после обработки CID НК-клетки ((CID)-iCasp9-НК-клетки).

*Научная новизна работы*

В данной работе использован оригинальный подход к модификации НК-клеток с помощью ретровирусной трансдукции двух генов: гена *hTERT*, способствующего выживаемости клеток, и гена *iCASP9*, позволяющего индуцировать апоптоз модифицированных клеток. Проведенная модификация

позволила получить НК-клетки с улучшенным функциональным и пролиферативным потенциалом. При индукции клеточной гибели путём активации iCasp9 продемонстрировано участие неканонических функций каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT в противодействии запуску апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада на уровне каспазы-9. Показана ассоциация уровня транскриптов гена *BIRC3*, кодирующего противоапоптотический фактор с-IAP-2, с гиперэкспрессией hTERT в НК-клетках. Однако, продемонстрировано, что молекула hTERT способна защищать НК-клетки от индукции апоптоза на уровне каспазы-9 другими путями, не связанными с регуляцией уровня транскриптов *BIRC3*. iCasp9-НК-клетки, выжившие после обработки димеризатором, и устойчивые к индукции апоптоза hTERT-iCasp9-НК-клетки демонстрировали сходный транскрипционный профиль экспрессии генов, стимулирующих прохождение клеточного цикла. Показана взаимосвязь гиперэкспрессии hTERT с изменениями сплайсинга транскриптов в НК-клетках, устойчивых к индукции клеточной гибели при добавлении димеризатора. Представленные в работе данные демонстрируют транскрипционные изменения в hTERT-НК-клетках и предполагают вклад гиперэкспрессии hTERT в устойчивость НК-клеток к индукции апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада с участием каспазы-9.

#### *Теоретическая и практическая значимость работы*

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении и углублении знаний о неканонической роли hTERT. Исследовано участие hTERT в поддержании активного функционального и пролиферативного состояния НК-клеток человека. Показана роль hTERT в противодействии запуску апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада, на уровне каспазы-9, посредством активации синтетической суицидной конструкции iCasp9. Понимание процессов, снижающих эффективность данной конструкции, имеет важное клиническое значение, учитывая, что модификация иммунотерапевтических клеток с использованием iCasp9 уже применяется в терапии. В то же время, раскрытие механизмов, противодействующих направленной элиминации клеток, опосредованной этой системой, необходимо для поиска путей восстановления её функции и для прогнозирования работоспособности в различных условиях. С другой стороны, изучение неканонической функции теломеразы, заключающейся в противодействии клеточной гибели, представляет двойной интерес. Во-первых, это важно для получения высокоактивных и длительно персистирующих терапевтических НК-клеток. Во-вторых, с фундаментальной точки зрения, это способствует пониманию роли гиперэкспрессии hTERT в обеспечении выживаемости опухолевых клеток при действии на них лекарственных агентов.

*Основные положения, выносимые на защиту*

1. hTERT-iCasp9-NK-клетки обладают повышенной выживаемостью, наряду с сохранением пролиферативной и функциональной активности в течение 2 месяцев;
2. hTERT-iCasp9-NK-клетки устойчивы к развитию истощения в условиях длительной цитокиновой стимуляции в сравнении с NK-клетками, не подвергнутыми модификации, либо трансдуцированными одним из данных трансгенов;
3. Оверэкспрессия hTERT вызывает снижение эффективности направленной элиминации iCasp9-индуцированной клеточной гибели при добавлении CID;
4. NK-клетки, выжившие после обработки CID ((CID)-iCasp9-NK-клетки) и устойчивые (hTERT-iCasp9-NK-клетки) к индукции апоптоза димеризатором, характеризуются наличием повышенной экспрессии генов, способствующих прохождению клеточного цикла, и схожих альтернативно сплайсированных транскриптов.

*Апробация работы*

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: I Конгресс Национального общества трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, генной и клеточной терапии, 18-20 сентября 2025 г., Санкт-Петербург, Россия; VI Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 13-15 ноября 2024 г., Санкт-Петербург, Россия; Biomembranes 2024, 7-11 октября 2024 г., Долгопрудный, Московская область, Россия; V Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 23 - 25 ноября 2022 г., Москва, Россия; 45th FEBS Congress, «Молекулы жизни: навстречу новым горизонтам», 3-8 июля 2021 г., Любляна, Словения; XXXIII, XXXIV и XXXV Зимние молодежные научные школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2021, 2022, 2023 г., Москва, Россия).

По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах и 8 тезисов.

*Структура диссертации*

Диссертационная работа изложена на 149 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка цитируемой литературы, включающего 351 ссылку, и дополнена списком сокращений. Диссертация содержит 27 рисунков и 4 таблицы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен описанию фенотипических и функциональных характеристик NK-клеток, а также возможности их генетической модификации. Во втором разделе собрана информация об основных внутриклеточных молекулярных путях регулируемой клеточной гибели. В третьем разделе обобщены современные представления о роли каталитической субъединицы теломеразы человека в регуляции клеточной гибели.

### 2. Экспериментальная часть

#### 2.1. Оптимизация процедуры ретровирусной трансдукции первичных NK-клеток

С целью подбора оптимальных условий для модификации первичных NK-клеток мы провели оценку эффективности ретровирусной трансдукции на NK-клетках периферической крови и различных клеточных линиях: Raji, Jurkat и NKL, по которым далее рассчитывали значения MOI (Multiplicity of Infection) для NK-клеток. Для этого была использована конструкция, несущая гены *iCASP9* и *GFP* (Рисунок 1А). Эффективность трансдукции клеток линии Raji была выше в сравнении с другими тестируемыми линиями и NK-клетками (Рисунок 1Б). При этом, наибольший титр работоспособных вирусных частиц был получен для супернатантов, собранных через 48 ч после трансфекции кальций-фосфатным методом клеток упаковочной линии Phoenix Ampho.

Далее была оценена восприимчивость к ретровирусной трансдукции субпопуляций NK-клеток CD57<sup>-</sup> KIR2DL2/3 (KIR)<sup>+/-</sup> и NKG2C<sup>+/-</sup>, различающихся по уровню дифференцированности; где KIR2DL2/3<sup>-</sup> и NKG2C<sup>-</sup> являются наименее дифференцированными, а KIR2DL2/3<sup>+</sup> и NKG2C<sup>+</sup> – наиболее зрелыми. Было показано, что эффективность модификации увеличивается по мере дифференцировки NK-клеток (Рисунок 1В). Также мы подтвердили, что трансдуцированные NK-клетки сохраняют экспрессию трансгена более 2 недель после проведения процедуры трансдукции, однако уровень интенсивности экспрессии снижается в первые дни после трансдукции, что может быть связано со спонтанной димеризацией iCasp9 при высоких внутриклеточных концентрациях (Рисунок 1Г).

