

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Паламарчук Анастасия Игоревна

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

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Стрельцова Мария Алексеевна

Москва, 2026 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	10
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 НК-клетки.....	17
1.1.1 Активирующие и ингибирующие рецепторы НК-клеток.....	17
1.1.2 Функциональная активность НК-клеток	19
1.1.3 Транскрипционные факторы Eomes и T-Bet и их роль в созревании НК-клеток..	20
1.1.4 Генетическая модификация НК-клеток	23
1.1.5 Активация НК-клеток	24
1.2 Трансгены, регулирующие выживаемость терапевтических клеток.....	25
1.3 Основные внутриклеточные молекулярные пути регулируемой клеточной гибели.....	27
1.3.1 Внутренний путь апоптоза (intristic apoptosis).....	28
1.3.2 Внешний путь апоптоза (extristic apoptosis)	29
1.4 Роль TERT в регуляции клеточной гибели	31
1.4.1 Канонические функции TERT	31
1.4.2 Неканонические функции TERT	33
1.4.3 TERT напрямую или опосредованно способна изменять экспрессию генов различных сигнальных путей.....	34
1.4.4 Роль TERT в регуляции апоптоза в цитоплазме и митохондри	34
1.4.5 Влияние TERT на эффективность iCasp9	35
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Сборка плазмид.....	37
2.2 Клеточные линии	39
2.3. Выделение и стимуляция НК-клеток перед трансдукцией	39
2.3.1 Серологический статус hCMV и EBV.....	40
2.3.2. Генерация клонов и популяций НК-клеток.....	40
2.4 Производство ретровирусных частиц.....	41
2.5 Ретровирусная трансдукция.....	42
2.6 Культивирование трансдуцированных НК-клеток	42
2.7 Проточная цитометрия	43
2.7.1 Окрашивание поверхности.....	43
2.7.2 Анализ дегрануляции.....	44
2.7.3 Анализ цитокин-индуцированной продукции IFN- γ	44
2.7.4 Измерение количества клеток.....	45

2.8 Оценка каталитической активности hTERT в NK-клетках	45
2.9 Индукция клеточной гибели в iCasp9-NK-клетках химическим индуктором димеризации	45
2.10 Анализ экспрессии генов	46
2.10.1 Количественная полимеразная цепная реакция (qPCR).....	46
2.10.2 Транскриптомный анализ.....	48
2.11 Статистический анализ.....	49
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	50
3.1 Оптимизация процедуры ретровирусной трансдукции первичных NK-клеток.....	50
3.1.1 Время сбора вирусного супернатанта и тип модифицированной клетки существенно влияют на эффективность трансдукции	50
3.1.2 Эффективность трансдукции зависит от экспрессии KIR2DL2/3 и NKG2C, причём уровень трансдукции выше среди NK-клеток KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺	52
3.1.3 Проверка стабильности трансгена <i>iCASP9</i> в модифицированных NK-клетках путём мониторинга уровня экспрессии репортерного гена GFP	54
3.2 Одновременная доставка генов <i>hTERT</i> и <i>iCASP9</i> в NK-клетки	55
3.2.1 Получение NK-клеток, модифицированных генами <i>hTERT</i> и <i>iCASP9</i>	56
3.2.2 Изучение развития функционального истощения hTERT-модифицированных NK-клеток при их длительном культивировании	57
3.2.3 Клетки hTERT-iCasp9-NK характеризуются повышенной пролиферацией и выживаемостью в различных условиях	58
3.2.4 Оверэкспрессия hTERT в NK-клетках стимулирует прохождение клеточного цикла через модуляцию экспрессии генов	61
3.2.5 Уровни Eomes и T-Bet различаются у NK-клеток, модифицированных генами <i>hTERT</i> и/или <i>iCASP9</i>	62
3.2.6 NK-клетки сохраняли пропорцию субпопуляции Eomes ⁺ T-Bet ⁺ после 2 месяцев культивирования <i>in vitro</i> с IL-2+K562-mbIL21	64
3.2.7 Несмотря на сходные уровни экспрессии генов <i>EOMES</i> и <i>TBX21</i> , через два месяца после выделения <i>ex vivo</i> NK-клетки продемонстрировали увеличение экспрессии проапоптотических факторов и более истощённый фенотип	65
3.2.8 NK-клетки сохраняли поверхностную экспрессию активирующих рецепторов через два месяца после выделения <i>ex vivo</i>	67
3.2.9 Оверэкспрессия hTERT улучшает функциональную активность NK-клеток.....	69
3.2.10 Функциональная активность NK-клеток, трансдуцированных <i>hTERT</i> и/или <i>iCASP9</i> , опосредована донором	76
3.3 Изучение эффективности направленной элиминации в iCasp9-клетках.....	79
3.3.1 Эффективность направленной элиминации зависит от уровня экспрессии трансгена и времени инкубации с димеризатором в клетках iCasp9-Raji	79

3.3.2 Индукция апоптоза в ответ на химический индуктор димеризации в субпопуляциях CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ^{+/-} NKG2C ^{+/-} iCasp9-NK-клеток	80
3.3.3 hTERT-iCasp9-NK-клетки более устойчивы к индукции апоптоза при инкубации с CID по сравнению с iCasp9-NK-клетками	82
3.3.4 NK-клетки с различными типами трансгенов (<i>hTERT</i> , <i>hTERT+iCASP9</i> , <i>iCASP9</i>) по-разному регулируют выживаемость и апоптоз.....	83
3.3.5 “Выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки и “резистентные” hTERT-iCasp9-NK-клетки по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками имеют тенденцию активировать гены, связанные с клеточным циклом, в то время как повышенные уровни <i>BIRC3</i> , не являются единственным фактором, определяющим выживаемость NK-клеток после активации iCasp9.....	86
3.3.6 hTERT-iCasp9-NK-клетки и (CID)-iCasp9-NK-клетки о имеют общие транскриптомные паттерны	91
3.3.7 NK-клетки, устойчивые к индукции апоптоза, опосредованной CID, показали повышенную регуляцию генов, стимулирующих клеточный цикл.....	93
3.3.8 Выжившие и резистентные клетки были охарактеризованы несколькими альтернативно сплайсированными транскриптами	95
4. ОБСУЖДЕНИЕ	98
4.1 Оптимизация ретровирусной трансдукции	99
4.2 Изучение развития истощения у hTERT-трансдуцированных NK-клеток	102
4.3 Изучение пролиферативной активности модифицированных NK-клеток	104
4.3 Изучение эффективности направленной элиминации конструкцией iCasp9	112
ВЫВОДЫ	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
БЛАГОДАРНОСТИ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ДМСО – диметилсульфоксид

кДНК – комплементарная цепь ДНК

мРНК – матричная РНК

РТПХ – реакция "трансплантат против хозяина"

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity (антитело-зависимая клеточная цитотоксичность)

AARS1 – alanyl-tRNA synthetase 1 (аланил-тРНК-синтетаза 1)

AKAPs – A-kinase anchoring proteins (белки, закрепляющие А-киназу)

ALT – alternative lengthening of telomeres (альтернативное удлинение теломер)

APAF1 – apoptotic protease activating factor 1 (апоптоз-активирующий фактор 1)

ATM – ataxia telangiectasia mutated (атаксия-телеангиэктазия мутированный белок)

ATR – ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок)

Bad – BCL2 associated agonist of cell death (агонист гибели клеток, ассоциированный с BCL2)

Bak – BCL2 antagonist/killer (антагонист/киллер BCL2)

BARX2 – BARX homeobox 2 (BARX гомеобоксный белок 2)

Bax – BCL2 associated X protein (ассоциированный с BCL2 белок X)

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 (лимфома В-клеток 2)

Bcl-W – BCL2 like protein 2 (белок, подобный BCL2, W)

Bcl-X_L – B-cell lymphoma-extra large (лимфома В-клеток, увеличенная)

BECN1 – beclin 1 (беклин 1)

Bid – BH3 interacting domain death agonist (BH3-взаимодействующий агонист гибели)

BiKEs – bispecific killer cell engagers (биспецифические активаторы клеток-киллеров)

Bim – BCL2 like protein 11 (BCL2-взаимодействующий медиатор гибели клеток)

Bmf – Bcl2 modifying factor (модифицирующий фактор Bcl2)

CARD – caspase recruitment domain (домен рекрутирования каспаз)

c-FLIP – FLICE-like inhibitory protein (FLICE-подобный ингибиторный белок)

c-FLIP_L – long form of c-FLIP (длинная форма c-FLIP)

c-FLIP_S – short form of c-FLIP (короткая форма c-FLIP)

CEBPZ – CCAAT enhancer binding protein zeta (ССААТ/энхансер-связывающий белок дзета)

CHK1 – checkpoint kinase 1 (киназа контрольной точки 1)

CHK2 – checkpoint kinase 2 (киназа контрольной точки 2)

CID – chemical inducer of dimerization (химический индуктор димеризации)

CMV – cytomegalovirus (цитомегаловирус)

c-Myc – MYC proto-oncogene (прото-онкоген MYC)

DDR – DNA damage response (ответ на повреждение ДНК)

DEGs – differentially expressed genes (дифференциально экспрессируемые гены)

DIABLO – direct IAP binding protein with low pI (белок прямого связывания IAP с низким pI)

DISC – death-inducing signaling complex (сигнальный комплекс, индуцирующий гибель)

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium (среда Игла в модификации Дульбекко)

DSBs – double-strand breaks (двухцепочечные разрывы)

EBV – Epstein–Barr virus (вирус Эпштейна–Барр)

EJC – exon junction complex (комплекс экзонных соединений)

FACS – fluorescence-activated cell sorting (флуоресцентно-активированная сортировка клеток)

FADD – Fas-associated protein with death domain (Fas-ассоциированный белок с доменом смерти)

FasL – Fas ligand (Fas-лиганд)

FCS – fetal calf serum (сыворотка крови плода крупного рогатого скота)

FKBP – FK506 binding protein (FK506-связывающий белок)

FOXD2 – forkhead box D2 (фактор транскрипции FOXD2)

GFP – green fluorescent protein (зелёный флуоресцентный белок)

GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)

GSEA – gene set enrichment analysis (анализ обогащения наборов генов)

HEK293T – human embryonic kidney 293T (эмбриональные клетки почки человека 293T)

HLA-I – human leukocyte antigen class I (человеческий лейкоцитарный антиген класса I)

HRR – homologous recombination repair (репарация гомологичной рекомбинацией)

Hrk – harakiri, BCL2 interacting protein (белок, взаимодействующий с BCL2)

HSC – hematopoietic stem cell (гемопоэтические стволовые клетки)

HSP70 – heat shock protein 70 (белок теплового шока 70)

HSD17B8 – 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 8 (17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа тип 8)

IAPs – inhibitor of apoptosis proteins (ингибиторы апоптозных белков)

iCasp9 – inducible caspase 9 (индуцибельная каспаза-9)

- IFN- γ – interferon gamma (гамма-интерферон)
- IL – interleukin (интерлейкин)
- ILC – innate lymphoid cell (врождённая лимфоидная клетка)
- iNKR – inhibitory natural killer cell receptors (ингибиторные рецепторы NK-клеток)
- iPSC – induced pluripotent stem cell (индуцированная плюрипотентная стволовая клетка)
- Jak – Janus kinase (Янус-киназа)
- K562 – линия клеток эритролейкемии человека
- KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Киотская энциклопедия генов и геномов)
- KIRs – killer cell immunoglobulin-like receptors (иммуноглобулиноподобные рецепторы киллерных клеток)
- KLRG1 – killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1 (лектин-подобный рецептор киллерных клеток)
- LAG-3 – lymphocyte-activation gene 3 (ген активации лимфоцитов 3)
- LAMP-1 – lysosomal associated membrane protein 1 (лизосомальный ассоциированный мембранный белок 1)
- Mcl-1 – myeloid cell leukemia 1 (лейкемия миелоидных клеток 1)
- MHC-I – major histocompatibility complex class I (главный комплекс гистосовместимости класса I)
- MICA/MICB – MHC class I polypeptide-related sequence A/B (последовательность, родственная MHC класса I)
- MOI – multiplicity of infection (множественность заражения)
- MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization (пермеабилзация внешней мембраны митохондрий)
- MSC – mesenchymal stromal cell (мезенхимальная стромальная клетка)
- mTOR – mechanistic target of rapamycin (мишень рапамицина)
- NCR – natural cytotoxicity receptor (рецептор натуральной цитотоксичности)
- NEAA – non-essential amino acids (незаменимые аминокислоты)
- NES – normalized enrichment score (нормализованный показатель обогащения)
- NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (ядерный фактор каппа-легких цепей)
- NKL – natural killer cell line (линия натуральных киллеров)
- NKG2 – natural killer cell group 2 (группа 2 рецепторов NK-клеток)
- NMD – nonsense-mediated decay (нонсенс-опосредованный распад мРНК)

Noxa – phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (индуцированный ФМА белок 1)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

PBMC – peripheral blood mononuclear cells (мононуклеарные клетки периферической крови)

PD-1 – programmed cell death protein 1 (белок программируемой гибели клеток 1)

PD-1L – programmed death-ligand 1 (лиганд PD-1)

PI31 – proteasome inhibitor of 31kD (протеасомальный ингибитор 31 кДа)

p-jnk – phospho-c-Jun N-terminal kinase (фосфорилированная c-Jun N-концевая киназа)

Puma – p53 upregulated modulator of apoptosis (модулятор апоптоза, активируемый p53)

qPCR – quantitative polymerase chain reaction (количественная полимеразная цепная реакция)

RAG – recombination activating gene (ген, активирующий рекомбинацию)

Raji – линия В-клеточной лимфомы человека

RBM8A – RNA binding motif protein 8A (РНК-связывающий мотивный белок 8A)

RCD – regulated cell death (регулируемая гибель клеток)

RFC3 – replication factor C subunit 3 (субъединица 3 фактора репликации C)

RPN2 – ribophorin II (рибофорин II)

RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (среда RPMI-1640)

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2)

SGK1 – serum/glucocorticoid regulated kinase 1 (киназа 1, регулируемая сывороткой/глюкокортикоидами)

SLC1A5 – solute carrier family 1 member 5 (переносчик растворённых веществ семейства 1, член 5)

SMAC – second mitochondria-derived activator of caspases (второй митохондриальный активатор каспаз)

SOCS – suppressor of cytokine signaling (супрессор сигналинга цитокинов)

SRSF3 – serine/arginine-rich splicing factor 3 (богатый серином/аргинином фактор сплайсинга 3)

STAT5 – signal transducer and activator of transcription 5 (трансдьюсер сигнала и активатор транскрипции 5)

TAP – transporter associated with antigen processing (транспортёр, ассоциированный с процессингом антигена)

TAPBPL – TAP binding protein like (TAP-связывающий белок-подобный)

tBid – truncated Bid (усечённый Bid)

TERC – telomerase RNA component (РНК-компонент теломеразы)

TIGIT – T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (Т-клеточный иммунный рецептор)

TIM-3 – T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-домен-содержащий белок 3)

TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

TNFR – tumor necrosis factor receptor (рецептор фактора некроза опухоли)

TRAIL – TNF-related apoptosis-inducing ligand (TNF-родственный лиганд, индуцирующий апоптоз)

TRAP – telomeric repeat amplification protocol (протокол амплификации теломерных повторов)

TRF2 – telomeric repeat binding factor 2 (теломерный связывающий фактор 2)

TriKEs – trispecific killer cell engagers (триспецифические активаторы киллерных клеток)

TU – transducing units (трансдуцирующие единицы)

ULBP – UL16 binding protein (белок, связывающий UL16)

VDAC2 – voltage dependent anion channel 2 (потенциал-зависимый анионный канал 2)

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein (X-сцепленный ингибитор апоптозного белка)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Клеточная терапия в настоящее время является быстро развивающейся областью. NK-клетки зарекомендовали себя как перспективную основу для развития клеточной терапии рака. Преимуществами применения NK-клеток в адоптивной терапии являются пониженные риски развития тяжёлых побочных явлений, например, реакции "трансплантат против хозяина" (РТПХ) и синдрома высвобождения цитокинов, наблюдаемых при Т-клеточной терапии в условиях аллогенной трансплантации [1]. Открытие врождённой способности NK-клеток распознавать и уничтожать злокачественные новообразования без предварительной сенсibilизации значительно способствовало развитию исследований, посвящённых выделению, культивированию и последующей модификации NK-клеток. Тем не менее, использование NK-клеток связано с рядом ограничений. Содержание NK-клеток в периферической крови составляет 10-15% от мононуклеаров периферической крови, и продолжительность их жизни после выделения невелика. Для наработки достаточных количеств (более 1×10^6 клеток /кг) с целью терапевтического применения необходимо проводить дополнительные манипуляции *in vitro* для индукции интенсивной и длительной пролиферации NK-клеток, что может приводить к их скорому истощению [2]. Генетическая инженерия открывает возможности повышения эффективности функционального ответа терапевтических NK-клеток за счет увеличения длительности персистенции модифицированных клеток, дополнительных механизмов распознавания опухолевых мишеней и улучшения проникновения в опухолевый очаг [2–4].

Введение генетических конструкций в терапевтические клетки, тем не менее, может способствовать развитию непредсказуемых осложнений [5,6]. Применение модифицированных клеток без соответствующего контроля или предварительного облучения может быть небезопасно. Токсичность, нецелевая "off-target" или направленная против нормальных клеток, которые экспрессируют целевой антиген, "on-target, off-tumor", подробно описана при Т-клеточной терапии рака [7], а для терапевтических клеток, полученных из мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и индуцированных плюрипотентных клеток (iPSC), был выявлен повышенный риск злокачественной трансформации [8,9]. Генно-модифицированные NK-клетки, способные к усиленной и продолжительной пролиферации, характеризующиеся повышенной функциональной активностью, могут быть также потенциально опасны. Предварительное облучение либо встраивание генетических конструкций позволяет избирательно ликвидировать

потенциально опасные клетки, снижая риски осложнений [10,11]. Однако облученные НК-клетки имеют ограниченный терапевтический потенциал и не способны обеспечивать длительный иммунный надзор над опухолью. В качестве альтернативы были созданы генетические конструкции, позволяющие контролируемо отключать и даже полностью элиминировать модифицированные НК-клетки, что повышает их терапевтическую безопасность и снижает риски как краткосрочных, так и отсроченных побочных эффектов [11,12].