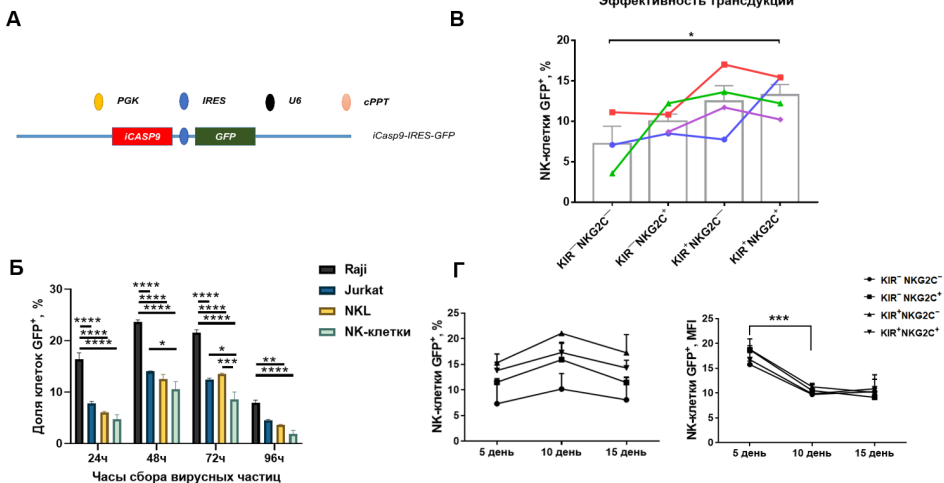


Рисунок 1. Выявление факторов, влияющих на эффективность ретровирусной трансдукции NK-клеток. А) Генетическая конструкция с генами *iCASP9* и *GFP*, используемая в экспериментах. Б) Эффективность трансдукции клеточных линий Raji (n=3), Jurkat (n=3) и NKL (n=3) и первичных NK-клеток (n<sub>доноров</sub>=4) для вирусных частиц, собранных через 24, 48, 72 или 96 ч после процедуры трансфекции. В) Эффективность трансдукции субпопуляций NK-клеток, отличных по CD57<sup>-</sup> KIR2DL2/DL3<sup>+/-</sup> NKG2C<sup>+/-</sup> (n<sub>доноров</sub>=4). Г) Динамика соотношения *iCasp9*-NK-клеток GFP<sup>+</sup> и NK-клеток GFP<sup>-</sup> (левый график) и уровня интенсивности флуоресценции GFP (правый график) субпопуляций NK-клеток CD57<sup>-</sup> KIR2DL2/DL3<sup>+/-</sup> NKG2C<sup>+/-</sup> (n<sub>доноров</sub>=2). p-value: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001

## 2.2. Получение NK-клеток, модифицированных генами *hTERT* и *iCASP9*

Нами проведена трансдукция NK-клеток ретровирусными частицами, несущими гены *hTERT* и *iCASP9* (Рисунок 2А). Наличие экспрессии трансгенов было подтверждено методом количественной ПЦР (qPCR) на NK-клетках, отсортированных по наличию флуоресценции GFP. Уровень экспрессии *hTERT* был выше в *hTERT*-NK-клетках и *hTERT-iCasp9*-NK-клетках по сравнению с нетрансдуцированными и *iCasp9*-NK-клетками. Экспрессия гена *iCASP9* была подтверждена в *hTERT-iCasp9*-NK-клетках и *iCasp9*-NK-клетках, тогда как в *hTERT*-NK-клетки и нетрансдуцированные NK-клетки не экспрессировали *iCASP9* (Рисунок 2Б). Повышение уровня каталитической активности теломеразы также наблюдалось среди NK-клеток, модифицированных соответствующим геном, по

сравнению с нетрансдуцированными и iCasp9-NK-клетками (Рисунок 2В).

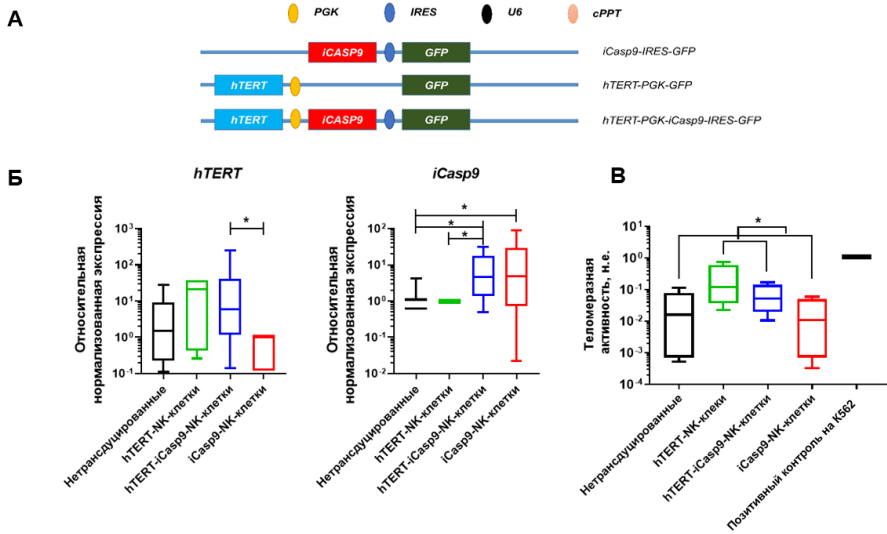


Рисунок 2. Ретровирусная трансдукция NK-клеток генами *hTERT* и/или *iCASP9*. А) Генетические конструкции с генами *hTERT* и/или *iCASP9*, используемые в экспериментах. Б) Уровень экспрессии трансгенов *hTERT* и *iCASP9*, нормализованный на уровень экспрессии референсного гена *ACTB*, оценивался методом qPCR ( $n_{\text{доноров}}=7$ ). В) Активность теломеразы в модифицированных NK-клетках, определённая с помощью анализа qTRAP ( $n_{\text{доноров}}=4$ ). p-value: \*  $p<0,05$ .

### 2.3. Изучение развития функционального истощения hTERT-модифицированных NK-клеток при их длительной культивации

Чтобы выяснить, предотвращает ли гиперэкспрессия теломеразы развитие истощения в клетках мы провели серию экспериментов по изучению пролиферативной и функциональной активности hTERT- и/или iCasp9-модифицированных NK-клеток в течении 3 месяцев. А также сравнили уровни экспрессии набора генов, кодирующих факторы апоптотического каскада и поверхностные маркеры активации и истощения NK-клеток. Мы оценили изменения во времени уровней экспрессии транскрипционных факторов Eomes и T-Bet, регулирующих основные функциональные свойства NK-клеток (Рисунок 3).



Рисунок 3. Дизайн эксперимента, представленный на временной шкале.