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 [13,14]. Тем не менее, повышенная экспрессия теломеразы ассоциирована с опухолевой трансформацией, и контроль над *hTERT*-модифицированными НК-клетками крайне необходим для обеспечения безопасности их потенциального терапевтического применения. Использование дополнительной модификации 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, в отличие от других систем «клеточного суицида», позволяет избежать ингибирования многими противоапоптотическими факторами, поскольку активирует клеточную гибель на финальных стадиях апоптотического сигнального пути. С другой стороны, в последнее время появляются работы, свидетельствующие не о 100% эффективности элиминации *iCasp9*-модифицированных клеток. Возможное совместное участие *hTERT* и *iCasp9* в модуляции внутриклеточных путей на различных уровнях к настоящему времени практически не изучено. Однако понимание связи данных белков с клеточной выживаемостью и функциональной активностью крайне необходимо. До сих пор полностью не ясен механизм подавления гибели клеток, характеризующихся повышенной экспрессией *hTERT*. Предположительно, сложный комплекс внутриклеточных взаимодействий между каталитической субъединицей теломеразы и другими участниками основных сигнальных путей способствует повышению выживаемости. Различная внутриклеточная локализация позволяет *hTERT* напрямую взаимодействовать с цитоплазматическими и митохондриальными компонентами, что значительно расширяет спектр функциональных возможностей этого белка. Несмотря на эти факты, большая часть современных исследований по-прежнему сосредоточена на внутриядерной регуляции и функционировании субъединицы *hTERT*, в то время как относительно мало данных о её

цитоплазматической и митохондриальной активности. Таким образом, неканонические функции hTERT требуют дальнейшего изучения.

В данной работе проведена ретровирусная модификация первичных НК-клеток геном *hTERT*, кодирующим каталитическую субъединицу теломеразы hTERT, и геном *iCasp9*, кодирующим синтетическую суицидную конструкцию на основе каспазы-9. Исследованы молекулярные механизмы, связанные с выживаемостью и клеточной гибелью, а также ролью hTERT и iCasp9 в них.

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 оверэкспрессией hTERT после продолжительного культивирования;
4. Изучить возможность направленной элиминации iCasp9-НК-клеток с оверэкспрессией 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 позитивная ассоциацию уровней экспрессии транскриптов гена *BIRC3*, кодирующего противоапоптотический фактор с-IAP-2, с оверэкспрессией hTERT в НК-клетках. Однако, продемонстрировано, что hTERT способна защищать НК-клетки от индукции апоптоза на уровне каспазы-9 другими путями, несвязанными с регуляцией уровней *BIRC3*. НК-клетки, выживающие после обработки димеризатором и устойчивые к индукции апоптоза (НК-клетки с оверэкспрессией hTERT), охарактеризованы на транскрипционном уровне повышенной экспрессией генов, которые ассоциированы с прохождением клеточного цикла. Показана взаимосвязь оверэкспрессии hTERT с изменениями сплайсинга транскриптов в НК-клетках, устойчивых к индукции клеточной гибели при добавлении димеризатора. Так, представленные в работе данные демонстрируют транскрипционные изменения в hTERT-оверэкспрессирующих НК-клетках и позволяют предположить механизм hTERT-опосредованной устойчивости НК-клеток к индукции апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада каспазой-9.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении существующих представлений о неканонических ролях каталитической субъединицы теломеразы человека hTERT. Исследована роль hTERT в поддержании 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, важно с клинической точки зрения, поскольку модификация иммунотерапевтических клеток iCasp9 уже широко применяется в терапии, тогда как раскрытие механизмов, противодействующих направленной элиминации клеток с помощью конструкции iCasp9, необходимо для поиска решений в восстановлении функции iCasp9 и предсказания работоспособности данной системы в различных приложениях. С другой стороны, изучение неканонической функции теломеразы в противодействии клеточной гибели, не только важно для получения высокоактивных длительно персистирующих терапевтических НК-клеток, но и с фундаментальной точки зрения: для раскрытия роли оверэкспрессии hTERT в обеспечении выживаемости опухолевых клеток при действии 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 трансплатации гемопоэтических стволовых клеток, генной и клеточной терапии, 18-20 сентября 2025 года, г.Санкт-Петербург, Россия; VI Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 13-15 ноября 2024 года, г.Санкт-Петербург, Россия; Biomembranes 2024, 7-11 октября 2024 года, г.Долгопрудный, Московская область, Россия; V Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине 23 - 25 ноября 2022 года, г.Москва, Россия; 45th FEBS Congress, «Молекулы жизни: навстречу новым горизонтам», 3-8 июля 2021 года, г.Любляна, Словения; XXXIII, XXXIV и XXXV Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2021, 2022, 2023 год, г.Москва, Россия).

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

Статьи в рецензируемых журналах

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 AA., 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., Kobyzeva 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⁻ 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.

Участие в конференциях, тезисы

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-CHO.
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 NK-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 NK-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 димкризации (CID) в NK-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 GFP с целью проведения последующей трансдукции двух генов в NK 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. // 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 NK клетки с целью их контролируемой элиминации. Онлайн-доклад.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 НК-клетки

Первоначально НК-клетки были описаны как крупные гранулярные лимфоциты, обладающие естественной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам. Позднее НК-клетки были выделены в отдельную линию лимфоцитов, обладающих как цитотоксическими, так и цитокинпродуцирующими эффекторными функциями [15]. НК-клетки относятся к цитотоксическим клеткам врождённого иммунитета (ILC, innate lymphoid cell). В отличие от группы хэлперных ILCs НК-клетки экспрессируют Eomes, транскрипционный фактор эомезодермин, и аналогично с ILC1 экспрессируют транскрипционный фактор T-Bet [16,17]. Натуральные киллеры (НК-клетки) относятся к ветви врождённого иммунитета и участвуют в обеспечении первой линии защиты организма от чужеродных клеток, а также аутологичных клеток, экспрессирующих маркеры клеточного стресса, инфицированных или подвергшихся опухолевой трансформации. Активация НК-клеток контролируется динамическим балансом активирующих и ингибирующих сигналов, которые возникают при взаимодействии НК-клеток с потенциальными клетками-мишенями. НК-клетки экспрессируют широкий спектр активирующих рецепторов на клеточной поверхности, которые могут запускать цитолитические программы, а также секрецию цитокинов или хемокинов [15,18]. Помимо цитолитической активности НК-клетки также активно взаимодействуют с другими клетками иммунной системы (моноцитами/макрофагами, Т-лимфоцитами и дендритными клетками) и модулируют их созревание и активацию [19,20].

1.1.1 Активирующие и ингибирующие рецепторы НК-клеток

Широкий репертуар активирующих (aNKRs) и ингибирующих (iNKRs) рецепторов, используемый НК-клетками для эффективного узнавания опухолевых, инфицированных и клеток в стрессе, одновременно позволяет обеспечить толерантность к нормальным клеткам организма [21,22]. НК-клетки относятся к лимфоцитам врожденной системы иммунитета, и, в отличие от Т- и В-лимфоцитов, в НК-клетках не происходит RAG-зависимой (recombination-activating genes) реанжировки сегментов генов рецепторов. Так, эффективное функционирование и распознавание мишеней НК-клетками регулируется тонким балансом сигналов, приходящих от множества рецепторов [23], наличие которых на клеточной поверхности может динамично изменяться как в процессе созревания НК-клеток, так и под влиянием микроокружения: цитокинового фона и стимуляции различными факторами [18].

У NK-клеток существует два основных принципа распознавания клеток-мишеней. Первый, “отсутствие своего” заключается в том, что в гомеостатических условиях NK-клетки остаются в состоянии покоя благодаря ингибирующему сигналингу от рецепторов к “классическим” и “неклассическим” комплексам МНС-I, которые конститутивно экспрессируются на “своих” клетках. К этим рецепторам относятся представители семейств иммуноглобулиноподобных рецепторов-киллеров (KIRs, Killer Ig-like Receptors) и рецепторов лектинов С-типа (NKG2). Именно благодаря связыванию этих рецепторов с МНС-I (HLA-I, Human Leukocyte Antigen class I – человеческий лейкоцитарный антиген класса I) NK-клетки в норме не проявляют аутореактивности и, наоборот, активируются при взаимодействии с клеткой, не несущей или с низким уровнем экспрессии комплексов HLA-I на поверхности [23–26]. Согласно второму принципу распознавания “индуцированный свой” NK-клетки активируются при взаимодействии с аутологичными клетками, экспрессирующими маркёры клеточного стресса, например, MICA и MICB (MHC class I polypeptide-related sequence A or B) и белки семейства ULBP1-6 (UL16-binding protein), которые являются лигандами для активирующего рецептора NKG2D [27,28]. NK-клетки также способны распознавать и ликвидировать вирус-инфицированные и изменённые клетки. Рецепторы натуральной цитотоксичности (NCRs: NKp46, NKp30 и NKp44) способны распознавать лиганды вирусного происхождения и некоторые опухоль-ассоциированные маркеры [18,29–31].

Более того, NK-клетки способны опосредовать антитело-зависимую цитотоксичность через связывание рецептора CD16 на поверхности NK-клеток с Fc-фрагментом антител [32]. Сигнал от CD16 способен без дополнительной ко-стимуляции инициировать дегрануляцию NK-клеток [33].

Хронические инфекции или длительное культивирование *in vitro* при постоянной стимуляции цитокинами обычно истощают NK-клетки [34]. Эти клетки теряют способность к интенсивной функциональной активности, выработке IFN- γ или цитотоксичности по отношению к клеткам-мишеням. Фенотипически истощение NK-клеток связано со снижением экспрессии набора активирующих поверхностных молекул NKG2D, CD16 и NCR (NKp30, NKp44 и NKp46) [35], в то время как белки контрольных точек иммунной системы (PD-1, TIM-3, LAG-3, TIGIT) увеличивают свою экспрессию [36]. Поверхностная молекула KLRG-1 также определяет терминально дифференцированные и истощённые NK-клетки, которые демонстрируют низкий пролиферативный и функциональный ответ [34,37].

PD-1 является важным маркером функциональной активности NK-клеток, поскольку связывание с соответствующими лигандами (PD-1L) может нарушать противоопухолевую эффекторную функцию NK-клеток, способствуя уклонению опухоли от иммунного ответа. TIGIT связан с истощением NK-клеток, и блокада рецептора контрольной точки TIGIT предотвращает истощение NK-клеток и индуцирует мощный противоопухолевый иммунитет [38]. Роль рецептора TIM-3, экспрессируемого на NK-клетках, неоднозначна. Экспрессия TIM-3 скорее связана с созреванием NK-клеток и широко выражена в функционально активных NK-клетках. Однако, связывание TIM-3 с его лигандом подавляет ответ NK-клеток на клетки-мишени [39,40]. LAG-3 является членом суперсемейства рецепторов иммуноглобулинов, обладающим ингибирующими свойствами. Нокаут гена LAG-3 приводит к неспособности NK-клеток уничтожать определённые типы опухолей [36].

1.1.2 Функциональная активность NK-клеток

Эффекторные функции NK-клеток включают цитотоксический ответ на клетки-мишени и продукцию различных цитокинов (в том числе IFN- γ) после активации. Экзоцитоз литических гранул является основным механизмом уничтожения клеток-мишеней. Натуральные киллеры в отличие от наивных T-лимфоцитов способны к быстрой дегрануляции в ответ на активацию. Они содержат заранее накопленные гранзимы и перфорины в своих литических гранулах и им не требуется время на транскрипцию, трансляцию литических белков. NK-клетки конститутивно экспрессируют предзаготовленные мРНК для ускоренного синтеза IFN- γ и, таким образом, могут быстро после активации запустить продукцию цитокинов [41].

Цитотоксические лимфоциты могут также убивать клетки-мишени без использования литических гранул, задействуя так называемые рецепторы смерти. Существует 3 различных рецепторно-лигандных системы, которые могут инициировать апоптоз клеток-мишеней: 1) TNF связывается либо с рецептором TNFR1, либо с рецептором TNFR2; 2) FasL взаимодействует с рецептором CD95 (APO-1/Fas) и 3) TRAIL связывается с различными рецепторами TRAIL-R [42,43].

NK-клетки также оказывают иммуномодулирующее воздействие на окружение. NK-клетки секретируют, как провоспалительные, так и иммуносупрессивные цитокины. Оптимальная комбинация стимулов для экспрессии каждого цитокина различается. Например, комбинация IL-12+IL-18 стимулирует продукцию IFN- γ , IL-15+IL-18 инициируют продукцию GM-CSF, а IL-12+IL-15 способствуют экспрессии IL-10 [44].

Одним из значимых противоопухолевых цитокинов NK-клеток, является IFN- γ . Данный цитокин стимулирует активность цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток, макрофагов и дендритных клеток. IFN- γ повышает экспрессию молекул МНС I класса и таким образом способствует презентации опухоли ассоциированных антигенов. Так, IFN- γ проявляет значимый противоопухолевый эффект [45,46].

1.1.3 Транскрипционные факторы Eomes и T-Bet и их роль в созревании NK-клеток

Человеческие NK-клетки составляют около 15% всех лимфоцитов и фенотипически определяются по экспрессии CD56 и отсутствию экспрессии CD3. Большинство ($\approx 90\%$) NK-клеток человека имеют низкую экспрессию CD56 (CD56^{dim}) и высокие уровни экспрессии рецептора Fc γ III (Fc γ RIII, CD16), в то время как $\approx 10\%$ NK-клеток являются CD56^{bright}CD16^{dim} или CD56^{bright}CD16⁻. Данные субпопуляции также различаются по поверхностной экспрессии ряда рецепторов и разделяются функционально на две группы: иммунорегуляторные CD56^{bright} и цитотоксические CD56^{dim} [18,47–50].

NK-клетки, как и другие лимфоциты, происходят из CD34⁺ гемопоэтических стволовых клеток (HSC) костного мозга, которые дифференцируются через общую стадию лимфоидного предшественника. Во вторичных лимфоидных тканях происходит развитие NK-клеток человека, в результате чего клетки последовательно развиваются в про-NK-клетки стадии 1 (CD34⁺CD45RA⁺CD117⁻CD94⁻), за которыми следует стадия 2, или пре-NK-клетки (CD34⁺CD45RA⁺CD117⁺CD94⁻) (Рисунок 1). Клетки 1-й и 2-й стадий являются мультипотентными, поскольку они также обладают потенциалом развития Т-клеток и дендритных клеток. Клетки 3-й стадии (CD34⁻CD117⁺CD94⁻CD16⁻) являются коммитированными предшественниками NK-клеток, поскольку они больше не могут развиваться в Т-клетки или дендритные клетки. Стадия 4 (CD34⁻CD56^{bright}CD94⁺CD16⁻) и стадия 5 (CD34⁻CD56^{dim}, CD94⁺CD16⁺) являются зрелыми NK-клетками [51].

CD56^{bright} (стадия 4) являются менее дифференцированными по сравнению с CD56^{dim} (стадия 5) и несут на своей поверхности NKG2A, но не KIRs. CD56^{bright} не способны проявлять ADCC, из-за отсутствия рецептора CD16. CD56^{bright} экспрессируют CD25, высокоаффинного рецептора IL-2, позволяющего запускать быструю и интенсивную пролиферацию. IL-15R после связывания запускает дифференцировку из CD56^{bright} через CD56^{bright}CD16⁺ в CD56^{dim} [48,49,52]. CD56^{dim} характеризуются высокой поверхностной экспрессией KIRs, а также гетерогенной экспрессией NCRs, которые модулируют силу цитотоксического ответа. CD56^{dim} способны одновременно проявлять сильную цитолитическую активность и секретировать цитокины [21,26,53].

Eomes и T-Bet являются основными факторами транскрипции, ответственными за функциональное состояние NK-клеток на поздних стадиях: 4 и 5 клеточной дифференцировки. Постепенное изменение преимущественной экспрессии Eomes на T-Bet определяет созревание NK-клеток. Гены-мишени Eomes и T-Bet частично совпадают. А именно, Eomes и T-Bet определяют уровни экспрессии цитокиновых рецепторов, уровни факторов, участвующих в апоптотическом каскаде, и пролиферативную активность. NK-клетки Eomes⁺T-Bet⁺ NK проявляют наибольшую функциональную активность, включая выработку IFN- γ и цитотоксичность, тогда как NK-клетки Eomes⁻T-Bet⁻ демонстрируют фенотип истощения [54–57].

NK-клетки CD56^{bright}, продуцирующие цитокины, характеризуются более высокими уровнями Eomes и более низкими уровнями T-Bet, в сравнении с цитотоксическими NK-клетками CD56^{dim}. Терминально дифференцированные NK-клетки CD57^{pos}CD56^{dim}, наоборот, экспрессируют высокие уровни T-Bet и низкие уровни Eomes. Соответственно, процессы созревания NK-клеток тесно связаны с повышением поверхностной экспрессии KIRs, снижением Eomes, повышением уровней T-Bet и формированием функциональных цитотоксических свойств [58,59].

Кроме того, экспрессия Eomes и T-Bet положительно коррелирует с продукцией IFN- γ . Однако NK-клетки проявляют меньшую цитотоксичность в отсутствие T-Bet, что, возможно, вызвано снижением выработки перфорина и гранзима В. Исследования на мышах показывают, что T-Bet, но не Eomes, непосредственно связаны с производством цитотоксических молекул. В совокупности, T-Bet и Eomes совместно регулируют выработку IFN- γ в NK-клетках, в то время как T-Bet, по-видимому, является ключевым регулятором их цитотоксической активности [59–61]. Интересно, что повышение уровня Eomes способствует поверхностной экспрессии CD16 на NK-клетках, а следовательно, их переходу из CD56^{bright}CD16⁻ в CD56^{bright}CD16⁺. Поскольку наличие CD16 на NK-клетках является ключевым фактором для обеспечения ADCC, получение NK-клеток с фенотипом CD16⁺ относится к одной из значимых задач адаптивной NK-клеточной терапии. В комбинации с терапией моноклональными антителами или ViKEs и TriKEs, направленными против опухолевых мишеней, NK-клетки CD16⁺ получают дополнительный стимул от связывания CD16 с антителами, что улучшает распознавание опухолевых клеток и их уничтожение [30,51,62].