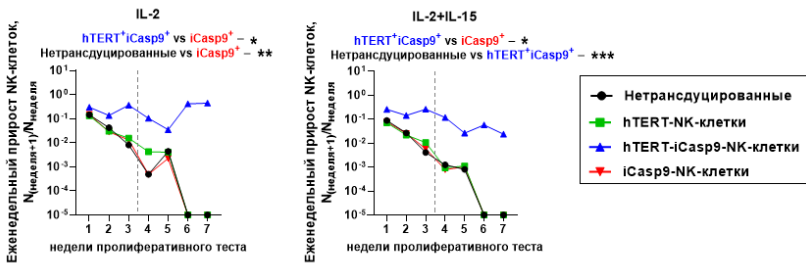
#### 2.4. *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетки характеризуются интенсивной пролиферацией и выживаемостью в различных условиях

Чтобы изучить, как введение генов *hTERT* и *iCASP9* в NK-клетки влияет на их способность к продолжительной пролиферации, мы отслеживали общее количество клеток, интенсивность пролиферации и долю живых клеток в популяциях нетрансдуцированных NK-клеток, *hTERT*-NK-клеток, *hTERT*-*iCasp9*-NK-клеток и *iCasp9*-NK-клеток. В условиях стимуляции цитокинами (IL-2 или IL-2+IL-15), *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетки демонстрировали повышенный уровень выживаемости и пролиферативной активности в сравнении с нетрансдуцированными NK-клетками или NK-клетками, трансдуцированными одним из генов (Рисунок 4А). Вместе с тем, *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетки характеризовались пониженной экспрессией KLRG-1, TIM-3 и TIGIT при стимуляции IL-2+IL-15 (Рисунок 4Б). Анализ внутриклеточного содержания транскрипционных факторов Eomes и T-Bet выявил наличие транген-опосредованных изменений. В *hTERT*-модифицированных клетках (*hTERT*-NK-клетках и *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетках) наблюдались наибольшие доли клеток, относящихся к высокоактивной популяции Eomes<sup>+</sup> T-Bet<sup>+</sup>, тогда как *iCasp9*-модифицированные клетки (*hTERT*-*iCasp9*-NK-клетки и *iCasp9*-NK-клетки) характеризовались увеличенной долей популяции Eomes<sup>+</sup> T-Bet<sup>-</sup> (Рисунок 4В).

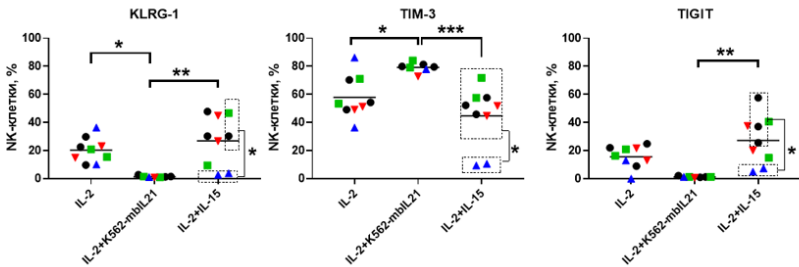
Ежемесячное внесение фидерных клеток K562-mbIL21 повышало выживаемость и пролиферативную активность NK-клеток по сравнению с клетками, стимулированными только цитокинами (Рисунок 5А, Б). Вне зависимости от вида трансгена, *hTERT* и/или *iCASP9*, NK-клетки, стимулированные IL-2+K562-mbIL21, характеризовались высоким содержанием клеток, экспрессирующих активирующие рецепторы CD16, HLA-DR, NKp30, NKp44 и NKp46 (Рисунок 5В), и низкой долей клеток, несущих маркеры KLRG-1, PD-1, CD57 и TIGIT, которые ассоциированы с клеточным истощением (Рисунок 4Б, 5В). Стимуляция фидерными клетками K562-mbIL21 обеспечивала

поддержанию фракции функционально активных клеток  $Eomes^{+}T-Bet^{+}$  (Рисунок 5Г).

**А**



**Б**



**В**

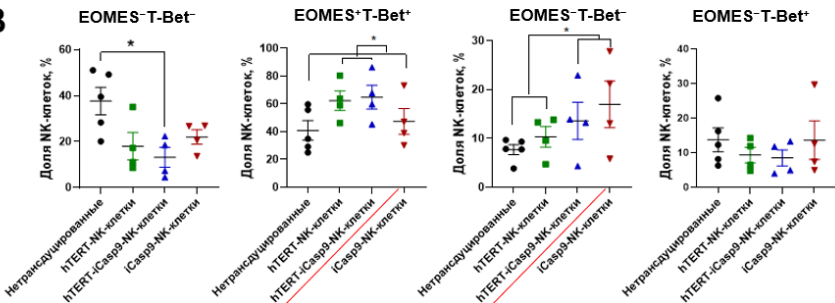


Рисунок 4. Анализ NK-клеток, модифицированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*, которые были стимулированы IL-2, IL-2+IL-15, IL-2+K562-mbIL21. А) Ежедневный прирост  $N_{(неделя+1)}/N_{неделя}$  NK-клеток, культивируемых в течение одного месяца ( $n_{\text{доноров}}=7$ ). Б) Уровни экспрессии иммунных контрольных точек TIM-3, TIGIT и KLRG-1 ( $n_{\text{доноров}}=3$ ). Пунктирные рамки обозначают сравниваемые группы. В) Распределение субпопуляций NK-клеток  $Eomes^{+/-}T-Bet^{+/-}$ , культивируемых в течение 1 месяца от выделения ( $n_{\text{доноров}}=4$ ). p-value: \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

Таким образом, *hTERT-iCasp9*-NK-клетки демонстрировали повышенную жизнеспособность, сохраняя при этом пролиферативную и функциональную активность на протяжении двух месяцев в условиях продолжительной стимуляции





Как в дегрануляционном тесте (Рисунок 7А, Б), так и при анализе цитокин-опосредованной продукции  $IFN-\gamma$  (Рисунок 7Б), нам не удалось выявить достоверных трансген-опосредованных эффектов в функциональной активности НК-клеток. Тем не менее, в hTERT-iCasp9-NK-клетках был повышен базовый уровень дегрануляции (доли клеток LAMP-1<sup>+</sup> в отсутствие клеток K562), что могло свидетельствовать об их повышенном уровне базальной активации (Рисунок 7А, 4Б).

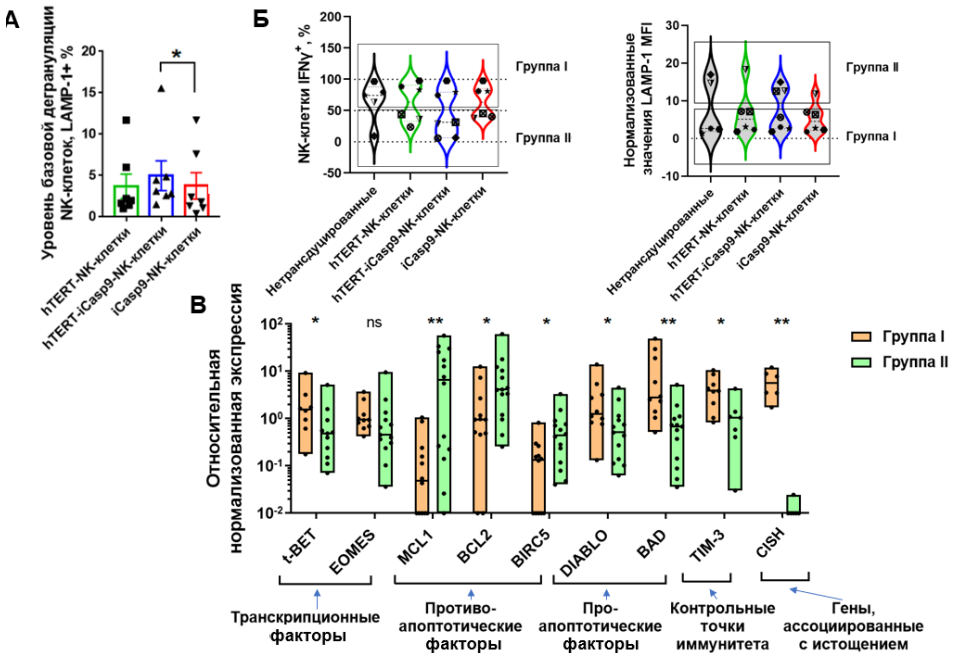


Рисунок 7. Функциональная активность hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток, iCasp9-NK-клеток. А) Доля дегранулирующих НК-клеток LAMP-1<sup>+</sup> в образцах без добавления клеток K562 (базовый уровень,  $n_{\text{доноров}}=7$ ). Б) Доля НК-клеток, накапливающих  $IFN-\gamma$  в ответ на цитокины IL-2, IL-12 и IL-18 (слева,  $n_{\text{доноров}}=7$ ). Интенсивность дегрануляции в ответ на распознавание клеток-мишеней K562, измеренная по средней интенсивности флуоресценции, нормализованной по базальному уровню дегрануляции (справа,  $n_{\text{доноров}}=7$ ). Клетки также были разделены на группы I и II. В) Нормализованные уровни экспрессии мРНК генов *EOMES* и *TBX21*, *BCL2*, *MCL1*, *BIRC5*, *BAD*, *DIABLO*, *TIM3* и *CISH* для НК-клеток группы I и II ( $n_{\text{доноров}}=7$ ). p-value: \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ .

По уровню цитокин-зависимой продукции  $IFN-\gamma$  НК-клетки могли быть разделены почти равномерно на две группы (группа I:  $IFN-\gamma>50\%$  и группа II:  $IFN-\gamma<50\%$ ),

причём такое разделение было характерно для всех популяций, вне зависимости от типа трансгена, а также для немодифицированных НК-клеток (Рисунок 7А). В тесте на дегрануляцию группа I соответствовала слабо дегранулировавшим клеткам с  $MFI < 5$ , тогда как группа II характеризовалась  $MFI > 5$  (Рисунок 7Б). Такая группировка позволила нам определить прогностические факторы для оценки функционального состояния изученных типов НК-клеток. В частности, было выявлено, что НК-клетки группы I, в отличие от группы II, характеризуются более высокими уровнями экспрессии *TBX21*, *DIABLO*, проапоптотических факторов *BAD*, иммунных контрольных точек *TIM3* и *CISH*, связанных с истощением, и более низкими уровнями экспрессии генов *MCL1*, *BCL2* и *BIRC5*, обеспечивающих выживание (Рисунок 7В).

## **2.6. Изучение эффективности направленной элиминации iCasp9-клеток**

### **2.6.1. Уровень экспрессии трансгена и время инкубации с димеризатором влияет на эффективность направленной элиминации iCasp9-клеток**

Изучение эффективности направленной элиминации первоначально проведено на клетках линии Raji, модифицированных конструкцией, содержащей гены *iCASP9* и *GFP* (Рисунок 8А). С помощью клеточной сортировки были получены популяции клеток iCasp9-Raji с разным средним уровнем флуоресценции (MFI) репортерного белка GFP: “High 1” (MFI:  $8266 \pm 94,42$  SEM), “High 2” (MFI:  $7564 \pm 93,45$  SEM) и “Low” (MFI:  $3118 \pm 75,61$  SEM), которые затем были проинкубированы с разными концентрациями димеризатора CID. Доза 10 nM CID приводила к запуску апоптоза клеток iCasp9-Raji, и увеличение концентрации димеризатора дополнительно не снижало клеточную жизнеспособность клеток при инкубации 24 ч. При этом, эффективность действия CID зависела от уровня экспрессии трансгена в клетках.

Затем, была проанализирована возможность индукции клеточной гибели в iCasp9-модифицированных НК-клетках (Рисунок 8В, Г). Мы подтвердили, что присутствие ДМСО в среде не влияет на выживаемость клеток (Рисунок 8В). Добавление CID приводило к уменьшению доли НК-клеток GFP<sup>+</sup> в смешанной популяции клеток GFP<sup>+</sup> и GFP<sup>-</sup> после трансдукции (Рисунок 8В). Концентрация CID и продолжительность инкубации влияли на долю живых iCasp9-НК-клеток, при этом самый высокий процент мёртвых клеток наблюдался у iCasp9-НК-клеток, инкубированных со 100 nM CID в течение 24 ч (Рисунок 8Г), поэтому данные условия были выбраны для последующих тестов.

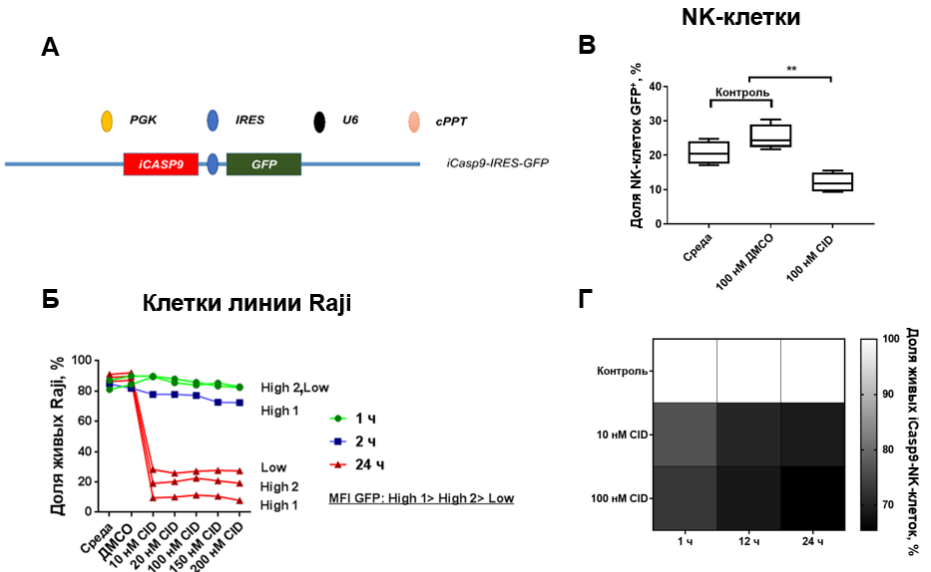


Рисунок 8. Индукция апоптоза в *iCasp9*-NK-клетках и *iCasp9*-Raji химическим индуктором димеризации (CID). А) Генетическая конструкция с генами *iCASP9* и *GFP*, используемая в экспериментах. Б) Изучение эффективности направленной элиминации клеток *iCasp9*-Raji, отсортированных по средним уровням флуоресценции GFP на “High 1”, “High 2” и “Low”. В) Доля NK-клеток GFP<sup>+</sup> в смешанной культуре GFP<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> после 24 ч инкубации со средой, содержащей ДМСКО и 100 нМ CID, ( $n_{\text{доноров}}=3$ ). Г) Сравнение доли живых *iCasp9*-NK-клеток, нормализованной на долю живых клеток в контроле, после инкубации в течение 1, 12 и 24 ч с CID 10 нМ и 100 нМ ( $n_{\text{доноров}}=2$ ).