Помимо субпопуляций CD56^{bright} и CD56^{dim} существуют также функционально неактивные CD56⁻CD16⁺ (CD56⁻), нетрадиционные CD56^{dim}CD16⁻ (uCD56^{dim}) и подобные

клеткам памяти (“memory-like”) $CD56^{dim}CD57^{+}KIR^{+}NKG2C^{+}NKG2A^{-}$ [18,63,64]. Данные субпопуляции в норме являются слабо представленными в организме, но могут увеличиваться под действием неблагоприятных факторов, длительных воспалительных процессов, инфекций или супрессирующего опухолевого микроокружения. Также среди опухоль-ассоциированных НК-клеток выделяются субпопуляции, которые проявляют либо незрелый $CD56^{bright}CD16^{-}$, либо промежуточный $CD56^{bright}CD16^{+}$ фенотип, тогда как зрелые и функционально активные НК-клетки $CD56^{dim}CD16^{+}KIR^{+}$ редко встречаются в микроокружении опухоли [65]. Такой истощенный фенотип может развиваться под действием продолжительной стимуляции НК-клеток цитокинами, что приводит к увеличению экспрессии супрессоров цитокинового сигналинга (SOCS: SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 и CIS), которые ингибируют активацию сигнального пути Jak/STAT и клеточный ответ на цитокины. CIS индуцируется IL-15 и IL-2 и образует петлю отрицательной обратной связи, подавляющую путь Jak/STAT5, который регулирует широкий спектр генов, ответственных за дифференцировку, выживание, пролиферацию, цитокиновую продукцию и цитотоксичность НК-клеток. Экспрессия SOCS-2 и SOCS-3 также регулируется IL-15, а экспрессия SOCS-1 скорее зависит от IL-12 [35,66]. В целом, повышение внутриклеточных уровней SOCS нарушает передачу сигналов от цитокинов и способствуют истощению НК-клеток. Нарушения функциональной активности НК-клеток сопровождаются изменением баланса транскрипционных факторов Eomes и T-Bet в НК-клетках. Одновременное снижение экспрессии T-Bet и Eomes приводит к дисфункции и неспособности НК-клеток контролировать рост опухоли и ассоциировано с менее благоприятным исходом терапии [51,67]. Уменьшение уровня Eomes и/или T-Bet приводит к изменению поверхностной экспрессии рецепторов цитокинов, и как следствие снижению ответа НК-клеток на них [59,61].

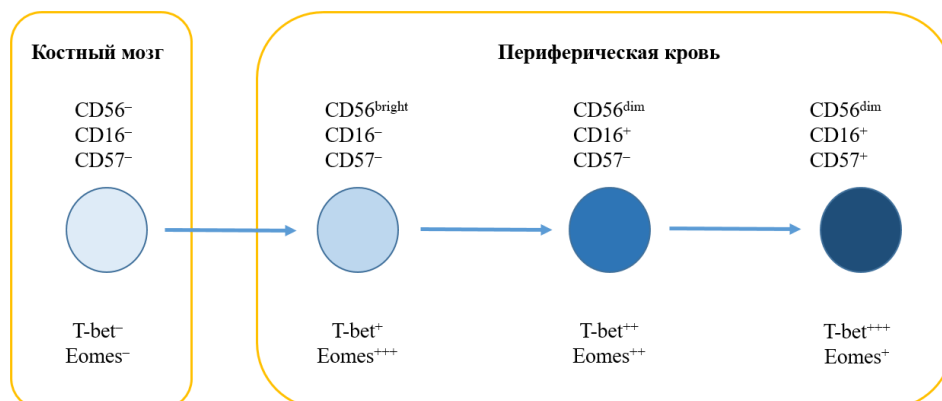


Рисунок 1. Иллюстрация созревания НК-клеток человека и взаимосвязь с градиентом экспрессии транскрипционных факторов Eomes и T-Bet в них.

1.1.4 Генетическая модификация НК-клеток

Терапевтические подходы, основанные на НК-клетках, быстро развиваются в области клеточной терапии рака. Различные дополнительные модификации, направленные на повышение функциональной активности НК-клеток и распознавания мишеней, требуют времени между выделением НК-клеток *ex vivo* и их готовности к использованию. Кроме того, необходима интенсивная стимуляция для получения достаточного количества НК-клеток, восприимчивых к ретровирусной трансдукции. Однако длительное культивирование *in vitro*, сопровождаемое процессом модификации НК-клеток, может снизить их общую функциональность и пролиферативную активность до момента терапевтического применения [68].

Злокачественные новообразования используют большое разнообразие стратегий ускользания из-под иммунного надзора, в частности создавая супрессирующее микроокружение путём снижения экспрессии активирующих лигандов и увеличения представленности различных ингибиторов контрольных точек иммунитета. Таким образом, внедрение генетических конструкций, способных увеличивать персистенцию, стимулировать, уменьшать подавление, улучшать миграцию, активировать и нацеливать иммунные клетки на распознавание и ликвидацию опухолей, является одним из рабочих подходов создания иммунотерапевтических НК-клеток [69–71].

НК-клетки могут быть модифицированы с использованием различных методов: вирусного и невирусного переноса генов. Однако низкая эффективность модификации всё ещё остаётся главной проблемой [72]. Ретровирусная трансдукция генов в НК-клетки, которая сейчас является наиболее широко используемым подходом модификации терапевтических клеток, по эффективности сильно уступает эффективности, показанной для Т-лимфоцитов, что, вероятно, связано с механизмами противовирусной защиты НК-клеток [73,74]. Несмотря на трудоёмкость методик вирусной трансдукции их эффективность сравнительно выше методов невирусной модификации натуральных киллеров [72,73].

Основными преимуществами ретровирусной трансдукции являются стабильная экспрессия трансгена, за счёт встраивания генетического материала ДНК клетки и относительная простота применяемых конструкций [72,73]. Однако использование

ретровирусной трансдукции повышает риски инсерционного мутагенеза и связанных с ним непредсказуемых побочных явлений, которые наибольшим образом могут проявиться при длительном культивировании клеток [72,75].

Векторы на основе γ -ретровирусов были одни из первых успешно использованы для стабильной модификации иммунотерапевтических клеток. Тем не менее, они неспособны заражать неделящиеся клетки, поскольку не обладают машинерией, облегчающей проникновение генетического материала через ядерные поровые комплексы [73,76–78]. Поэтому стимуляции НК-клеток, направленные на усиление их пролиферации, крайне необходимы, поскольку значительно повышают восприимчивость НК-клеток к ретровирусной трансдукции [79,80].

1.1.5 Активация НК-клеток

Прайминг или предварительная активация влияет на функциональную активность и продолжительность персистенции натуральных киллеров при адоптивной терапии, значительно повышая противоопухолевый ответ НК-клеток [81]. Среди цитокинов наиболее часто используют IL-2, IL-15, IL-12, IL-18 и IL-21, которые в значительной степени влияют на состояние зрелых НК-клеток: участвуют в дифференцировке, выживании и модулировании уровня пролиферативной и функциональной активности [64,72,82–84].

IL-2 часто используется в терапии, в том числе для стимуляции Т-клеточного ответа [85]. Сигналинг через IL-2 (IL-2R $\beta\gamma$) приводит к активации НК-клеток, сопровождающейся повышением экспрессии NKG2D [86]. Тем не менее, конечный ответ на стимуляцию различается в популяциях НК-клеток и варьирует в зависимости от уровня экспрессии рецепторов к IL-2. Например, только для НК-клеток CD56^{bright} характерна экспрессия высокоаффинного рецептора к IL-2 (CD25, IL-2R $\alpha\beta\gamma$), который стимулирует высокий пролиферативный ответ даже в низких концентрациях IL-2 [87].

Методы стимуляции IL-2 и IL-15 широко используются для прайминга НК-клеток [88], было показано, что его применение IL-15 в комбинации с IL-2 улучшает экспансию и цитотоксичность НК-клеток [1,66,84]. IL-2 и IL-15 индуцируют выживаемость и пролиферацию НК-клеток через передачу сигналов через гетеродимеры IL-2R/ β . Было показано, что стимуляция этими цитокинами способствует поддержанию и/или стимуляции различных противоопухолевых факторов семейства BCL2 (Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1) [89].

IL-2 и IL-15 также увеличивают продолжительность жизни NK-клеток за счёт усиления экспрессии каталитической субъединицы теломеразы (TERT) [90–92].

Хотя ранее для активации NK-клеток использовалась стимуляция цитокинами, самые высокие уровни экспансии были получены при применении фидерных клеточных линий [93,94]. Линии миелолейкоза K562, которые не обладают поверхностной экспрессией комплексов HLA-I на своей поверхности, являются хорошими мишенями для NK-клеток, так как не ингибируют их ответ через KIRs и NKG2. Для стимуляции NK-клеток используют фидерные клетки, а именно, облучённые клетки K562 без или с генетическими модификациями: K562-mbIL15, K562-4-1BBL, K562-mbIL21 [94,95]. В свою очередь, предварительная активация NK-клеток комбинацией цитокина IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21 была успешно протестирована с целью повышения эффективности ретровирусной трансдукции, для которой требуются активно пролиферирующие клетки [96]. Более того, было продемонстрировано, что NK-клетки, стимулируемые только IL-2, подвергаются ретровирусной трансдукции с меньшей эффективностью [13,96,97]. Использование клеток K562-mbIL21 связано со значительным увеличением длины теломер, а следовательно, увеличением репликативного потенциала NK-клеток [97]. Более того, одновременная стимуляция NK-клеток IL-2 и K562-mbIL21 приводит к приобретению поверхностной экспрессии HLA-DR, связанной с активной пролиферацией NK-клеток, интенсивной продукцией IFN- γ , цитотоксичностью и более высокой экспрессией CD86 и NKG2D [98].

1.2 Трансгены, регулирующие выживаемость терапевтических клеток

Введение различных типов клеток пациентам с терапевтической целью, наоборот, связано с рядом соображений безопасности [5,6]. Во-первых, введение таких улучшенных либо активированных и модифицированных клеток без соответствующего контроля или предварительного облучения может привести к возникновению различных побочных эффектов. “Нецелевая” или “нецелевая вне опухолевая” токсичность была подробно описана для Т-клеточной терапии [7]. В то время как повышенный риск злокачественной трансформации терапевтических клеток является распространённой проблемой в подходах, основанных на MSC и iPSC [8,9]. Следовательно, NK-клетки, дополнительно модифицированные для усиления пролиферативного и функционального потенциала, могут быть потенциально опасны [99,100]. Таким образом, необходим надлежащий контроль за такими клетками, чтобы гарантировать безопасность и минимизировать побочные эффекты у пациентов. Однако использование предварительного облучения

ограничено, поскольку оно снижает функциональную активность и персистенцию терапевтических клеток. Другой подход заключается в введении дополнительной модификации, позволяющей контролировать и быстро элиминировать “опасные” модифицированные НК-клетки. Такая модификация может повысить терапевтическую безопасность НК-клеток и снизить риски как краткосрочных, так и отсроченных побочных эффектов [70,101].

В данной работе будут подробно рассмотрены эффекты и взаимные влияния продуктов генов *hTERT*, повышающего выживаемость и персистенцию НК-клеток, и гена *iCASP9*, кодирующего систему клеточного суицида на основе каспазы-9.

1.2.1 Каталитическая субъединица теломеразы (hTERT)

Продолжительная стимуляция цитокинами при культивировании *in vitro* и *in vivo* может привести к функциональному и пролиферативному истощению НК-клеток [102]. Для преодоления возможного истощения НК-клеток может быть использована трансдукция гена *hTERT*, кодирующего каталитическую субъединицу обратной транскриптазы теломеразы человека. hTERT известна своей канонической ролью – удлинением теломер [103]. Известно, что в лимфоцитах экспрессия hTERT обычно подавляется, но может быть индуцирована различными стимулами: цитокинами и при связывании лигандов активирующих рецепторов [91,97,104]. Ранее было показано, что hTERT повышает репликативный потенциал и состояние активации НК-клеток, культивируемых *in vitro*, на месяцы [13,14]. Было показано, что даже после года культивирования НК-клетки сохраняли экспрессию рецепторов, ответственных за их активацию, таких как NKp30, NKp44, NKp46 и NKG2D [80,105,106]. Известно, что hTERT в клетках способен не только удлинять теломеры, но и предотвращать гибель клеток различными неканоническими способами. Например, hTERT участвует в поддержании работы митохондрий и опосредует экспрессию широкого спектра генов [107–109]. Однако избыточная экспрессия hTERT обычно ассоциируется с повышенными рисками злокачественной трансформации клеток [71], поэтому использование таких клеток без облучения или соответствующего контроля не безопасно [70,110].

1.2.2 Индуцибельная каспаза-9 (iCasp9)

Одним из способов контроля над терапевтическими клетками является использование суицидальных конструкций “safety switch”, основанных на активации различных стадий апоптотического пути. Например, были созданы конструкции на основе

рецепторов внешнего пути апоптоза Fas и FADD (Fas-associated protein with death domain), лежащего ниже по пути сигналинга. Однако суицидальные конструкции на основе внутриклеточных эффекторных каспаз показали наибольшую эффективность. В клинических испытаниях многообещающие результаты уже были показаны для Т- и НК-клеток, прошедших модификацию с помощью суицидального гена *iCASP9*. Введение гена *iCASP9* в клетки обеспечивало быструю элиминацию всех и только *iCasp9*-модифицированных клеток [111], тогда как индукция апоптоза конструкциями на основе Fas и FADD, особенно в Т-клетках памяти, была ограничена за счёт ингибирования противоапоптотическими белками (с-FLIP, Bcl-2 и Bcl-X_L). Действуя на последних стадиях апоптотического сигнального каскада, *iCasp9* способен вызывать гибель клеток в обход многих ингибиторов апоптоза, которые значительно снижают эффективность других суицидальных конструкций [112,113], что позволяет использовать *iCasp9* конструкцию в широком диапазоне клеток [114–116]. Более того, *iCasp9* способен быстро (уже в течение 30 минут) и эффективно элиминировать модифицированные Т-клетки, что важно при быстром развитии осложнений [115].

Суицидальная конструкция *iCasp9* представляет собой комбинацию дельта-каспазы-9 (каспазы-9 без домена CARD), связанной с FKBP-доменом. Химический агент (CID, химический индуктор димеризации) индуцирует димеризацию путём связывания с доменом FKBP, что впоследствии активирует *iCasp9* [117]. Однако не исключена возможность спонтанной димеризации, которая может приводить к непреднамеренному разрушению модифицированных клеток [118].

В недавних работах стали появляться свидетельства о неполной элиминации *iCasp9*-модифицированных клеток (гемопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников). Этот аспект может снизить безопасность такой суицидальной конструкции [119,120]. Следовательно, важна идентификация факторов, опосредующих устойчивость *iCasp9*-модифицированных клеток к индукции апоптоза при использовании CID.

1.3 Основные внутриклеточные молекулярные пути регулируемой клеточной гибели

Регулируемая клеточная гибель (RCD, Regulated cell death) является генетически запрограммированным механизмом, который необходим для нормального развития многоклеточных (и ряда одноклеточных) организмов, позволяющим своевременно удалять повреждённые, изменённые и потенциально опасные клетки. RCD представляет собой

сложную молекулярную систему, которая может тонко регулироваться под влиянием внешних и внутренних факторов. Так, существует два различных, но взаимосвязанных пути (внутренний и внешний), приводящих к клеточной гибели [121]. Первый, внутренний апоптоз (intristic apoptosis), - путь клеточной гибели, который развивается в ответ на стресс: такой как недостаток факторов роста и цитокиновой поддержки, стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), повреждение ДНК или накопление внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) [122–125]. Второй, внешний путь апоптоза, запускается в ответ на связывание рецепторов смерти (death receptors) с соответствующими лигандами [121,126]. Вдобавок, стоит упомянуть индукцию клеточной гибели с помощью гранзимов. Данный способ ликвидации клеток, в том числе опухолевых клеток, широко распространён среди цитотоксических лимфоцитов: НК-клеток и Т-клеточных эффекторов [126].

Все перечисленные пути в конечном счёте приводят к запуску каскада каспаз и гибели клетки, однако возможность тонкой регуляции на каждом уровне сигналинга позволяет замедлять или вовсе ингибировать этот процесс [121].

1.3.1 Внутренний путь апоптоза (intristic apoptosis)

Ключевым этапом intristic apoptosis является пермеабилзация внешней мембраны митохондрий (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization), которая контролируется балансом про- и противоапоптотических белков семейства BCL-2 [127]. Семейство состоит из 3 подгрупп, взаимосвязанных по наличию гомологичных ВН-доменов (BCL-2-homology domains). Среди них выделяют проапоптотические инициаторы (ВН3-only initiators) и пермеабилзирующие мембрану эффекторы (effectors), в противовес которым действуют противоапоптотические защитники (anti-apoptotic guardians).

Проапоптотические ВН3-only initiators Bid (ВН3 interacting domain death agonist), Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Vim (BCL-2-interacting mediator of cell death) и Noxa (phorbol-12-myristate-13-acetate- induced protein 1) представляют собой медиаторы клеточного ответа на стресс. Активируясь пост-транскрипционно (например, Bid), либо путём усиления транскрипции (например, Puma, Vim, и Noxa), они способствуют развитию апоптоза через прямое взаимодействие с effectors Bax (BCL-2-associated X protein) и Bak (BCL-2 antagonist/killer). Bax в норме циркулирует между внешней мембраной митохондрий (ОММ, outer mitochondria membrane) и цитозолем, а Bak располагается на ОММ и там взаимодействует с VDAC2 (voltage dependent anion channel). Под действием апоптотических стимулов Bax и Bak приобретают способность к олигомеризации,

приводящей к формированию пор во внешней мембране митохондрий [121,128]. В противовес проапоптотическим белкам действуют anti-apoptotic guardians: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2); Bcl-X_L (B-cell lymphoma-extra large); Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1); Bcl-W (BCL-2 like protein 2). Большинство членов семейства anti-apoptotic BCL-2 ингибируют Bax и Bak, предотвращая их олигомеризацию либо напрямую физически изолируя ОММ, либо косвенно через изоляцию of BH3-only активаторов. Противоапоптотические функции “guardians” семейства BCL-2 могут быть заблокированы связыванием с группой проапоптотических BH3-only белков семейства BCL-2 (Bad (BCL-2 associated agonist of cell death), Bmf (BCL-2 modifying factor) и Hrk (BCL-2 interacting protein)), известных как сенсбилизаторы или “sensitizers”, которые способны провоцировать МОМР без взаимодействия с Bax и Bak. Тогда как Bim, Bid, Puma способны связывать все anti-apoptotic BCL-2; Bad преимущественно взаимодействует с Bcl-2, Bcl-X_L и Bcl-W; Noxa блокирует Mcl-1; а Hrk - Bcl-X_L [121,129]. В итоге, пермеабилзация внешней мембраны митохондрии приводит к выходу цитохрома с (cyt c) и SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases / Diablo homolog) в цитоплазму, где в дальнейшем происходит сборка апоптосомы из цитохрома с, APAF1 (Apoptotic protease activating factor 1) и прокаспазы-9 [107]. Далее, происходит активация каспазы-9, которая приводит к запуску эффекторных каспаз-3 и -7. SMAC/DIABLO, в свою очередь, связывает ингибиторы каспаз, IAPs (inhibitor of apoptosis), которые в норме блокируют активность каспаз. Интересно, что XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) – единственный из IAPs, который напрямую физически блокирует каспазы. Так, активация каскада каспаз приводит к разрушению клеточных компонентов: фрагментации ДНК, появлению фосфотидилсерина на внешней мембране [130].

1.3.2 Внешний путь апоптоза (extrinsic apoptosis)

Внешний путь апоптоза (extrinsic apoptosis) запускается при взаимодействии рецепторов смерти (Death receptors) со своими лигандами. Это связывание стимулирует сборку внутриклеточного комплекса DISC (death-inducing signaling complex), который регулирует активацию каспазы-8. Death receptors принадлежат к надсемейству TNFR (рецептор фактора некроза опухоли). TNFR содержат внеклеточный домен, богатым Cys, и гомологичный внутриклеточный домен, “домен смерти” (DD, death domain). Известно, что в качестве регулятора выступают различные изоформы с-FLIP (FLICE-like inhibitory protein): с-FLIP_S и с-FLIP_L [131]. Дальнейшее развитие событий происходит по двум различным путям. В «клетках типа I» (например, тимоцитах и зрелых лимфоцитах) активированная каспаза-8 напрямую протеолитически расщепляет эффекторные каспазы-3

и -7 [132,133]. Наоборот, в «клетках II типа» (например, гепатоцитах, панкреатических β -клетках и большинстве раковых клеток), в которых активация каспазы-3 и каспазы-7 сдерживается XIAP, внешний апоптоз требует протеолитического расщепления Bid с помощью каспазы-8 и превращения его в tBid. tBid, в свою очередь, активирует Bax и Bak, что приводит к МOMP с последующим выходом SMAC/DIABLO и активацией каспазы-9 [121,134].

1.3.3 Индукция клеточной гибели гранзимами

Поскольку значительную противоопухолевую защиту обеспечивают иммунные клетки, такие как НК-клетки и Т-клеточные эффекторы, способные ликвидировать изменённые клетки как путём высвобождения литических гранул, так и путём запуска внешнего пути апоптоза через рецепторы смерти [126], интересно рассмотреть механизмы, задействованные в индукции клеточной гибели компонентами литических везикул в опухолевых клетках [107].

Перфорин и гранзимы являются основными компонентами литических гранул. Первый необходим для формирования пор в клетках-мишенях и проникновения гранзимов в них [135]. Гранзимы представляют собой семейство близкородственных сериновых протеаз, которые экспрессируются в цитотоксических Т-клетках и НК-клетках [136]. В частности, наиболее подробно изучен гранзим В, который активирует каспазный путь апоптоза путём расщепления каспаз-3 и -7, что приводит к разрушению множества внутриклеточных субстратов [136]. Гранзим В, в том числе, может инициировать апоптоз через разрезание Bid с образованием tBid, который, взаимодействуя с Bax и Bak, опосредует МOMP [137]. Однако апоптоз, индуцированный гранзимом В, может быть ингибирован сверхэкспрессией противоапоптотического белка Bcl-2 [138].

Гранзим А может быстро индуцировать клеточную гибель, независимую от каспаз и без высвобождения факторов апоптоза из митохондрий. В процессе формируются большие фрагменты ДНК, которые не обнаруживаются обычными анализами на апоптоз [126,139]. В течение минут гранзим А способен нарушить работу ЭПР и митохондрий и привести к накоплению внутриклеточных АФК [43,140]. Также для гранзимов К, М и Н было показано, что они активируют каспазо-независимую гибель клеток [126,135,136].

Таким образом, гранзимы способны разрушать множественные клеточные компоненты, индуцируя клеточную гибель, как напрямую через индукцию каспазо-зависимого апоптоза, либо путём нарушения целостности митохондрий с высвобождением

сут с, так и запускать внутриклеточный сигналинг в ответ на стресс, вызванный множественными разрушениями внутриклеточного содержимого.

1.4 Роль TERT в регуляции клеточной гибели

TERT (telomerase reverse transcriptase) конститутивно экспрессируется в стволовых клетках, включая кожу, кишечник и гемопоэтические стволовые клетки/клетки-предшественники и временно активируется в части пролиферирующих клеток, например, в лимфоцитах при активации [141]. При дифференцировке клеток эта временная активация в нормальных соматических клетках редуцируется [141–143], тогда как в 85-90% злокачественных новообразований TERT реактивируется [144], что обуславливает повышенную выживаемость раковых клеток [145]. Ещё с 1985г года известна роль теломеразы в достраивании теломерных концов (каноническая функция) и обеспечении стабильности генетического материала [107,146], однако выявление других, нетеломерных (неканонических) функций, продолжается до сих пор. Так, прогрессирование опухолей в ряде случаев было связано с активацией различных путей, включая клеточную пролиферацию, ингибирование апоптоза и стимуляцию энергетического метаболизма, в результате увеличения экспрессии TERT [147]. Поэтому особенно становится интересна роль TERT в регуляции выживаемости клеток, причём как раковых, так и соматических, в том числе лимфоцитов. Была показана взаимосвязь между уровнем теломеразной активности и повышенной резистентностью к действию терапевтических препаратов и впоследствии плохим прогнозом для раковых больных [148–150]. Было показано, что TERT способствует выживаемости клеток через подавление апоптотического сигналинга [151–156]. Таким образом TERT опосредует множество защитных функций, которые будут рассмотрены далее [107].

1.4.1 Канонические функции TERT

Теломеры – защитные структуры на концах хромосом, которые представлены короткими повторяющимися олигонуклеотидными последовательностями (5'-TTAGGGn) в комплексе с белками шелтринами, необходимыми для поддержания стабильности хромосом [157]. В каждом цикле репликации происходит укорочение теломерных концов, из-за “end replication problem”, который возникает в результате неполного достраивания отстающей цепи ДНК [158], что является основной причиной ограниченного пролиферативного потенциала соматических клеток [159,160]. Теломеры имеют важное значение для обеспечения стабильности генома, в том числе, предотвращения слияния концов хромосом. В отсутствие защитного механизма, концы линейных хромосом были бы

неотличимы от одностороннего разрыва двухцепочечной ДНК и запускали бы клеточную реакцию повреждения ДНК, результатом которой является либо остановка репликации, либо гибель клетки [161,162].

Нарушение структуры теломер инициирует ответ на повреждение ДНК (DDR, DNA damage response), который заключается в активации ATM (ataxia telangiectasia mutated) и ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) сигнальных путей, играющих центральную роль в поддержании целостности генома. Одновременный сигналинг по обоим ATM и ATR в результате их взаимодействия приводит к активации ряда эффекторных белков – CHK1 (Checkpoint Kinase 1), CHK2 (Checkpoint Kinase 2), p53, которые регулируют прохождение клеточного цикла, апоптоз и репарацию ДНК [163,164]. По-видимому, сама структура t-loop способна блокировать DDR за счёт повышения уровня компактизации: модификации коровых гистонов и их взаимодействия с другими факторами [162,165,166].

Гомеостаз теломер, в нормальных клетках организма поддерживается активностью холоэнзима теломеразы, коровая часть которого представлена двумя ключевыми компонентами, обеспечивающими теломерзную активность фермента: теломеразной РНК (TERC, Telomerase RNA component) и обратной транскриптазой теломеразы (TERT, telomerase reverse transcriptase). Основное (каноническое) свойство теломеразы заключается в её способности достраивать теломерные концы хромосом путём обратной транскрипцией олигонуклеотидных последовательностей с матрицы теломеразной РНК [167]. Экспрессия TERT тонко регулируется в различных клетках во избежание раковой трансформации клеток, тогда как TERC широко экспрессируется в клетках млекопитающих [141–143]. Большинство трансформированных клеток используют теломеразу для удлинения и поддержания теломер, однако около 4–11% раковых заболеваний используют путь, основанный на гомологичной рекомбинации, называемый альтернативным удлинением теломер (ALT, Alternative Lengthening of Telomeres) [107,168].

Теломераза не только напрямую участвует в обеспечении стабильности генома, формируя защитные теломерные концы хромосом, но и повышенный уровень TERT в клетке был ассоциирован с нормальным функционированием системы репарации ДНК (DNA repair machinery) несмотря на то, что TERT напрямую не взаимодействовал с ней [169]. Более того, Masuomi et al показали, что повышение или снижение уровня TERT в клетке значительно влияет на структуру хроматина и снижает радиочувствительность клеток. Так, они установили прямую связь между механизмами, которые поддерживают теломеры, и теми, которые обнаруживают и восстанавливают разрывы во

внутрихромосомной ДНК [170]. Действительно, поскольку белок TRF2, связывающий теломеры [107], по-видимому, временно локализуется в разрывах ДНК [171] и многие белки, участвующие в реакции на повреждение ДНК, ассоциированы с теломерами [172], полученные данной группой наблюдения подтверждают, что механизмы, которые поддерживают теломеры и восстанавливают разрывы ДНК, тесно связаны [170].

Таким образом, теломераза, достраивая теломерные повторы, способствует сохранению целостности сложной дезоксирибонуклеопротеидной структуры, скрывающей концы хромосом, которые могут быть распознаны как двухнитевые разрывы ДНК, от системы репарации ДНК. Так, теломераза участвует в сдерживании запуска клеточной гибели через активацию DDR по ATM и ATR путей, а также обеспечивает сохранение целостности генома. Кроме этого, вероятно, существует взаимосвязь между процессами репарации ДНК и достраивания теломер, что также способствует выживанию клетки в стрессовых условиях.

1.4.2 Неканонические функции TERT

В последнее время появляется всё больше данных о неканонических функциях TERT, не связанных с теломеразной активностью. Различная внутриклеточная локализация (ядро [173,174], цитоплазма [155,175], митохондрии [154,176,177]) обуславливает широкий спектр функциональных активностей TERT [178,179]. Известно её участие в регуляции различных сигнальных путей и экспрессии генов ряда [180–182], защиты от чрезмерной продукции АФК и ацидофикации цитозоля митохондриями [154,183], стресса ЭПР (эндоплазматический ретикулум) [184] и клеточной гибели [145,147,153,185–188]. TERT участвует в регуляции метаболизма [189], аутофагии [190] и поддержании Red/Ox потенциала клетки [191]. Было показано, что теломераза также влияет на устойчивость к апоптозу. Показано, что снижение уровня внутриклеточной TERT вызывает апоптоз или повышает чувствительность к апоптотическим стимулам в раковых клетках *ex vivo* и *in vivo* [181,192,193], независимо от её теломерной функции [194]. Трансдукция гена *TERT* или гена каталитически неактивной мутантной формы (*DN-TERT*) защищала различные линии опухолевых клеток от апоптоза, показывая, что наблюдаемые явления не зависят от канонической функции TERT [107,156,178].

Неканонические функции TERT обширны. Однако общим итогом влияния TERT на различные процессы в клетке является снижение риска ухода клетки в апоптоз. В данном обзоре подробно рассмотрено участие TERT в регуляции запуска клеточной смерти.

1.4.3 TERT напрямую или опосредованно способна изменять экспрессию генов различных сигнальных путей

В настоящее время хорошо известно, что TERT действует как транскрипционный (ко-) фактор для регуляции экспрессии генов ряда сигнальных путей, напрямую связываясь с промотерными областями или стабилизируя локализацию и связывание транскрипционных факторов [188,195,196]. Повышенная экспрессия гена каталитической субъединицы теломеразы, которая часто наблюдается в раковых клетках и значительно способствует их выживаемости, была ассоциирована с изменённой регуляцией ряда белков апоптотического сигналинга. Было показано, что уровень теломеразной активности меняет соотношение факторов Bax/Bcl-2 в клетке [152,197]. Также Zhang et al. продемонстрировали, что экспрессия TERT противодействует апоптозу посредством регуляции Bcl-2, Bcl-X_L, Bax и каспазы-3 в клетках остеосаркомы, причём уровни белка Bcl-2 и Bcl-X_L были значительно повышены, а белок Bax был снижен в группах, трансфицированных *TERT* дикого типа и каталитически неактивной *TERT*, в то время как в клетках, трансфицированных *TERT-siRNA* (малой интерферирующей РНК), наблюдались противоположные паттерны экспрессии [191]. Более того, было показано, что на сам промотер гена *TERT* нацелен целый ряд транскрипционных факторов основных сигнальных путей, таких как NF-κB, c-Myc, β-катенин и STAT3 [145,195,198,199], являющихся положительными регуляторами гена *TERT*, и p53 – отрицательного регулятора [200,201].

1.4.4 Роль TERT в регуляции апоптоза в цитоплазме и митохондриях

В ряде работ было показано, что клетки с повышенным уровнем экспрессии TERT обладают большей устойчивостью к действию внешних повреждающих факторов и более защищены от индукции клеточной смерти [80,107,150–152,155,156,175,176,191]. Однако подобная устойчивость, по последним данным, обусловлена не только внутриядерной активностью TERT (дотраиванием теломерных концов и регуляции экспрессии генов), но и внеядерной регуляцией через прямое взаимодействие с белками апоптотического пути и митохондриями. Было показано, что стресс может индуцировать выход TERT из ядра [155,175,191]. Также протективные свойства TERT были связаны с подавлением митохондриального пути апоптоза [155,176]. Поэтому группа Jin et al. провела анализ аминокислотной последовательности TERT, который показал, что она способна своим ВНЗ-подобным мотивом связывать про- и противоапоптотические белки, такие как Bcl-X_L, Mcl-1 и Bad и так напрямую регулировать индукцию апоптоза. Однако TERT не модулировало взаимодействия комплекса Bcl-X_L/Bax. Также TERT оказалась способна

связывать BECN-1 (Beclin-1), фактор из аутофагического каскада [185]. Было обнаружено, что TERT может противодействовать развитию апоптоза через снижение уровня активации каспаз-3, -8, -9 в ответ на стимуляцию как внутренней, так и внешней ветвей апоптоза. Такая устойчивость клеток с оверэкспрессией TERT была связана со снижением противоапоптотических факторов Bax и Bak и повышением уровня Bcl-2 при неизменном уровне IAPs и XIAP в клетке, а также со значительно повышенным уровнем фосфорилирования p-jnk и низким содержанием tBid, причём ингибирование p-jnk фосфатазой восстанавливало активность каспаз и уровень tBid и таким образом стимулировало апоптоз [152]. Так, помимо внутриядерной регуляции и противоапоптотической защиты, TERT, по накапливающимся данным, способна регулировать многие про- и противоапоптотические факторы как напрямую связывая их в цитоплазме, как и опосредованно, путём изменения активности киназ.

1.4.5 Влияние TERT на эффективность iCasp9

Принимая во внимание роль TERT во взаимодействии с апоптотическим каскадом, становится интересна возможность взаимного влияния продуктов генов *TERT* и *iCASP9* при их одновременной экспрессии в клетках. Дополнительная модификация клеток геном *hTERT*, вероятно, способна модулировать эффективность элиминации клеток, индуцированной iCasp9. Согласно последним данным, TERT не только позволяет клеткам преодолевать предел Хейфлика [202], способствуя увеличению пролиферативного потенциала [13,203,204], но также уменьшает накопление внутриклеточных АФК и, как следствие, гибель клеток [153,154,183]. Более того, TERT может проявлять неканонические функции (не связанные с удлинением теломерных повторов), усиливая выживаемость клеток через модуляцию транскрипции широкого спектра генов, ответственных за регуляцию апоптоза [107,108,205]. TERT также участвует в модуляции NF-κB путём связывания с промоторами его генов-мишеней [180]. Более того, TERT действует как антагонист p53-индуцированного апоптоза [201,206], а уровень TERT коррелирует с повышенной экспрессией Bcl-2 и, как следствие, с противоапоптотической защитой клеток [207]. TERT, вероятно, также может модулировать активность Mcl-1, Bcl-X_L, BAD и BECN путём прямого связывания с ВНЗ-подобным мотивом [208].