### 2.6.2. hTERT-*iCasp9*-NK-клетки более устойчивы к индукции апоптоза при инкубации с CID по сравнению с *iCasp9*-NK-клетками

Чтобы исследовать эффекты трансгенов *hTERT* и *iCASP9* на выживаемость NK-клеток, нами была проанализирована эффективность направленной элиминации трансдуцированных NK-клеток. Вклад неканонических функций *hTERT* в эти эффекты был оценен, с использованием доминантно-негативной формы DN-*hTERT*. Сравнение проводилось в 5 субпопуляциях: нетрансдуцированных NK-клетках, *hTERT*-NK-клетках, *iCasp9*-NK-клетках, *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетках и DN-*hTERT*-*iCasp9*-NK-клетках (Рисунок 9А). Ни *hTERT*-NK-клетки, ни нетрансдуцированные NK-клетки не подвергались апоптозу при инкубации с CID. Несмотря на то, что *hTERT*-*iCasp9*-NK-клетки и *iCasp9*-NK-клетки продемонстрировали сопоставимые уровни экспрессии трансгена *iCASP9* (Рисунок

2Б), было показано, что hTERT-iCasp9-NK-клетки более устойчивы к индукции апоптоза, опосредованной iCasp9, при инкубации с CID по сравнению с iCasp9-NK-клетками (Рисунок 9Б).

Принимая во внимание, что оверэкспрессия hTERT может противодействовать индукции клеточной гибели, мы решили определить возможную роль неканонических функций, опосредованных каталитической субъединицей теломеразы, в выживании NK-клеток. DN-hTERT-iCasp9-NK-клетки, а также hTERT-iCasp9-NK-клетки проявляли устойчивость к индукции клеточной гибели при обработке CID в концентрациях 10 нМ и 100 нМ (Рисунок 9Б). Полученные результаты подтвердили идею о том, что неканонические функции hTERT могут противодействовать апоптозу, вызванному iCasp9 при добавлении CID.

Учитывая, что hTERT может модулировать уровни транскрипции генов в NK-клетках, мы исследовали транскриптомные изменения в модифицированных клетках с использованием РНК-секвенирования для более глубокого понимания возможных причин повышенной выживаемости hTERT-iCasp9-NK-клеток при добавлении CID. Было исследовано 3 варианта модифицированных NK-клеток: “устойчивые” hTERT-iCasp9-NK-клетки, “восприимчивые” iCasp9-NK-клетки и “выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки (iCasp9-NK-клетки, которые не элиминировались после 24 ч воздействия с CID в концентрации 100 нМ).

Все измерения индукции апоптоза CID были проведены одновременно со сбором образцов для транскриптомного анализа, а именно, через месяц после выделения NK-клеток из периферической крови. Сначала мы сравнили (CID)-iCasp9-NK-клетки с iCasp9-NK-клетками. Было выявлено 402 дифференциально экспрессируемых гена (DEGs) ( $p\text{-adj} < 0,05$  и  $\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0,58$ ), из которых 251 DEGs характеризовались повышенным уровнем экспрессии (upDEGs), а 151 DEGs – пониженным (downDEGs). “Выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки демонстрировали большое количество DEGs, участвующих во внутриклеточных сигнальных путях, активированных в ответ на разрушительные эффекты iCasp9 (Рисунок 9В).

В результате сравнения hTERT-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками были выявлены особенности hTERT-iCasp9-NK-клеток, определяющие их повышенную выживаемость. Мы определили 63 upDEGs и 13 downDEGs (Рисунок 9Г). Оверэкспрессия hTERT была ассоциирована с усилением экспрессии генов, стимулирующих клеточный цикл, активирующих транскрипцию и модулирующих сплайсинг в NK-клетках (Рисунок 9Г).

Мы провели параллельное сравнение транскриптомных данных 1) (CID)-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками и 2) hTERT-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками. (CID)-iCasp9-NK-клетки активировали множество генов,

участвующих в связывании ДНК и репликации ДНК. Для hTERT-iCasp9-NK-клеток большое количество DEGs соответствовало путям, регулирующим клеточный цикл и деление клеток. В целом, большинство DEGs, наблюдаемых в обеих группах, относятся к внутриядерным белкам, кодирующим транскрипты (Рисунок 9В, Г).

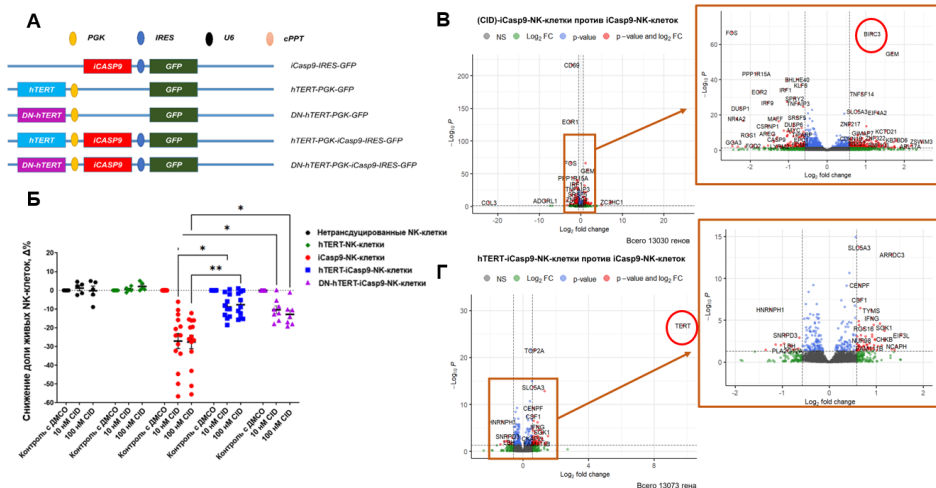


Рисунок 9. Оценка эффективности индукции клеточной гибели суицидальной конструкцией iCasp9 в NK-клетках, трансдуцированных генами *iCASP9*, *hTERT* и *DN-hTERT*. А) Генетические конструкции, используемые в экспериментах. Б) Снижение доли живых NK-клеток после обработки 10 нм и 100 нм CID в течение 24 ч нормализовалось по проценту живых NK-клеток в контрольной группе с ДМСО ( $n$  Нетрансдуцированные=5,  $n$  hTERT-NK-клетки=4,  $n$  iCasp9-NK-клетки=14,  $n$  hTERT-iCasp9-NK-клетки=11,  $n$  DN-hTERT-iCasp9-NK-клетки=8). Вулкан сравнения: В) “выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки vs “восприимчивые” iCasp9-NK-клетками; Г) “устойчивые” hTERT-iCasp9-NK-клетки vs “восприимчивые” iCasp9-NK-клетками.  $p$ -adj<0,05 и abs(Log<sub>2</sub>FC)>0,58.