Одновременно, известно, что высокие уровни экспрессии трансгена необходимы для эффективной инициации апоптоза в iCasp9-модифицированных Т-клетках [209]. Существуют также исследования, демонстрирующие большую выживаемость iCasp9-клеток при повышенной экспрессии в них противоапоптотического белка Bcl-2 наряду с

неизменным уровнем XIAP, прямого ингибитора каспаз [210–212]. Кроме того, был описан механизм непрямой регуляции между членами семейства BCL-2 и IAPs [213]. Принимая во внимание вероятную роль белков семейства BCL2, стоит отметить, что НК-клетки приобретают повышенную экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X_L в процессе обучения, благодаря чему могут обладать большей устойчивостью к клеточной гибели [214]. Однако, нет окончательного понимания роли TERT, а также её неканонических свойств в противодействии инициации iCasp9-опосредованного апоптоза в модифицированных НК-клетках.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Сборка плазмид

Мы использовали 8 плазмидных ретровирусных векторов для одновременной доставки генов *hTERT*, *DN-hTERT*, *iCASP9* и конструкции *U6-shBIRC3-cPPT* в НК-клетки (Рисунок 2). Чтобы идентифицировать вклад нетеломерных эффектов теломеразы, был проведен сайт-направленный мутагенез области гена *hTERT* в *xlox(GFP)hTERT* (Addgene #69809). Ген *DN-hTERT* из *pBABE-puro-DN-hTERT* (Addgene #1775) использовали в качестве референсной последовательности для клонирования *xlox(GFP)DN-hTERT*.

Для ретровирусной модификации использовали плазмиды, несущие ген *hTERT* - *xlox(GFP)hTERT* (Addgene #69809); ген *DN-hTERT* - *xlox(GFP)DN-hTERT*; и ген *iCASP9* - *pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP* (Addgene #15567). Была собрана плазида *xlox TERT PGK iCasp9 IRES GFP* и *xlox DN-TERT PGK iCasp9 IRES GFP*, несущая оба гена *hTERT/DN-hTERT* и *iCASP9*. Последовательность, содержащую *iCasp9-IRES-GFP*, амплифицировали с помощью полимеразы Encuslo (Евроген, Российская Федерация) и праймеров NotI *iCasp9 F* (5'-cttttcggcggcccccgaatgctcgaggaggagtgcag-3') и *iCasp9 BFP R* (5'- gcctgcaggctgactctag-3'). Затем проводили рестрикцию целевой плазмиды *xlox(GFP)hTERT* (Addgene #69809) и фрагментов ПЦР-фрагмента эндонуклеазой NotI (изошизомер CciNI, СибЭнзим, Российская Федерация) в SE-буфере Y (СибЭнзим). Фрагменты очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген) на каждом этапе в соответствии с инструкциями производителя. Чтобы избежать самозакрывания фрагмента плазмиды в сайте NotI в результате лигирования, его предварительно обработали rSAP, щелочной фосфатазой креветок (New England Biolabs, Великобритания) в буфере rCutSmart™ (New England Biolabs), который удаляет фосфатные группы с 5'-концов. Фрагмент, обработанный фосфатазой, очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген).

Были собраны ретровирусные конструкции *pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP U6-shBIRC3-cPPT*, *xlox TERT PGK iCasp9 IRES GFP U6-shBIRC3-cPPT*, *xlox DN-TERT PGK iCasp9 IRES GFP U6-shBIRC3-cPPT* для РНК-интерференции транскриптов гена *BIRC3*. Регион короткой шпильки (short-hairpin *BIRC3*, *shBIRC3*) собирали в плазмиде pLKO-1 с использованием олигонуклеотидов 5'-CCGGACACATGCAGCCCCTTTAAACTCGAGTTTAAAGCGGCTGCATGTGTTTTG-3' и 5'-AATTCAAAAAACACATGCAGCCCGTTTAAACTCGAGTTTAAAGCGGCTGCATGTGT-3' (Идентификатор клона на сайте <https://portals.broadinstitute.org>: TRCN0000355771). Далее,

фрагменты *iCASP9-IRES-GFP* и *U6-shBIRC3-cPPT* были объединены при помощи перекрывающегося ПЦР (overlap PCR) и перенесены в целевую плазмиду и вставлены по сайту HindIII.

Чтобы избежать samozакрывания фрагмента плазмиды на участке HindIII, мы предварительно обработали фрагмент щелочной фосфатазой креветок (rSAP) (New England Biolabs, Великобритания) в буфере rCutSmart™ (New England Biolabs, Великобритания). Обработанный фосфатазой фрагмент очищали с помощью набора Cleanup Mini (Евроген).

Все фрагменты и соответствующие им векторы смешивали для последующего лигирования ДНК-лигазой Т4 (Евроген) в 5-кратном буфере для быстрого лигирования (Евроген) в течение 15 минут в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию плазмидной ДНК проводили в клеточной линии бактерий *E. Coli XL1-Blue*, культивированной в селективной среде LB+ампициллин. Плазмиду экстрагировали с помощью наборов Plasmid Miniprep и Plasmid Midiprep 2.0 (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. Собранную плазмиду проверили с помощью секвенирования по Сэнгеру, предоставленного компанией "Евроген" (Российская Федерация). Концентрацию ДНК измеряли с помощью Biodrop (Innovative Solutions, США) на каждом этапе.

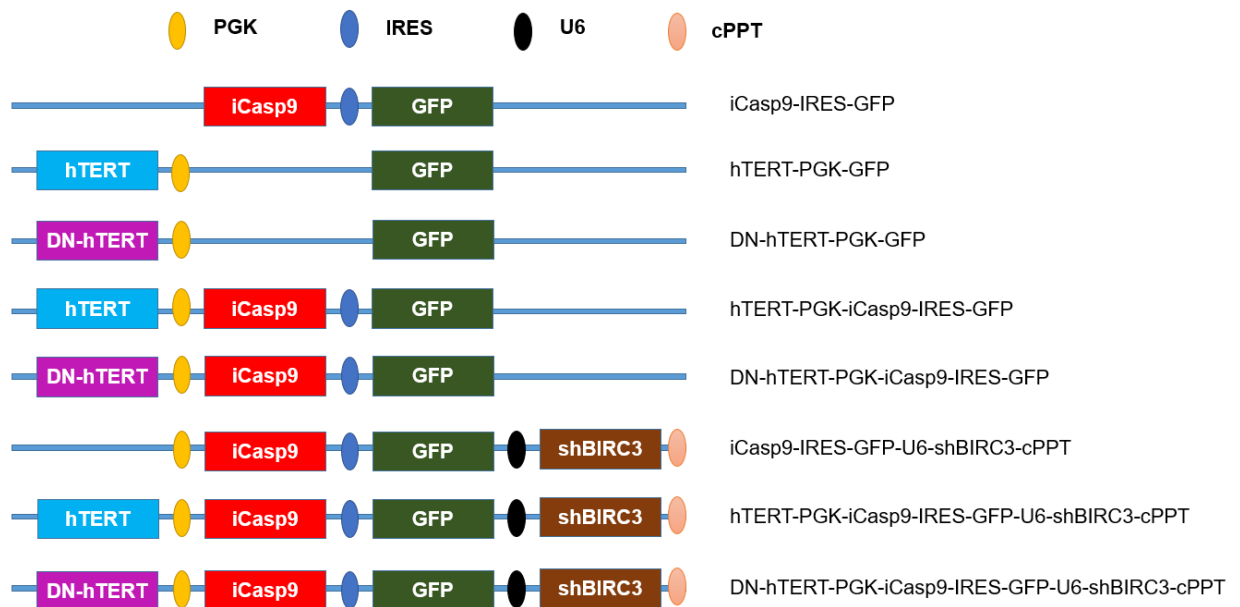


Рисунок 2. Представление плазмидных конструкций, которые применялись для сборки ретровирусных частиц, с целью последующей доставки генов *hTERT*, *iCASP9* и конструкции *shBIRC3* в НК-клетки.

2.2 Клеточные линии

Клеточные линии K562, NK-92, Jurkat, Raji, и NKL были получены из ATCC (Манассасс, США).

Генетически модифицированные мембраносвязанным IL-21 клетки линии K562 (K562-mbIL21) были любезно предоставлены доктором Дином Ли (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA). Эти клетки также экспрессируют CD64, CD86, CD137L и фрагмент рецептора CD19 [97].

Линии клеток Jurkat, Raji, K562 и K562-mbIL21 культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Российская Федерация), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS, HyClone Labs, Логан, США), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Российская Федерация) и 2 mM антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). γ -облученные при 100 Гр с использованием Varian Truebeam (Varian, США) клетки линии K562-mbIL21 использовали в качестве фидера для стимуляции первичных НК-клеток.

NK-92 клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FCS (HyClone Labs), 2 mM L-глутамина (ПанЭко), 2 mM пирувата натрия (ПанЭко), 4 mM заменимых аминокислот (non-essential amino acids, NEAA) (ПанЭко) и 2 mM антибиотик-антимикотика (Sigma-Aldrich) с добавлением IL-2 200 ед./мл (Hoffmann La-Roche, Базель, Швейцария) и IL-15 5 мг/мл (Sigma-Aldrich).

Линию клеток NKL культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко) с добавлением 10% FCS (HyClone Labs), 2 mM L-глутамина (ПанЭко), 2 mM антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich), IL-2 500 ед./мл.

Линию клеток Phoenix-Amro, полученную из линии клеток почек HEK293T, модифицированных для конститутивной экспрессии вирусных генов *Gag-Pol/Tat/Env/Rev*, любезно предоставил доктор Александр Филатов (ГНЦ "Институт иммунологии", Москва, Россия). Линию клеток Phoenix-Amro культивировали в полной среде DMEM (ПанЭко), которая содержала 10% FCS (HyClone Labs), 2 mM пирувата натрия (ПанЭко), 2 mM аланина-глутамина (ПанЭко), 2 mM антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich). Все клеточные культуры культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C.

2.3. Выделение и стимуляция НК-клеток перед трансдукцией

Все процедуры с участием людей проводились в соответствии с комитетом по этике Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И.

Пирогова (протокол №252 от 25 июня 2025 г), а также Хельсинской декларацией 1964 года и последующими поправками к ней или аналогичными этическими стандартами. От всех участников исследования было получено информированное письменное согласие. Из периферической крови, взятой у здоровых добровольцев, проводили выделение на градиенте фиколла 1,077 г/мл (ПанЭко) фракции мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС). НК-клетки выделяли из РВМС с помощью отрицательной магнитной сепарации с помощью коммерческого набора для НК-сепарации (Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для повышения эффективности трансдукции и общей продолжительности жизни НК-клеток [97] свежесодержанные НК-клетки стимулировали 4-6 дней перед процедурой трансдукции γ -облучённой фидерной клеточной линией K562-mbIL21 в пропорции 2_{НК-клетки}/1_{K562-mbIL21} и IL-2 100 ед./мл (Hoffmann La-Roche).

НК-клетки культивировали в среде для НК-клеток, смешанной из 45% DMEM (ПанЭко) с добавлением 2 мМ пирувата натрия (ПанЭко), 2 мМ аланина-глутамин (ПанЭко), 45% среды NK MACS с добавкой (Miltenyi Biotec), 10% FCS (HyClone Labs) и антибиотиком-антимикотиком (Sigma-Aldrich). Концентрацию НК-клеток поддерживали от $6 \cdot 10^5$ клеток/мл до 10^6 клеток/мл. Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂. Среду частично заменяли свежей, концентрацию IL-2 доводили до 100 ед./мл каждые три дня.

2.3.1 Серологический статус hCMV и EBV

Образцы плазмы крови анализировали с помощью наборов ELISA (D-1556 для цитомегаловируса человека (hCMV) и D-2170 для Эпштейн-Барр вируса (EBV), "Вектор-Бест", Новосибирск, Российская Федерация) в соответствии с протоколом производителя.

2.3.2. Генерация клонов и популяций НК-клеток

Для сортировки клеток использовали сортировщик клеток FACSVantageDiVa (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, NJ 07417, США), оснащённый лазерами с длиной волны 405, 488 и 643 нм и соответствующим набором детекторов и фильтров. Перед сортировкой свежесодержанные НК-клетки помещали в буфер для сепарации (PBS, содержащий 0,5% BSA и 2 мМ ЭДТА) и затем метили антителами (Abs), специфичными к CD56, NKG2C, KIR2DL2/3, CD57 для выделения субпопуляций CD57⁻KIR2DL2/3⁻/NKG2C^{-/+}. Отсортированные клетки помещали в 24-луночные планшеты в концентрации 700.000-900.000 клеток на лунку и затем культивировали в клеточной среде NK MACS (Miltenyi Biotec) с добавлением 10^5 на мл фидерных клеток K562-mbIL21 и 100 ед./мл

рекомбинантного IL-2 (Sigma-Aldrich). Стратегия гейтирования и данные о чистоте отсортированных субпопуляций представлены на рисунке 3.

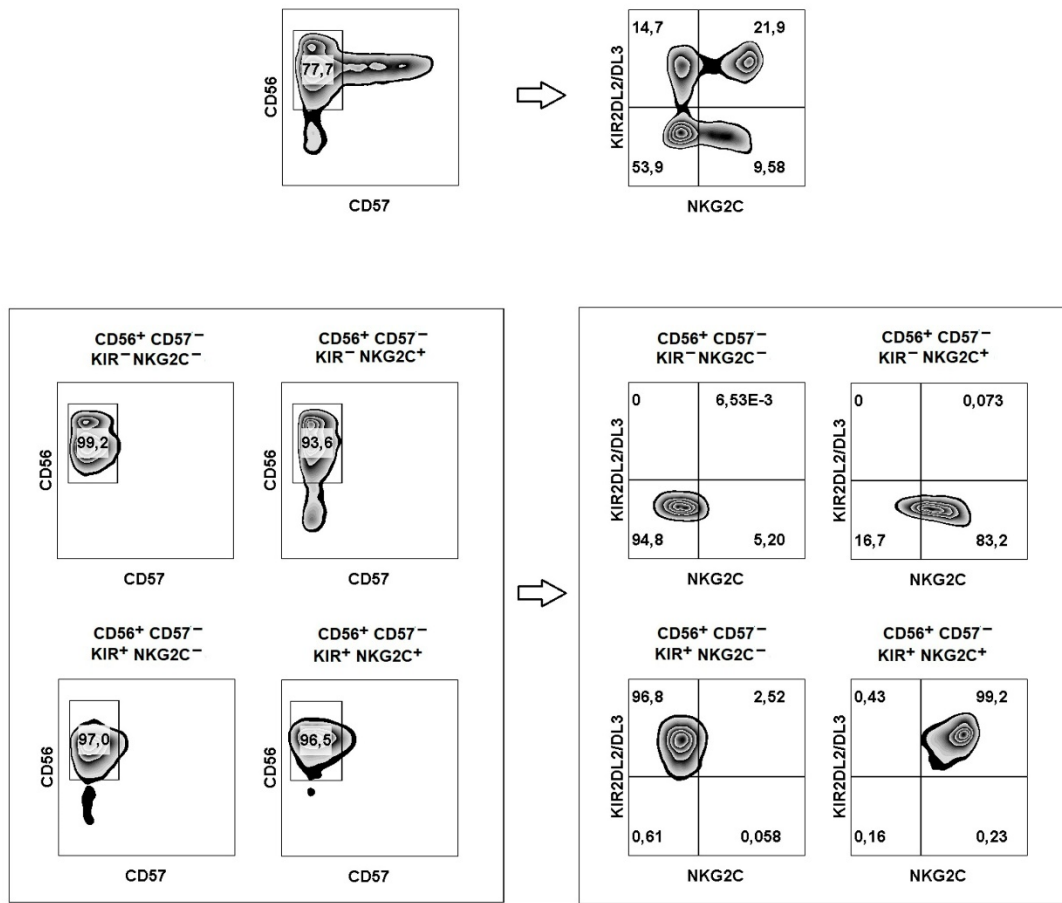


Рисунок 3. Стратегия гейтирования и чистота сортировки НК-клеточных субпопуляций.

2.4 Производство ретровирусных частиц

Клетки Phoenix-Ampro помещали в чашки Петри диаметром 90 мм и 150 мм, покрытые раствором поли-L-лизина (Sigma-Aldrich либо ПанЭко). Phoenix-Ampro трансфицировали, когда их плотность достигала 50-75% покрытия лунки. Для получения RD114-псевдотипированных ретровирусных частиц плазмиду, несущую RD114, и плазмиду, несущую целевой ген, смешивали в соотношении $\frac{1}{2}$ по массе. Затем, клетки линии Phoenix-Ampro трансфицировали кальций-фосфатным методом с применением коммерческих наборов (Biospecifica, Российская Федерация, или ThermoFisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Вирусосодержащий супернатант собирали через 24ч, 48ч, 72ч, 96ч после трансфекции, фильтровали с помощью PES-фильтра Millex-HV-0,45 мкм (Millipore,

Берлингтон, США) и концентрировали ультрацентрифугированием при 21000 g, 4°C, 2,5ч. Концентрированные вирусные частицы собирали в одну пробирку.

2.5 Ретровирусная трансдукция

Перед процедурой трансдукции 24-луночные и 96-луночные планшеты с плоским дном покрывали раствором ретронектина 20 мкг/мл (Clontech/Takara, Маунтин-Вью, Калифорния, США) в PBS (ПанЭко) для повышения эффективности трансдукции. Вирусную суспензию центрифугировали (2,5ч, 1800г, 4°C) на планетах, покрытых ретронектином.

Ретровирусную трансдукцию клеточных линий Jurkat, K562, Raji, NK-92 и NKL или стимулированных НК-клеток проводили на 96-луночных планшетах. Для эффективной трансдукции брали 40 000 клеток Jurkat/Raji/NK-92/NKL/K562 или 80 000 стимулированных НК-клеток из расчета на одну лунку. Количество вирусного концентрата на лунку, используемое для трансдукции НК-клеток, удваивали для поддержания соотношения (количество клеток к объёму вируса). Для всех экспериментов использовали единый сток вирусных частиц. Клетки добавляли в их культуральной среде и центрифугировали 30-45 мин при 300g при комнатной температуре. Трансдуцированные НК-клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. На 3-й день НК-клетки пересаживали из лунок, покрытых ретронектином. Эффективность трансдукции сначала проверяли по наличию флуоресценции GFP. Количество трансдукционных единиц рассчитывали по формуле: Titer = TU/мл (количество трансдукционных единиц на мл = количество трансдуцируемых клеток, N * доля клеток GFP⁺, % / объем вируса, мл / 100%).

Затем генетически модифицированные клетки отделяли от немодифицированных на основе наличия флуоресцентного репортера GFP с использованием сортировщика клеток FACSVantageDiVa.

2.6 Культивирование трансдуцированных НК-клеток

Через месяц после выделения *ex vivo* отсортированные трансдуцированные и НК-клетки и немодифицированные контрольные клетки исследовали на выживаемость, пролиферацию, экспансию и персистенцию *in vitro*. Было исследовано 3 метода стимуляции НК-клеток: 1) НК-клетки культивировали в присутствии IL-2 100 ед./мл (Sigma-Aldrich); 2) НК-клетки растили в среде, содержащей IL-2 100 ед./мл (Sigma-Aldrich) в сочетании с ежемесячно добавляемым фидером K562-mbIL21 в соотношении 2/1=НК-клетки/K562-mbIL21; 3) НК-клетки стимулировали комбинацией IL-2 100 ед./мл (Sigma-Aldrich) с IL-15

10 нг/мл (Sigma-Aldrich). NK-клетки культивировали в 96-луночных планшетах с U-образным дном с начальным количеством 75 000 клеток на лунку. Все популяции были посажены в триплетах. Половинную смену среды проводили два раза в неделю.

2.7 Проточная цитометрия

Анализ методом проточной цитометрии был проведён с использованием цитометра MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec), оснащённого лазерами с длиной волны 405 нм, 488 нм и 635 нм. Эффективность трансдукции была подтверждена путём детекции флуоресценции GFP на 5-й день после открутки клеток на ретронектине. Результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения FlowJo версии V10 (TreeStar Williamson Way, Эшленд, США).

2.7.1 Окрашивание поверхности

Окрашивание поверхности проводили следующими антителами: KLRG-1-APC (код: FHK277200-APC, Antibody System, Китай), TIM-3 (клон: F38-2E2, Biolegend, США), TIGIT-PE (код: FHH72420-PE, Antibody System), PD-1-AF647 (клон: EH12.2H7, Biolegend), NKG2A-PE-Vio770 (клон: REA1161, Miltenyi Biotec), NKG2C-AF488 (клон: 108724), NKG2C-APC (cat: FAB138A), NKG2C-PE (клон: 134591, R&D, США), HLA-DR-PE-Vio770 (клон: REA805, Miltenyi Biotech), KIR2DL2/3-APC (клон: DX27, Miltenyi Biotec), KIR2DL2/3-PE (клон: DX27), KIR2DL2/3-PE-Vio615 (клон: REA1006, Miltenyi Biotech), NKp30-PE (клон: P30-15, Sony, США), NKp44-PE-CY7 (клон: P44-8, Sony), NKp46-AF647 (клон: 9E2, Sony), CD16-PE (клон: 3G8, Sony), CD56-APC-Vio770 (клон: REA19,6 Miltenyi Biotec), CD56-APC (клон: HCD56), CD56-PE-Cyanine7 (клон: 5.1H11, Sony), CD56-BV421 (клон: 5.1H11, Sony) CD56-BrilliantViolet (клон: HCD56), CD57-APC (клон: HKN-1, Sony), CD57-VioBlue (клон: TB03, Sony), CD57-PE-Vio770 (клон: REA769, Sony). Окрашенные флуоресцентномеченными антителами клетки инкубировали в течение 30 мин при 4°C в буфере для окрашивания PBA (фосфатносолевым буфером (PBS), содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Serva, Гейдельберг, Германия) и 0,01% азида натрия (AMRESCO Inc., Aurora, США), затем промывали PBS. Было зарегистрировано не менее 30 000 событий для NK-клеток в гейте FSC-SSC и не менее 5 000 событий для фракций NK-клеток.

Экспрессию hTERT и транскрипционных факторов Eomes и T-Bet оценивали с использованием кроличьего поликлонального антитела к TERT (cat#DF7129, Affinity Biosciences, США) со вторичным 647-конъюгированным козым анти-кроличьим IgG (H+L)

(cat#AS060, ABclonal, США), моноклонального антитела EOMES-eFlour660 (клон: WD1928, Invitrogen, США) и моноклонального антитела Т-ВЕТ-РЕ (клон: 4B10, Biolegend, США). Клетки фиксировали с помощью буферного набора для окрашивания eBioscience™Foxp3/Транскрипционный фактор (артикул: 00 5523-00, лот: 1945425) (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

2.7.2 Анализ дегрануляции

Немодифицированные и трансдуцированные НК-клетки сравнивали с помощью анализа дегрануляции. Поверхностную экспрессию CD107a (LAMP-1-PE/CFP (клон: H4A3, Sony) детектировали после совместного культивирования НК-клеток с их мишенями (клеточная линия K562). В течение 24ч НК-клетки поддерживали в культуральной среде без IL-2 при плотности 1 млн клеток/мл. Затем, клетки стимулировали IL-2 500 ед./мл (Sigma-Aldrich) в течение ночи. После, добавляли клетки-мишени K562 в соотношении 1/1 и инкубировали в течение 2,5ч при 37°C, CO₂ в присутствии анти-CD107a mAb (CD107a-PE-Cy7, клон: H4A3, Sony) и 10 мкг/мл Брефельдина А (Invitrogen) в культуральной среде с IL-2 500 ед./мл (Sigma-Aldrich). Наконец, был проведён анализ методом проточной цитометрии. Анализ дегрануляции проводили для смешанной популяции НК-клеток (нетрансдуцированных GFP⁻ и трансдуцированных GFP⁺) путем гейтирования цитометрических данных.

2.7.3 Анализ цитокин-индуцированной продукции IFN-γ

Ответ на цитокининдуцируемую продукцию IFN-γ измеряли среди трансдуцированных и нетрансдуцированных НК-клеток. Вначале, клетки поддерживали в культуральной среде без IL-2 (Sigma-Aldrich) при плотности 10⁶ клеток/мл в течение 24ч. Далее, НК-клетки культивировали в присутствии IL-2 100 ед./мл (Sigma-Aldrich), IL-18 20 нг/мл и IL-12 20 нг/мл (R&D system, США) в течение ночи. После, добавляли 10 мкг/мл Брефельдина А (Invitrogen) и инкубировали ещё 4 ч. Внутриклеточное окрашивание IFN-γ проводили с использованием антитела IFN-γ-PE (Miltenyi Biotec, клон REA600) и набора BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США). Для анализа IFN-γ брали смешанную популяцию НК-клеток (нетрансдуцированные GFP⁻ и трансдуцированные GFP⁺), а модифицированные НК-клетки определяли методом гейтирования данных проточной цитометрии.

2.7.4 Измерение количества клеток

При каждом измерении отбирали равные объёмы клеточной суспензии. NK-клетки автоматически метили половиной объёма раствора 1/1000 SYTOX-VioBlue (Invitrogen) в PBS. Живые клетки определяли, как по флуоресценции GFP в модифицированных клетках, так и по отсутствию флуоресценции SYTOX-VioBlue.

2.8 Оценка каталитической активности hTERT в NK-клетках

Каталитическую активность теломеразы тестировали с помощью протокола амплификации теломерных повторов (TRAP), подробно описанного в [215]. Использовался метод количественной оценки Q-TRAP. Метод Q-TRAP состоит из двух этапов. Во-первых, обратная транскриптаза теломеразы из лизированных клеток удлиняет теломерные повторы. Во-вторых, прямой и обратный праймеры амплифицируют последовательность, появившуюся благодаря активности теломеразы. Сигнал амплификации измеряют с помощью детекции флуоресцентного красителя SYBR Green и анализируют с нормализацией по базовому сигналу.

2.9 Индукция клеточной гибели в iCasp9-NK-клетках химическим индуктором димеризации

iCasp9-клетки вместе с iCasp9-немодифицированными клетками инкубировали в течение 1, 2 и 24 ч в среде с добавлением: PBS, ДМСО, 10 нМ и 100 нМ, 150 нМ и 200 нМ химического индуктора димеризации (CID) (AP20187, MedChemExpress, Монмут Джанкшен, США). Образцы с добавлением ДМСО использовали в качестве контроля. ДМСО добавляли концентрации, соответствующей его содержанию в образце со 100 нМ CID.

Уровень апоптоза и жизнеспособность клеток измеряли методом проточной цитометрии путём окрашивания AnnexinV-AF647 (Invitrogen) или AnnexinV-PE (Invitrogen) и Sytox-VioBlue (Invitrogen) или SYTOX AADvanced Dead Cell Stain (Invitrogen). Увеличение процента погибших NK-клеток рассчитывали по формуле: $\Delta\% = \text{доля мёртвых NK-клеток после инкубации с 10 нМ или 100 нМ CID, \%} - \text{доля мёртвых NK-клеток в контроле, \%}$.

2.10 Анализ экспрессии генов

2.10.1 Количественная полимеразная цепная реакция (qPCR)

Подготовку образцов клеток и выделение тотальной РНК проводили с помощью реактива ExtractRNA (Евроген). Образцы очищали от геномной ДНК набором TURBO DNA-free™ (Invitrogen). Ревертазу MMLV и стандартный праймер 18dТ использовали для получения кДНК путём обратной транскрипции тотальной РНК. Применяли протокол для обратной транскриптазы MMLV (Евроген).

Уровень экспрессии генов *ACTB*, *BAD*, *BAK1*, *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *BIRC5*, *BIRC3*, *DIABLO*, *EOMES*, *iCasp9*, *MCL1*, *PMAIP1*, *BBC3*, *TBX21*, *hTERT*, *TIM3*, *TIGIT*, *PD1*, *LAG3*, *CISH*, *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3* в модифицированных и контрольных клетках изучали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (qPCR). Для этого кДНК образцов амплифицировали набором праймеров, приведенных в таблице 1, с использованием системы ПЦР в реальном времени CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Интеркалирующий краситель qPCRmix-HS SYBR (Евроген) применяли для детекции сигнала. Данные анализировали в программе BioRad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories). Метод 2-ΔΔC_q использовали для расчета относительной экспрессии генов-мишеней, *ACTB* был выбран в качестве внутреннего эталонного гена для нормализации.

Таблица 1. Праймеры для qPCR

Gene	Primer	Primer sequence
<i>ACTB</i>	B-actin F	CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG
	B-actin R	GTC TCA AAC ATG ATC TGG GTC
<i>BAD</i>	Bad F	TGT GGA CTC CTT TAA GAA GGG AC
	Bad R	CAC CAG GAC TGG AAG ACT CG
<i>BAK1</i>	Bak F	GAT CCC GGC AGG CTG ATC C
	Bak R	GTA GCT GCG GAA AAC CTC CT
<i>BAX</i>	Bax F	TCA TGG GCT GGA CAT TGG AC
	Bax R	GCG TCC CAA AGT AGG AGA GG

<i>BCL2</i>	Bcl-2 F	GTG GAG GAG CTC TTC AGG GAC
	Bcl-2-R	ATG ACC CCA CCG AAC TCA AAG
<i>BCL2L1</i>	Bcl-X _L F	AGG CGG ATT TGA ATC TCT TTC TCT
	Bcl-X _L R	GGG CTC AAC CAG TCC ATT GT
<i>BIRC5</i>	BIRC-5 F	CCA CTG AGA ACG AGC CAG AC
	BIRC-5 R	GTT CCT CTA TGG GGT CGT CAT
<i>DIABLO</i>	Diablo F	AGT AAC CCT GTG TGC GGT TC
	Diablo R	ACT GCT CTC CTC ATC AAT GCT
<i>EOMES</i>	Eomes F	AGG CGC AAA TAA CAA CAA CAC C
	Eomes R	ATT CAA GTC CTC CAC GCC ATC
<i>iCASP9</i>	iCasp-HA F	TGG GCT CAC TCT GAA GAC CT
	iCasp-HA R	AGT GCG TAG TCT GGT ACG TC
<i>MCL1</i>	Mcl-1 F	TAC TTT GGC TTG GTT TCC ATG A
	Mcl-1 R	ATT ACT GAG CCT TCC GTC AAG T
<i>PMAIP1</i>	Noxa F	ACG AGG AAC AAG TGC AAG TAG C
	Noxa R	CAG GTT CCT GAG CAG AAG AGT T
<i>BBC3</i>	Puma F	GAT GAA ATT TGG CAT GGG GTC T
	Puma R	AGG GCT GAG GAC CAC AAA TCT
<i>TBX21</i>	T-bet F	CTG GAT GCG CCA GGA AGT TT
	T-bet R	CTG GAG CAC AAT CAT CTG GGT
<i>hTERT</i>	hTERT F	GCC TGA GCT GTA CTT TGT CAA
	hTERT R	GGT TTG ATG ATG CTG GCG AT
<i>TIM3</i>	TIM3-F	TCC AAG GAT GCT TAC CAC CAG
	TIM3-R	AAT GTG GAT ATT TGT GTT AGA TT

<i>TIGIT</i>	TIGIT-F	GGT CCT AGA AAG CTC AGT GGC
	TIGIT-R	TTC TAG TCA ACG CGA CCA CC
<i>PDI</i>	PD1-F	GTT TCC CTT CCG CTC ACC T
	PD1-R	GTC TAA GAA CCA TCC TGG CCG
<i>LAG3</i>	Lag3-F	GGC AAT CAT CAC AGT GAC TCC
	Lag3-R	GAG CTC CAC ACA AAG CGT TC
<i>CISH</i>	CIS-F	TTC AGG GAC CTC GTC CTT TG
	CIS-R	ATG ACT GGC TTG GGC AGT TC
<i>SOCS1</i>	SOCS1-F	TCT CAC CTC TTG AGG GGG TC
	SOCS1-R	AGA GGT AGG AGG TGC GAG TT
<i>SOCS2</i>	SOCS2-F	CTT GAG CCC TCC GGG AAT G
	SOCS2-R	TCC CCA GTA CCA TCC TGT CT
<i>SOCS3</i>	SOCS3-F	ACT GAG CCG ACC TCT CTC CT
	SOCS3-R	GGC AGC TGG GTC ACT TTC TC
<i>XIAP</i>	IAP F	ACT GCC CCC ATC CGG TTC
	IAP R	GAC TTG TCC ACC TTT TCA CTT GG
<i>BIRC3</i>	BIRC-3 F	AGT GGT TTC CAA GGT GTG AGT
	BIRC-3 R	CTC CTG GGC TGT CTG ATG TG

2.10.2 Транскриптомный анализ

hTERT-NK-клетки, hTERT-iCasp9-NK-клетки и iCasp9-NK-клетки собирали для РНК-анализа через месяц после выделения из периферической крови. Каждый образец (hTERT-NK-клетки, hTERT-iCasp9-NK-клетки, iCasp9-NK-клетки) собирали в триплетах в буфер RLT (Invitrogen). (CID)-iCasp9-NK-клетки отмывали трижды. После окрашивания AnnexinV-PE (Invitrogen) и SYTOX AADvanced Dead Cell Stain (Invitrogen) (CID)-iCasp9-NK-клетки сортировали, отбирая клетки AnnexinV-PE⁻ SYTOX AADvanced⁻ GFP⁺. Для

получения библиотеки RNAseq применяли набор KAPA RNA HyperPrep Kit (Roche, Базель, Швейцария) и KAPA Unique Dual-Indexed (UDI) Primer Mixes (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Данные были получены с помощью Illumina NovaSeq X в режиме парных прочтений. Данные были проанализированы на платформе UseGalaxy [216] и выровнены на сборке генома человека hgGRCh38. Последовательность действий и применяемые пакеты: trimmomatic, salmon, DESeq2. Результаты DESeq2 были проанализированы с использованием библиотеки Cluster Profiler R [217] с использованием геной онтологии (GO), KEGG [218] и базы данных GSEA [219,220]. Гены с $p\text{-adjusted (p-adj)} < 0,05$ подвергали анализу gseGO, gseKEGG и fgsea. Гены с $p\text{-adj} < 0,05$ и $\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0,58$ рассматривались как дифференциально экспрессированные гены (DEGs) и анализировались пакетами enrichGO и enrichKEGG. Анализ сплайсинга проводился на платформе usegalaxy согласно следующему руководству <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/differential-isoform-expression/tutorial.html>.

2.11 Статистический анализ

С помощью программного обеспечения FlowJo версии V10 (TreeStar Williamson Way, США) анализировали данные проточной цитометрии. Статистический анализ проводили в программном обеспечении GraphPad Prism 9 (StatSoft Inc., Талса, Оклахома, США), пакетов Python и R. P-value: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Подбор праймеров проводили с помощью веб-инструмента Primer BLAST (NCBI, США). План переклонирования плазмиды был выполнен с использованием SnapGene v3.2.1. (GSL Biotech LLC, США). Данные qPCR анализировали в программе BioRad CFX Maestro (Bio-Rad Laboratories, США).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оптимизация процедуры ретровирусной трансдукции первичных НК-клеток

3.1.1 Время сбора вирусного супернатанта и тип модифицированной клетки существенно влияют на эффективность трансдукции

В настоящее время широко используется общепринятая методика тестирования стока вирусных частиц на клеточных линиях для расчета MOI [221], который позволяет оптимизировать количество вирусных частиц, необходимое для инфицирования первичных НК-клеток. Однако в работах часто указывается количество MOI без упоминания лимф. клеток, по которой производился расчет MOI [222–225]. Тем не менее, результаты титрования вирусного супернатанта могут различаться в зависимости от выбранной клеточной линии.