В более детальном анализе определены отличия в уровне экспрессии про- и противоапоптотических генов в (CID)-iCasp9-NK-клетках по сравнению с iCasp9-NK-клетками. Среди генов, ассоциированных с гибелью клеток, были повышены уровни экспрессии генов, ассоциированных с TNF-сигналингом, кодирующих BИМ (*BCL2L11*), каспазы-3, -2 и -10, в то время как уровень каспазы-9 был снижен. Среди генов, способствующих выживанию, ген *NFKB1* и его мишени *BIRC3* и *TRAF2* также были активированы (Рисунок 10А). При сравнении hTERT-iCasp9-NK-клеток и iCasp9-NK-клеток также был повышен уровень *BIRC3*. Мы также сравнили уровни транскриптов *BIRC3* в NK-клетках с помощью qPCR. Экспрессия

*BIRC3* была повышена в НК-клетках с оверэкспрессией hTERT по сравнению с нетрансдуцированными и iCasp9-модифицированными НК-клетками (Рисунок 10Б). Поскольку iCasp9 действует на поздних стадиях апоптоза, повышенная экспрессия *BIRC3* (кодирующего с-IAP2) может препятствовать апоптозу, индуцированному каспазой-9, и способствовать устойчивости НК-клеток к гибели, опосредованной iCasp9. Мы встроили конструкцию *U6-shBIRC3-cPPT* в существующие векторы для снижения уровня транскрипта *BIRC3* в модифицированных НК-клетках (Рисунок 10В). НК-клетки, модифицированные *shBIRC3* и генами *iCASP9*, *hTERT* и *DN-hTERT*, обрабатывали 10 нМ и 100 нМ CID в течение 24 ч и оценивали индукцию в них клеточной гибели. Однако, значительных различий по уровню апоптоза после инкубации с CID между *shBIRC3*-модифицированными клетками и соответствующими контрольными клетками не наблюдалось (Рисунок 10Г). Эти результаты позволяют предположить, что различные неканонические функции hTERT помимо регуляции уровней *BIRC3* модулируют выживаемость клеток, защищая НК-клетки.

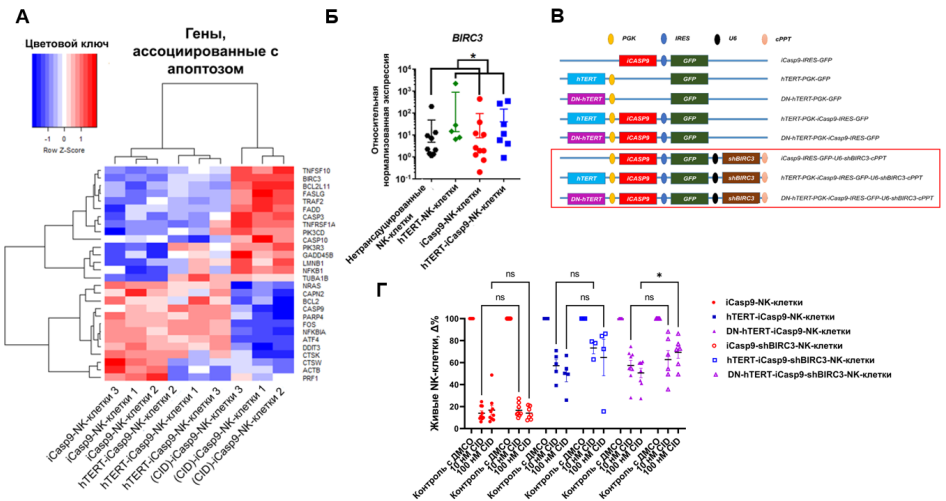


Рисунок 10. Исследование индукции клеточной гибели, опосредованной iCasp9, в НК-клетках с нокаутом *BIRC3*. А) Нормализованные значения количества генов, соответствующих пути апоптоза "KEGG: Hsa04210" с  $p\text{-adj} < 0,05$ , из сравнения (CID)-iCasp9-НК-клеток с iCasp9-НК-клетками, для всех популяций НК-клеток нанесены на тепловую карту. Представлены нормализованные данные в каждой строке (Z-score). Красный обозначает транскрипты с повышенной экспрессией, а синий – с пониженной экспрессией. Б) Относительная мРНК-экспрессия гена *BIRC3* в популяциях ( $n_{\text{Нетрансдуцированные}}=9$ ,  $n_{\text{hTERT-НКклетки}}=5$ ,  $n_{\text{iCasp9-}}$

НК-клетки=10,  $n_{\text{hTERT-iCasp9-НК-клеток}}=7$ ). В) Исползованные генетические конструкции, содержащие гены *iCASP9*, *hTERT* и *DN-hTERT* и дополнительную конструкцию *shBIRC3*. Г) Снижение доли живых НК-клеток после 10 нм и 100 нм CID-обработки в течение 24 ч нормализовалось по количеству и процентному содержанию живых НК-клеток в контрольной группе с ДМСО ( $n_{\text{iCasp9-НК-клетки}}=9$ ,  $n_{\text{hTERT-iCasp9-НК-клеток}}=5$ ,  $n_{\text{DN-hTERT-iCasp9-НК-клетки}}=9$ ,  $n_{\text{iCasp9-shBIRC3-НК-клетки}}=8$ ,  $n_{\text{hTERT-iCasp9-shBIRC3-НК-клеток}}=3$ ,  $n_{\text{DN-hTERT-iCasp9-shBIRC3-НК-клетки}}=6$ ).

### 2.6.3. hTERT-iCasp9-НК-клетки и (CID)-iCasp9-НК-клетки имеют общие транскриптомные паттерны

Принимая во внимание, что конструкция *shBIRC3* существенно не улучшала эффективность индукции гибели клеток, опосредованной *iCasp9*, при инкубации с CID, мы решили исследовать другие пути и гены, которые были представлены среди “выживших” и “устойчивых” клеток, с помощью анализа транскриптома.

Поскольку (CID)-*iCasp9*-НК-клетки и *hTERT-iCasp9*-НК-клетки изменили свой транскриптомный профиль разнонаправленно по сравнению с *iCasp9*-НК-клетками, мы решили сосредоточить наше исследование на общих сигнатурах между (CID)-*iCasp9*-НК-клетками и *hTERT-iCasp9*-НК-клетками, чтобы предположить факторы, обеспечивающие повышенную выживаемость НК-клеток при добавлении CID. Затем из данных, полученных при сравнении (CID)-*iCasp9*-НК-клеток с *iCasp9*-НК-клетками и *hTERT-iCasp9*-НК-клеток с *iCasp9*-НК-клетками, были выделены пути, действующие аналогичным образом (активация или подавление).

Мы сравнили полученные DEGs с использованием диаграммы Венна. 1096 генов с  $p\text{-adj}<0,05$  из сравнения (CID)-*iCasp9*-НК-клеток и *iCasp9*-НК-клеток были противопоставлены 266 генам с  $p\text{-adj}<0,05$  из сравнения *hTERT-iCasp9*-НК-клеток и *iCasp9*-НК-клеток. 126 генов были общими для НК-клеток, устойчивых к индукции апоптоза, опосредованной *iCasp9*. Мы определили повышение экспрессии 17 генов в обоих сравнениях (Рисунок 11А) и 2 общих гена, с пониженным уровнем экспрессии, которые отвечают за обработку РНК в рибонуклеопротеиновых частицах (Рисунок 11Б). Было обнаружено, что общие активированные гены участвуют в биологических процессах, таких как деление и миграция клеток. Так, метаболические пути, связанные с миграцией клеток, были подавлены, в то время как пути, связанные с прогрессированием клеточного цикла, были усилены (Рисунок 11В).

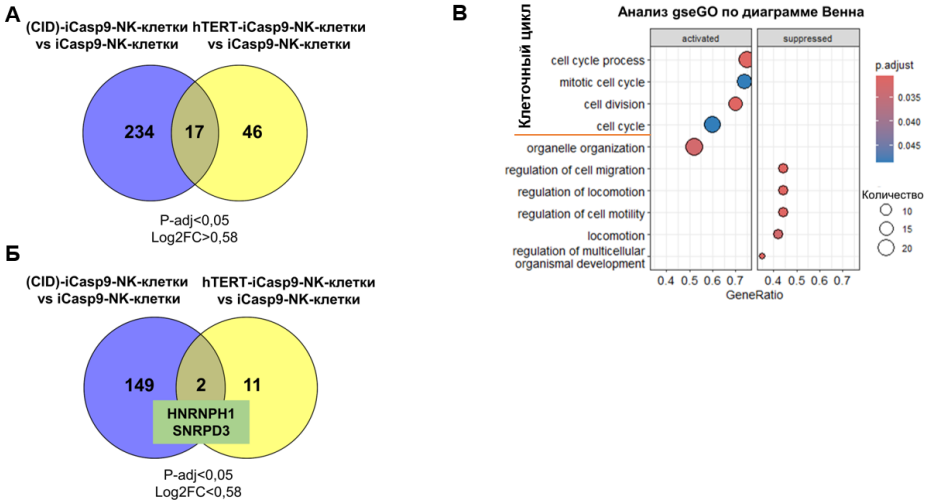


Рисунок 11. Представление данных транскриптомного анализа “устойчивых” iCasp9-hTERT-NK-клеток и “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток против “восприимчивых” iCasp9-NK-клеток. Двухкруговые диаграммы Венна для общих значений А) upDEGs ( $p\text{-adj} < 0,05$  и  $\text{Log}_2\text{FC} > 0,58$ ) и Б) downDEGs ( $p\text{-adj} < 0,05$  и  $\text{Log}_2\text{FC} < 0,58$ ). В) Общие 126 генов DE с  $p\text{-adj} < 0,05$  из обоих сравнений были проанализированы с помощью пакета gseGO. Представлены GO биологические процессы (BP). Чем больше размер круга, тем больше число генов, вовлечённых в процесс. Круги окрашены в соответствии со значениями  $p\text{-adjusted}$ . На оси X показаны подавленные и активированные пути.

#### 2.6.4. “Выжившие” и “устойчивые” клетки обладали схожими альтернативно сплайсированными транскриптами

Функциональное состояние клеточных белков зависит не только от изменения уровня экспрессии транскриптов. Важную роль играют также изоформы, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга, которые определяют количество, структуру и свойства синтезируемого белка. Чтобы исследовать изменения, связанные со сплайсингом, которые могут влиять на выживаемость клеток, мы провели анализ вариантов изоформ транскриптов в группах сравнения: (CID)-iCasp9-NK-клетки vs iCasp9-NK-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клетки vs iCasp9-NK-клеток. Мы также сравнили hTERT-NK-клетки с iCasp9-NK-клетками, чтобы подтвердить роль избыточной экспрессии hTERT в изменениях сплайсинга. Для всех трёх групп сравнения мы определили 5 общих альтернативно сплайсированных транскриптов (SUPT4H1, RFC3, SRSF3, TAPBPL, RPN2) с изменённой экспрессией по сравнению с iCasp9-NK-клетками, что может быть

связано с повышенным уровнем теломеразы в клетках (Рисунок 12). Эти гены в первую очередь участвуют в фундаментальных процессах экспрессии генов и клеточного метаболизма. В совокупности они играют ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, реакции на стресс и целостности генома. Мы также наблюдали изоформы, чувствительные к NMD (нонсенс-опосредованный распад), которые подвержены деградации. Таким образом, мы определили профиль по-разному экспрессируемых изоформ сплайсинга, баланс которых определяет уровни экспрессии функциональных белков.

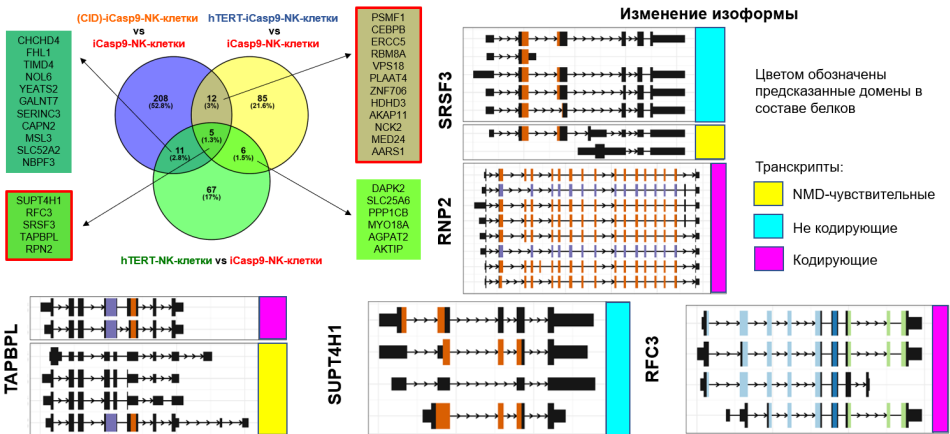


Рисунок 12. Поиск общих альтернативно сплайсированных транскриптов в популяциях трансдуцированных NK-клеток. Представлены репрезентативные графики для генов из пересечения трех сравнений. Верхние графики представляют наиболее распространённые изоформы, обнаруженные с некоторыми выделенными доменами.

### 3. Выводы

1. Получены НК-клетки, трансдуцированные генами *hTERT* и *iCASP9*;
2. Показана hTERT-опосредованная модуляция экспрессии генов, связанных с повышенной выживаемостью и сохранением пролиферативной активности клеток в течение 2 месяцев;
3. hTERT-iCasp9-НК-клетки в наименьшей степени подвергались истощению при цитокиновой стимуляции в сравнении с НК-клетками немодифицированными или трансдуцированными одним из трансгенов;
4. Добавление CID к iCasp9-клеткам индуцирует апоптоз, но эффективность направленной элиминации варьирует в популяциях НК-клеток и снижается при оверэкспрессии hTERT;
5. НК-клетки, выжившие после обработки CID ((CID)-iCasp9-НК-клетки) и устойчивые (hTERT-iCasp9-НК-клетки) к индукции апоптоза димеризатором, характеризуются наличием повышенной экспрессии генов, способствующих прохождению клеточного цикла, и схожих альтернативно сплайсированных транскриптов.

#### 4. Заключение

Мы получили первичные НК-клетки человека, модифицированные генами *hTERT* и *iCASP9*, с целью получить длительно пролиферирующие НК-клетки наряду с возможностью направленной элиминации модифицированных клеток. *hTERT-iCasp9*-НК-клетки показали значительно более высокую скорость пролиферации по сравнению с *iCasp9*-НК-клетками и тенденцию к увеличению продолжительности жизни по сравнению с НК-клетками, трансдуцированными только одним из трансгенов. Такой эффект может быть достигнут за счёт одновременного действия обоих трансгенов, где *hTERT* способствует выживанию благодаря своим каноническим и неканоническим функциям, а *iCasp9* обеспечивает отбор наиболее “живых” НК-клеток путём спонтанной димеризации. Однако точное влияние конструкции *iCasp9* на выживаемость НК-клеток всё ещё требует изучения. Функциональная активность НК-клеток зависела от уровня экспрессии T-Bet у каждого донора на момент 1 месяца культивирования. Показано, что *hTERT-iCasp9*-НК-клетки в наименьшей степени подвергались функциональному истощению при цитокиновой стимуляции в сравнении с другими популяциями НК-клеток. Были прослежены *hTERT*-опосредованные изменения транскриптомного профиля, модулирующие цитотоксическую и миграционную активность *hTERT*-оверэкспрессирующих клеток. Таким образом, трансдукция комбинации трансгенов *hTERT* и *iCASP9* может быть многообещающим подходом получения генно-инженерных НК-клеток для противоопухолевой терапии, а уровни экспрессии Eomes и T-Bet могут быть использованы в качестве предсказуемых маркеров для выбора наиболее эффективных методов культивирования и активации НК-клеток.