Нами был проведён сравнительный анализ клеточных линий для оценки эффективности заражения вирусными частицами, псевдотипированными по белку оболочки RD114. В исследовании участвовали линии лимфоцитарных клеток и первичные НК-клетки, которые были предварительно активированы в течение 5 дней комбинацией фидерных клеток IL-2 и K562-mbIL21. Для анализа были выбраны В-клеточная лимфома Раджи (Raji), Т-клеточная лимфома Юрката (Jurkat) и линия НК-клеток (NKL). Эксперимент проводили с использованием ретровирусных частиц, несущих гены *iCASP9* и *GFP*. Мы подготовили общий вирусный материал для всех экспериментов, чтобы обеспечить равные условия при каждой процедуре трансдукции. Процентное содержание клеток GFP⁺ и среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI) GFP в клетках измеряли через 5 дней после процедуры трансдукции методом проточной цитометрии (Рисунок 4). Максимальная доля трансдуцированных клеток GFP⁺ была обнаружена среди клеток линии Raji. Среди исследованных клеточных линий клетки линии NKL показали наименьшую восприимчивость к ретровирусной трансдукции, которая была сравнима с данными, полученными на активированных НК-клетках периферической крови (Рисунок 4А). Линии Raji и Jurkat не показали разницы в MFI в GFP. Также не было выявлено существенных различий между NKL и первичными НК-клетками по интенсивности флуоресценции GFP. При этом, линии Raji и Jurkat характеризовались большими уровнями MFI GFP в сравнении с NKL и НК-клетками (Рисунок 4Б).

Использование вирусного материала, собранного в разные дни, значительно влияло на долю GFP-позитивных клеток, но не на их MFI (Рисунок 4Б). Вирусные супернатанты,

собранные через 96ч, продемонстрировали самую низкую эффективность трансдукции по сравнению с вирусными частицами, собранными через 24ч, 48ч и 72ч после трансфекции (Рисунок 4). Относительное увеличение числа GFP-позитивных клеток [отношение максимальной средней эффективности трансдукции (48 ч и 72 ч) к минимальной (96 ч)] было обнаружено для Raji = 3,0, Jurkat = 3,1, NKL = 3,8 и NK-клеток = 3,6. Однако не было обнаружено статистической разницы в процентном содержании GFP-позитивных клеток для 48-часового и 72-часового сбора вируса (Рисунок 4А). Для всех использованных клеточных линий и первичных NK-клеток было продемонстрировано увеличение содержания GFP-позитивных клеток в вирусных супернатантах, собранных через 48ч и 72ч после трансфекции, по сравнению с супернатантами, собранных на временных интервалах 24ч и 96ч (Рисунок 4А). Это позволило сделать вывод, что оптимальный период сбора вирусосодержащих супернатантов – от 48 до 72 часов.

Был рассчитан средний титр частиц (ТУ/мл) для каждой клеточной линии (Таблица 2). В таблице 3 приведены MOI для NK-клеток, рассчитанные относительно различных клеточных линий. Для клеточных линий Jurkat и NKL значение MOI составляло приблизительно 1, что отражает эквивалентное соотношение между титром вирусных частиц и эффективностью ретровирусной трансдукции клеточных линий Jurkat и NKL и NK-клеток. Одновременно, значения MOI, полученные для клеточной линии Raji, варьировали от 1,5 до 2,6 в зависимости от дня сбора вирусных частиц. Таким образом, было обнаружено, что не только тип контрольной клеточной линии, но и сроки сбора вирусного супернатанта влияют на значения MOI для NK-клеток.

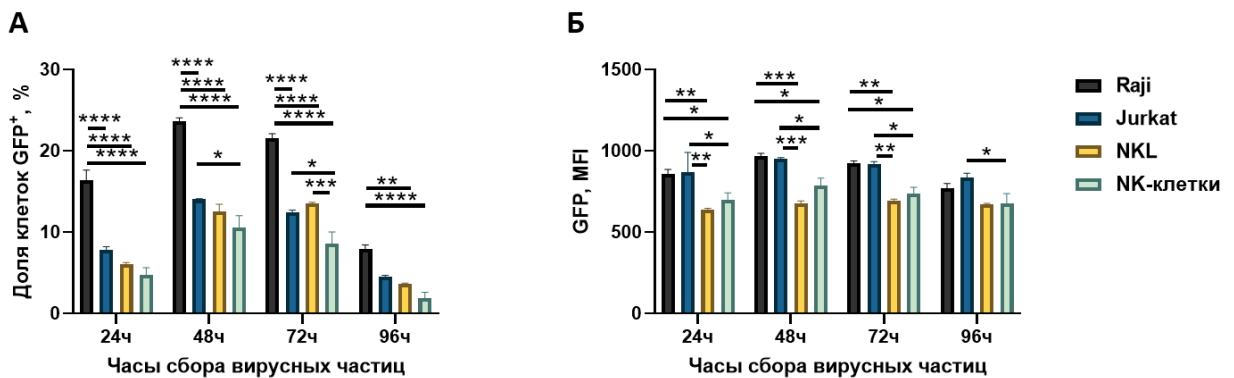


Рисунок 4. Эффективность ретровирусной трансдукции клеточных линий Raji, Jurkat и NKL и первичных NK-клеток. Время сбора вирусных частиц (через 24ч, 48ч, 72ч или 96ч после процедуры трансфекции) влияло на эффективность трансдукции каждой клеточной линии и первичных NK-клеток. Измерения клеток GFP⁺ проводились через 5 дней после процедуры трансдукции. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM для клеток

Raji n=3, клеток Jurkat n=3, клеток NKL n=3 и для NK-клеток n=4. Для разных сроков сбора вирусных частиц использовали многократный двусторонний анализ ANOVA с коррекцией по Тьюки.

Таблица 2. Количество функциональных вирусных частиц (TU, transduction units) в 1 мл супернатанта, способного трансдуцировать одну клетку.

	Raji	Jurkat	NKL	NK-клетки
24ч	8764,4	4168,9	3262,2	3824,7
48ч	12604,4	7493,3	6720,0	8337,4
72ч	11502,2	6613,3	7235,6	6822,5
96ч	4216,9	2436,4	1921,8	1622,0

Таблица 3. Отношение количества вирусных частиц к количеству клеток-мишеней во время заражения (MOI, Multiplicity of Infection), рассчитанное для NK-клеток относительно разных клеточных линий.

	Raji/NK-клетки	Jurkat/NK-клетки	NKL/NK-клетки
24ч	2,3	1,1	0,9
48ч	1,5	0,9	0,8
72ч	1,7	1,0	1,1
96ч	2,6	1,5	1,2
Среднее по дням	2,0	1,1	1,0

3.1.2 Эффективность трансдукции зависит от экспрессии KIR2DL2/3 и NKG2C, причём уровень трансдукции выше среди NK-клеток KIR2DL2/3⁺ NKG2C⁺

Далее, было проведено изучение эффективности трансдукции популяций NK-клеток на разных стадиях NK-клеточной дифференцировки. В данном эксперименте мы исследовали эффективность модификации NK-клеток, с фенотипом предшественников NK-клеток памяти (“memory-like” CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺), которые являются терминально дифференцированной фракцией NK-клеток, расширяющейся при hCMV инфекции [226].

НК-клеточная дифференцировка характеризуется последовательным приобретением ингибирующих рецепторов KIR2DL2/3 и NKG2C на НК-клеточной поверхности, а также CD57, маркера терминальной дифференцировки [227,228]. Поскольку НК-клетки CD57⁺ характеризуется наименьшим пролиферативным потенциалом и низкой восприимчивостью к ретровирусной трансдукции [13,229], мы проводили эксперимент на популяции НК-клеток CD57⁻.

Для экспериментов по трансдукции были отобраны четыре hCMV-серопозитивных добровольца с высоким содержанием клеток NKG2C⁺ (более 13% от общего количества НК-клеток). Фракции клеток CD57⁻KIR2DL2/3^{+/-}NKG2C^{+/-} были отсортированы из свежевыделенных НК-клеток.

Для изучения эффективности трансдукции субпопуляций НК-клеток был использован общий сток концентрированного вирусного супернатанта, собранный с использованием γ -ретровирусного вектора *pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP*. Данная конструкция позволяет трансдуцировать ген *iCASP9*, который даёт возможность в течение короткого времени элиминировать все и только *iCasp9*-модифицированные клетки, в случае развития побочных явлений в терапии.

Количество единиц трансдукции (TU) на мл было протестировано на клеточной линии NK-92, и среднее значение составило 42 000 TU/мл. Вирусосодержащий супернатант был сконцентрирован из расчёта 1,5 TU на одну НК-клетку. Успешность модификации была подтверждена по наличию флуоресценции GFP.

Все четыре проанализированные популяции НК-клеток были в различной степени восприимчивы к трансдукции ретровирусными частицами, несущими ген *iCASP9* (Рисунок 5). Наибольший уровень НК-клеток GFP⁺ наблюдался в KIR2DL2/3-положительных подгруппах, а именно, в популяциях KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ и KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻, где уровень GFP в НК-клетках составлял 13,3±1,3%, и 12,5±1,9%, соответственно. KIR2DL2/3-отрицательные подгруппы KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺ (доля НК-клеток GFP⁺ 10,0±0,9%) и KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻ (доля НК-клеток GFP⁺ 5,5±2,3%) показали меньшую восприимчивость к трансдукции в сравнении с KIR2DL2/3-положительными клетками, с наибольшими отличиями между дважды положительной и дважды отрицательной популяциями НК-клеток (Рисунок 5А). Уровень интенсивности флуоресценции GFP был несколько выше в субпопуляции НК-клеток KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺ в сравнении с субпопуляцией НК-клеток KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻ (Рисунок 5Б).

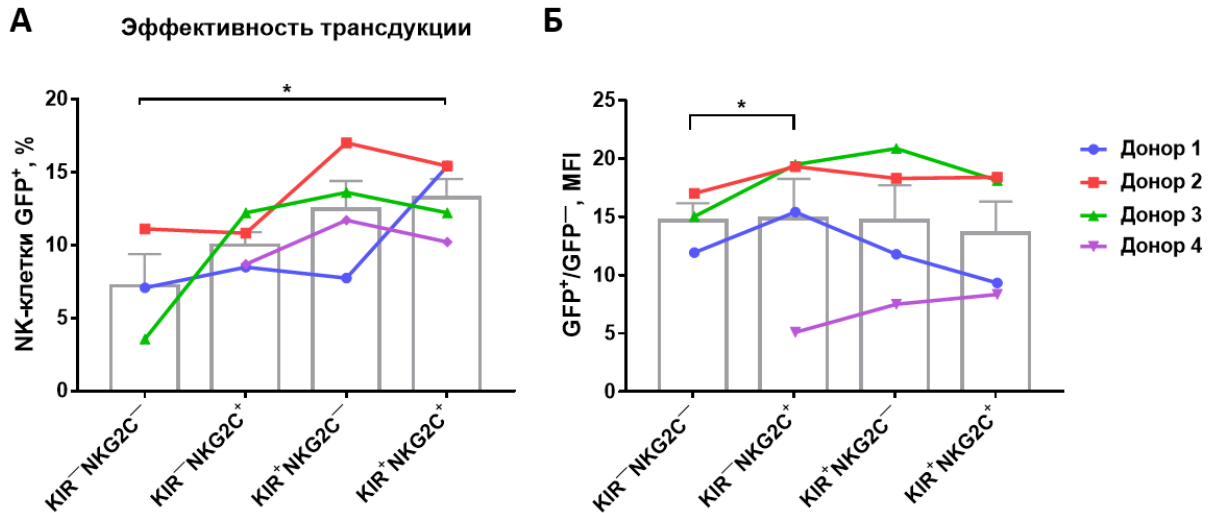


Рисунок 5. Проведено сравнение эффективности трансдукции субпопуляций NK-клеток CD57⁻KIR2DL2/DL3^{+/-}NKG2C^{+/-}, стимулированных K562-mbIL21 и IL-2. Трансдукцию проводили ретровирусными частицами, несущими гены *iCASP9* и *GFP*. Процентное содержание NK-клеток GFP⁺ было измерено на 5-й день после процедуры трансдукции для каждой субпопуляции. А) Доля NK-клеток GFP⁺ в указанных субпопуляциях. Б) Средний уровень флуоресценции GFP (MFI) в субпопуляциях NK-клеток, нормализованный на MFI соответствующих субпопуляций NK-клеток GFP⁻, n = 4. А, Б) Статистический анализ проводили с использованием парного t-критерия (* p < 0,05). Данные по отдельным донорам соединены линиями. Столбцы представляют средние значения ± SE.

3.1.3 Проверка стабильности трансгена *iCASP9* в модифицированных NK-клетках путём мониторинга уровня экспрессии репортерного гена *GFP*

Затем в течение 10 дней мы проследили динамику соотношения NK-клеток GFP⁻ и GFP⁺ в каждой культуре, подвергнутой процедуре ретровирусной трансдукции. Стабильность трансгена была проверена путём регистрации доли клеток GFP⁺, а также интенсивности флуоресценции GFP на 5, 10 и 15 день после трансдукции. Статистической разницы в уровне экспрессии репортерного белка между субпопуляциями NK-клеток обнаружено не было (Рисунок 6А). Хотя MFI GFP снижался с 5 по 10 день после трансдукции во всех исследованных популяциях NK-клеток (Рисунок 6Б), это согласовалось с ростом пролиферативной активности популяций NK-клеток в данный временной интервал (Рисунок 6В).

Для клеток млекопитающих ранее было показано, что уровень экспрессии трансгена может снижаться после ретровирусной трансдукции [230]. Однако, нельзя исключить

вероятность непреднамеренной спонтанной димеризации суицидальной конструкции iCasp9 вследствие её высокой внутриклеточной концентрации, которая могла привести к гибели клеток, высокоэкспрессирующих трансген.

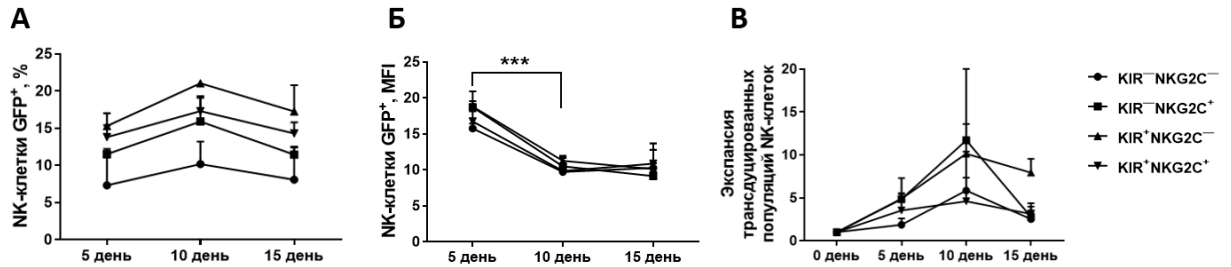


Рисунок 6. Динамика iCasp9-NK-клеток GFP⁺ (n = 2) в субпопуляциях NK-клеток CD57-KIR2DL2/DL3^{+/-}NKG2C^{+/-} в течение 2 недель после трансдукции. А) Динамика доли NK-клеток GFP⁺. Б) Сравнение средней интенсивности флуоресценции GFP (MFI), нормализованной по MFI NK-клеток GFP⁻. В) Сравнение динамики численности iCasp9-NK-клеток после трансдукции, нормированной на исходное количество клеток в субпопуляциях. (А–В) Статистический анализ проводился с использованием парного t-критерия (***) p < 0,001); показаны средние значения ± SE.

3.2 Одновременная доставка генов *hTERT* и *iCASP9* в NK-клетки

Для преодоления возможного истощения NK-клеток может быть использована трансдукция гена *hTERT*, кодирующего каталитическую субъединицу обратной транскриптазы теломеразы человека. Уже было показано, что *hTERT* повышает репликативный потенциал и сохраняет активированное состояние NK-клеток, культивируемых *in vitro* [13,14]. Однако избыточная экспрессия *hTERT* обычно ассоциируется со злокачественной трансформацией [71], поэтому использование таких клеток без облучения или соответствующего контроля, например, конструкцией iCasp9 небезопасно [70,110].

В этой работе мы получили три вида генно-инженерных NK-клеток, модифицированных генами, способствующими выживанию (*hTERT*) и гибели (*iCASP9*): hTERT-NK-клетки, hTERT-iCasp9-NK-клетки и iCasp9-NK-клетки. Поскольку NK-клетки характеризуются врождённой устойчивостью к инфицированию вирусными частицами, доставку обоих генов *hTERT* и *iCASP9* производили при помощи единой конструкции, собранной из плазмид *pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP* и *xlox(GFP)hTERT*.

3.2.1 Получение НК-клеток, модифицированных генами *hTERT* и *iCASP9*

Активированные НК-клетки были трансдуцированы ретровирусными частицами, несущими гены *hTERT* и *iCASP9*. Уровни экспрессии трансгенов были проверены методом qPCR на НК-клетках, отсортированных по наличию флуоресценции GFP. Уровень экспрессии *hTERT* был выше в *hTERT*-НК-клетках (медиана: 21,6) и *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетках (медиана: 5,9) по сравнению с нетрансдуцированными (медиана: 1,5) и *iCasp9*-НК-клетками (медиана: 0) (Рисунок 7А). Экспрессия гена *iCASP9* была обнаружена в *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетках (медиана: 4,6) и *iCasp9*-НК-клетках (медиана: 4,8), тогда как в *hTERT*-НК-клетках и нетрансдуцированных НК-клетках экспрессия *iCASP9* не была обнаружена (Рисунок 7Б). Уровень каталитической активности теломеразы был повышен среди НК-клеток, модифицированных соответствующим геном, по сравнению с нетрансдуцированными и *iCasp9*-НК-клетками (Рисунок 7В).