Сложное функциональное взаимодействие продуктов генов *hTERT* и *iCASP9* в НК-клетках снижает эффективность направленной индукции апоптоза. Мы обнаружили, что как оверэкспрессия *hTERT*, так и каталитически неактивного варианта DN-*hTERT*, придавала значительную устойчивость к индукции гибели клеток, опосредованной *iCasp9*, при инкубации с CID. Эта резистентность не зависела от неканонической функции *hTERT* в выживании клеток. Примечательно, что сходный транскриптомный профиль “устойчивых” и “выживших” клеток позволяет предположить, что оверэкспрессия *hTERT* ассоциирована с изменением экспрессии генов клеточного цикла и модуляции сплайсинга клеток, что свидетельствует в пользу наличия некоторого *hTERT*-опосредованного механизма ускользания от запуска апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект №075-15-2024-536).

## 5. Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Публикации в рецензируемых изданиях:

1. **Palamarchuk A.I.**, Ustiuzhanina M.O., Velichinskii R.A., Vavilova J.D., Grechikhina M.V., Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Interplay of telomerase non-canonical functions in NK cell resistance to iCasp9-mediated apoptosis. *Cell Death Discov.* (2026), DOI:10.1038/s41420-026-03183-y.
2. **Palamarchuk A.I.**, Ustiuzhanina M.O., Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Comparison of Functional and Proliferative Activity of hTERT-NK and iCasp9-NK Cells. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* (2025), 19 (3) 338–347. DOI:10.1134/S1990747825700291.
3. Streltsova M.A, **Palamarchuk A.I.**, Vavilova J.D., Ustiuzhanina M.O., Boyko A.A., Velichinskii RA, Alekseeva NA, Grechikhina MV, Shustova OA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Methodological Approaches for Increasing the Retroviral Transduction Efficiency of Primary NK Cells. *Curr Pharm Des* (2024), 30 (37) 2947–2958. DOI:10.2174/0113816128314633240724060916.
4. **Palamarchuk A.I.**, Kovalenko E.I., Streltsova M.A. The hTERT and iCasp9 Transgenes Affect EOMES and T-BET Levels in NK Cells and the Introduction of Both Genes Improves NK Cell Proliferation in Response to IL2 and IL15 Stimulation. *Biomedicines* (2024), 12 (3) 650. DOI:10.3390/biomedicines12030650.
5. **Palamarchuk A.I.**, Kovalenko E.I., Streltsova M.A. Multiple Actions of Telomerase Reverse Transcriptase in Cell Death Regulation. *Biomedicines* (2023), 11 (4) 1091. DOI:10.3390/biomedicines11041091.
6. Streltsova M.A., Boyko A.A., Ustiuzhanina M.O., **Palamarchuk A.I.**, Alekseeva N.A., Velichinskii R.A., Vavilova J.D., Grechikhina M.V., Sapozhnikov A.M., Deev S.M., Kovalenko E.I. Subpopulation Heterogeneity of NK Cells during the Genetic Modification for Subsequent Use in Targeted Therapy. *Dokl Biochem Biophys* (2022), 507 (1) 380–382. DOI:10.1134/S1607672922340142.
7. **Palamarchuk A.I.**, Alekseeva N.A., Streltsova M.A., Ustiuzhanina M.O., Kobzyeva P.A., Kust S.A., Grechikhina M.V., Boyko A.A., Shustova O.A., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. Increased susceptibility of the CD57<sup>+</sup> NK cells expressing KIR2DL2/3 and NKG2C to iCasp9 gene retroviral transduction and the relationships with proliferative potential, activation degree, and death induction response. *Int J Mol Sci* (2021), 22 (24). DOI:10.3390/ijms222413326.

### Тезисы на конференциях:

1. **А.И. Паламарчук**, Ю.Д. Вавилова, Е.И. Коваленко, М.А. Стрельцова // I Конгресс Национального общества трансплатации гемопоэтических стволовых клеток, генной и клеточной терапии, 18-20 сентября 2025 года, г.Санкт-Петербург, Россия. <https://congress.rusbmt.org/>. // Подходы к повышению эффективности

ретровирусной модификации НК-клеток с помощью ингибитора каспаз Ас-DEVD-СНО.

2. **Palamarchuk A.I.**, Streltsova M.A. // VI Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 13-15 ноября 2024 года, г.Санкт-Петербург, Россия. <https://congress.regmedru.com/ru/contacts>. // Оверэкспрессия каталитической субъединицы теломеразы hTERT приводит к повышению уровня экспрессии PIK3CD НК-клеток.

3. **Palamarchuk A.I.**, Streltsova M.A. // Biomembranes 2024, 7-11 октября 2024 года, г.Долгопрудный, Московская область, Россия. <https://biomembranes.events/2024/#rec731244962>. // The comparison of functional and proliferative activity between hTERT-NK cells versus iCasp9-NK cells.

4. **А.И. Паламарчук**, М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко // XXXV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 7-10 февраля 2023 года, г.Москва, Россия. <https://sec-ibch.ru/school2023> // Исследование роли оверэкспрессии hTERT в выживании НК-клеток, которые были дополнительно модифицированы суицидной конструкцией на основе каспазы-9 (iCasp9). Устный доклад, призёр.

5. **А.И. Паламарчук**, М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко // V Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине, 23-25 ноября 2022 года, г.Москва, Россия. <https://congress.regmedru.com/2022/ru/>. // Выявление факторов, ассоциированных с эффективностью запуска апоптоза химическим индуктором димеризации (CID) в НК-клетках, модифицированных геном индуцируемой каспазы 9 (iCasp9).

6. **А.И. Паламарчук**, М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко // XXXIV Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля 2022 года, г.Москва, Россия. <https://sec-ibch.ru/school2022>. // Переклонирование плазмиды pMSCV F del Casp 9. IRES GFP в pMSCV F del Casp 9. IRES BFP с целью проведения последующей трансдукции двух генов в НК клетки. Онлайн-доклад.

7. **Palamarchuk A.I.**, Streltsova M.A., Kovalenko E.I. // 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons, 3–8 июля 2021 года, г.Любляна, Словения. [https://www.febs-edu.eu/w/2021\\_Ljubljana/index.html](https://www.febs-edu.eu/w/2021_Ljubljana/index.html). // Retroviral modification of NK-cells with iCasp9 gene for their directed elimination. Онлайн-доклад.

8. **А.И. Паламарчук**, М.А. Стрельцова, Е.И. Коваленко // XXXIII Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля 2021 года, г.Москва, Россия. <https://sec-ibch.ru/school2021>. // Оптимизация процедуры ретровирусной трансдукции гена iCasp9 в НК клетки с целью их контролируемой элиминации. Онлайн-доклад.