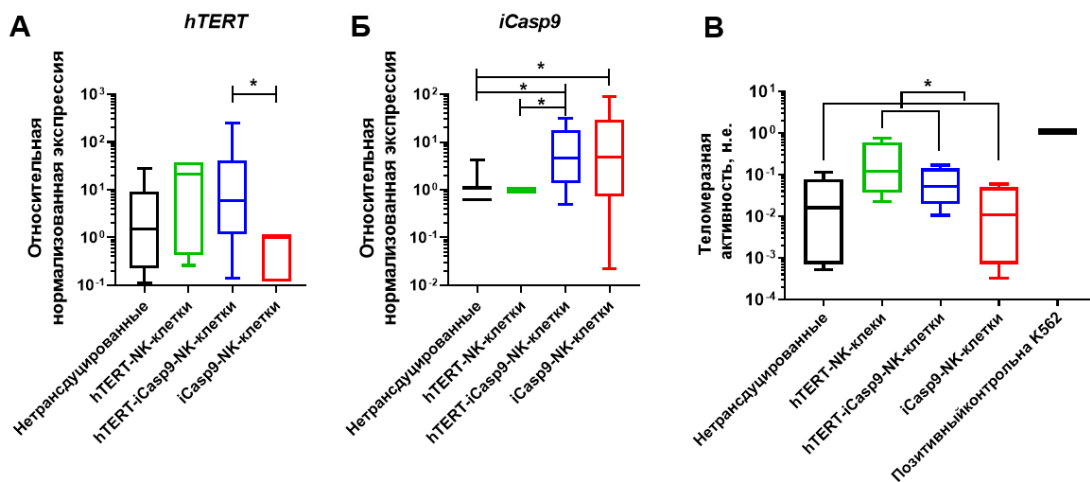


Рисунок 7. Ретровирусная трансдукция НК-клеток генами *hTERT* и/или *iCASP9*. А) Уровень экспрессии трансгена *hTERT*, нормализованный с помощью гена домашнего хозяйства *ACTB*, оценивался qPCR анализом (n=7). * $p < 0,05$. Б) Нормализованные уровни экспрессии трансгена *iCASP9*, полученные с помощью анализа qPCR (n=7). Тест Фридмана с множественным сравнением Данна, медиана, p-value: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. В) Активность теломеразы в модифицированных НК-клетках, определённая с помощью анализа qTRAP (n=4). В качестве положительного контроля использовали клеточную линию K562. Для сравнения данные были разделены на 2 группы (1-я с *hTERT*: *hTERT*-НК-клетки и *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетки; 2-я без *hTERT*: нетрансдуцированные НК-клетки и *iCasp9*-НК-клетки). Критерий Манна-Уитни, медиана, p-value: * $p < 0,05$.

3.2.2 Изучение развития функционального истощения hTERT-модифицированных NK-клеток при их длительном культивировании

Чтобы выяснить, предотвращает ли оверэкспрессия теломеразы развитие истощения в клетках мы получили hTERT и/или iCasp9-модифицированные NK-клетки и провели серию экспериментов, определяющих пролиферативную и функциональную активность, а также исследовали экспрессию набора генов, кодирующих факторы апоптотического каскада и поверхностные маркеры активации и истощения NK-клеток. Мы также проследили изменения уровней экспрессии транскрипционных факторов Eomes и T-Bet, которые, как известно, регулируют основные функциональные свойства NK-клеток.

Схема эксперимента представлена на рисунке 8. В начальной точке “0” NK-клетки выделяли *ex vivo*, окрашивали внутриклеточно с помощью антител к Eomes и T-Bet и измеряли методом проточной цитометрии. Затем свежевыделенные NK-клетки стимулировали в течение недели IL-2 (100 ед./мл) и облучёнными фидерными клетками K562-mbIL21 в соотношении 2/1 (NK-клетки/K562-mbIL21). По истечении 1 недели стимулированные NK-клетки были трансдуцированы ретровирусными частицами, несущими гены *iCASP9* и/или *hTERT*. Модифицированные NK-клетки были отделены от немодифицированных NK-клеток по наличию в них репортера GFP. Была проведена сортировка клеток. В течение второго месяца были изучены 4 группы NK-клеток (нетрансдуцированные, hTERT-NK-клетки, hTERT-iCasp9-NK-клетки, iCasp9-NK-клетки) на предмет их пролиферативной (анализ пролиферации) и функциональной (анализ IFN- γ и дегрануляции) активности, экспрессии генов и наличия Eomes и T-Bet на уровне белка. На 2 месяце NK-клетки подвергали поверхностному и внутриклеточному окрашиванию. Также оценивали уровни экспрессии генов. Примерно через 3 месяца после выделения NK-клеток *ex vivo* эксперимент был прекращён из-за элиминации большинства популяций исследованных NK-клеток.

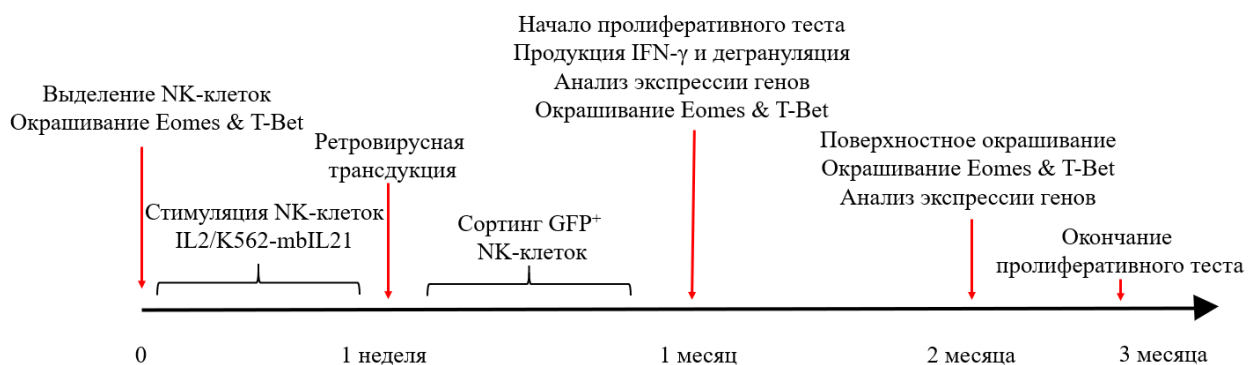


Рисунок 8. Дизайн эксперимента, представленный на временной шкале.

3.2.3 Клетки hTERT-iCasp9-NK характеризуются повышенной пролиферацией и выживаемостью в различных условиях

Чтобы изучить, как введение гена *hTERT*, способствующего выживанию, и гена *iCASP9*, индуцирующего апоптоз, в NK-клетки влияет на их способность к продолжительной пролиферации, мы отслеживали количество клеток, интенсивность пролиферации и долю живых клеток в популяциях нетрансдуцированных NK-клеток, hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток и iCasp9-NK-клеток. Пролиферативный тест был начат через месяц после выделения (Рисунок 8). В качестве консервативных методов мы изучали стимуляцию цитокинами: только с IL-2 и с комбинацией IL-2+IL-15. Комбинация IL-2 с ежемесячной стимуляцией фидерными клетками K562-mbIL21 была применена для достижения обильной пролиферации трансдуцированных NK-клеток в качестве хорошо известного метода стимуляции, индуцирующего эффективную экспансию NK-клеток [97].

Нами было измерено количество NK-клеток, скорость пролиферации и еженедельный прирост клеток, полученный в период от 1 до 3 месяцев после выделения *ex vivo*. Сравнивая NK-клетки, культивируемые при цитокиновой поддержке IL-2 или комбинации IL-2+IL-15, мы определили, что hTERT-iCasp9-NK-клетки демонстрируют улучшенную выживаемость, с одновременным сохранением наибольшего количества клеток в популяции после четвертой недели стимуляции (Рисунок 9А, Г, Д). hTERT-iCasp9-NK-клетки показали наибольшую долю (>50%) живых клеток в культурах, стимулированных IL-2+IL-15, по сравнению с другими типами модифицированных NK-клеток (Рисунок 9Б). Культуры hTERT-iCasp9-NK-клеток отличались сохранением пролиферативной активности через 4 недели при всех изученных типах стимуляции, в то время NK-клетки, немодифицированные или трансдуцированные только одним из генов, ликвидировались (Рисунок 9В). hTERT-iCasp9-NK-клетки показали значительное преимущество в характеристиках по сравнению с iCasp9-NK-клетками. Оверэкспрессия теломеразы в iCasp9-NK-клетках, вероятно, предотвращает гибель NK-клеток вследствие спонтанной димеризацией суицидальной конструкции iCasp9. Несмотря на то, что hTERT-NK-клетки показали повышенную выживаемость в течение первого месяца стимуляции (Рисунок 9Б), оверэкспрессия теломеразы не улучшала пролиферацию NK-клеток при длительном культивировании по сравнению с hTERT-iCasp9-NK-клетками (Рисунок 9В). В

целом, комбинация генов *hTERT* и *iCASP9* неожиданно улучшила персистенцию этих генно-модифицированных *hTERT*-*iCasp9*-NK-клеток.

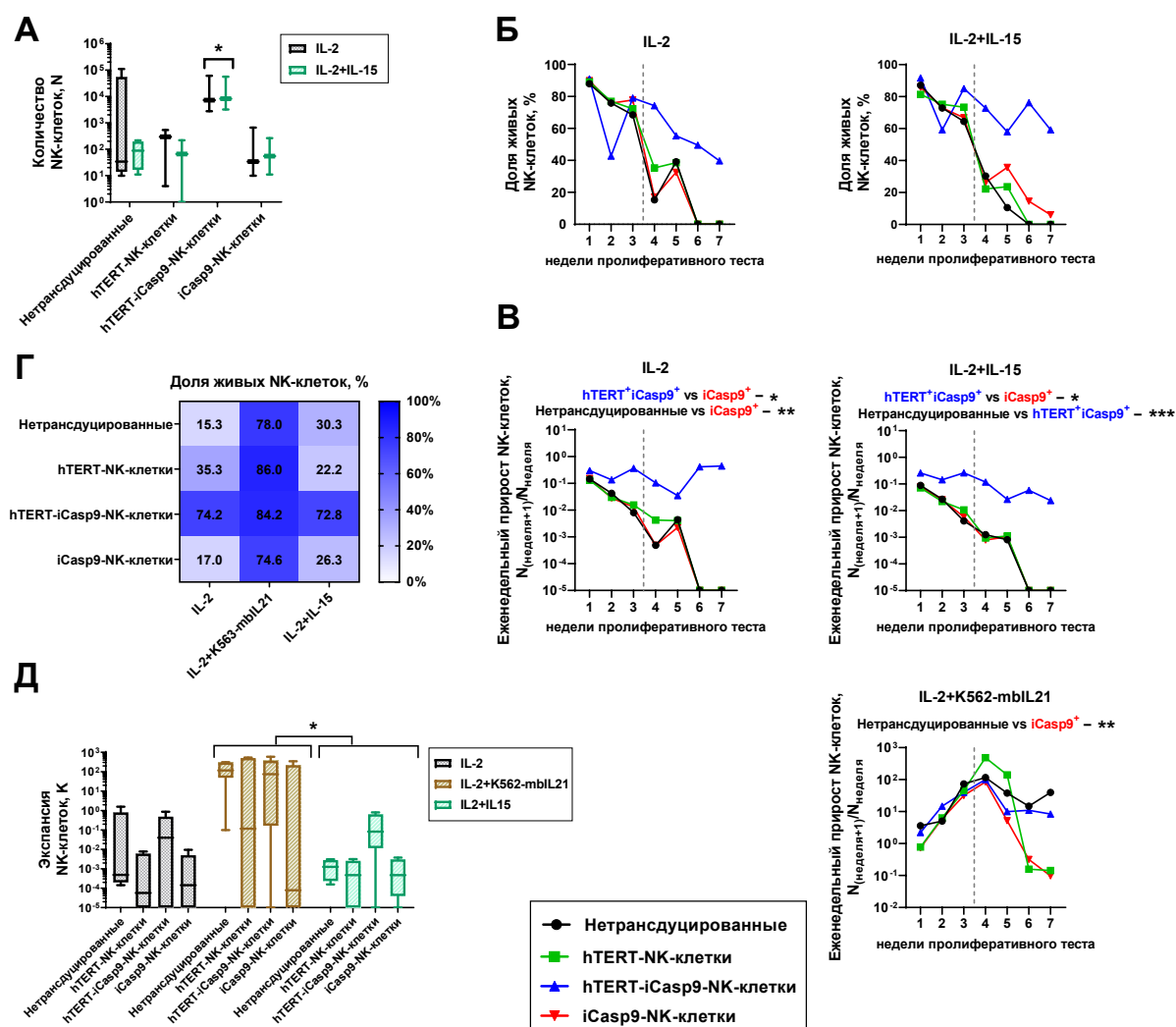


Рисунок 9. Анализ NK-клеток, модифицированных трансгенами *hTERT* и/или *iCASP9*, на пролиферацию начинали через 1 месяц после выделения *ex vivo*. Клетки стимулировали IL-2, IL-2+K562-mbIL21 и IL-2+IL-15. А) Количество NK-клеток, культивируемых в течение одного месяца с IL-2 и IL-2+IL-15. Анализ смешанных эффектов, тест множественных сравнений Сидака, $n=5$, * $p<0,05$, медиана. Для типов стимуляции IL-2, IL-2+K562-mbIL21 и IL-2+IL-15 представлены: Б) доля живых NK-клеток и В) еженедельный прирост $N_{(неделя+1)}/N_{неделя}$. Вертикальная пунктирная линия обозначает временной интервал в 2 месяца после выделения NK-клеток из крови. Тест Фридмана с множественными сравнениями Данна, $n=7$, медиана, p -значение: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Г) Соотношение доли живых NK-клеток для каждого типа стимуляции через 2 месяца после выделения. Д) Сравнение коэффициента экспансии между методами стимуляции IL-2, IL-2+K562-mbIL21 и IL-2+IL-15 через 2 месяца после выделения. Тест

Фридмана с множественными сравнениями Данна, медиана, $n=5$, p -значение: * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Интенсивная пролиферация модифицированных НК-клеток необходима для получения достаточного количества клеток для терапевтического применения, а именно для лечения гематологических злокачественных новообразований требуется более миллиона НК-клеток на килограмм [2]. Стимуляция IL-2+K562-mbIL21 уже показала многообещающие результаты в стимуляции НК-клеток *ex vivo*. В нашем исследовании фидерные клетки K562-mbIL21 добавлялись ежемесячно для усиления пролиферации НК-клеток. Мы стремились выяснить, существуют ли какие-либо эффекты, опосредованные трансгенами *hTERT* и/или *iCASP9*, на пролиферацию, функциональную активность и развитие состояния истощения. Мы сравнили данные, полученные через 2 месяца после выделения *ex vivo*. Самая высокая доля живых клеток наряду с еженедельным увеличением числа клеток и скорости пролиферции наблюдалась у НК-клеток, стимулированных IL-2+K562-mbIL21 (Рисунок 9С-Е). Стимуляция фидерными клетками также повышала экспрессию теломеразы во всех НК-клетках вне зависимости от трансгена (Рисунок 10). НК-клетки, культивируемые без фидерных клеток K562-mbIL21, показали пониженную жизнеспособность, которая также варьировала в зависимости от типа модификации (Рисунок 9Г). В целом, распознавание мишеней, фидерных клеток, увеличивало выживаемость и скорость пролиферации НК-клеток.

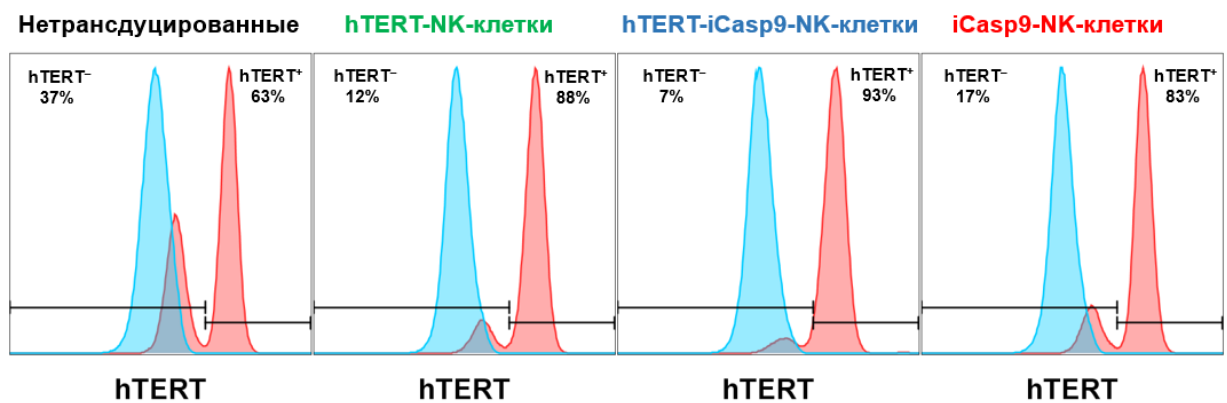


Рисунок 10. Уровни каталитической субъединицы теломеразы (hTERT), измеренные путём внутриклеточного окрашивания и последующего цитометрического анализа в немодифицированных и трансдуцированных *hTERT* и/или *iCASP9* НК-клетках, культивируемых с фидерными клетками IL-2+K562-mbIL21 в течение 2 месяцев. Синяя гистограмма – контроль вторичных антител. Красная гистограмма – окрашивание hTERT.

3.2.4 Оверэкспрессия hTERT в НК-клетках стимулирует прохождение клеточного цикла через модуляцию экспрессии генов

Для изучения уровней экспрессии генов, изменяющих свою активность в НК-клетках с оверэкспрессией теломеразы, мы трансдуцировали НК-клетки 25-летней женщины-донора, положительной на EBV и hCMV. hTERT-НК-клетки были проанализированы в сравнении с iCasp9-НК-клетками.

Согласно данным RNA-seq для hTERT-НК-клеток в сравнении с iCasp9-НК-клетками, которые были собраны в начальной точке пролиферативного эксперимента. hTERT-НК-клетки имели повышенный уровень экспрессии генов клеточного цикла по сравнению с iCasp9-НК-клетками (Рисунок 11). А именно, гены, регулирующие клеточный цикл, *MKI67* (Log2FC=0,60), *E2F1* (Log2FC=0,61), *CCNA2* (Log2FC=0,58), *CDK1* (Log2FC=0,87), *CDKN1A* (Log2FC=0,80), *CCNB1* (Log2FC=1,24) [231], гены, ассоциированные с репликацией *TICRR* (Log2FC=1,01), *MCM3* (Log2FC=0,34) [232], *PCNA* (Log2FC=0,53), гены, ассоциированные с митозом *PLK1* (Log2FC=0,77), *NDC80* (Log2FC=1,07), *AURKB* (Log2FC=0,92), *CDC20* (Log2FC=0,95), *ESPL1* (Log2FC=1.33) [233,234], гены когезинового комплекса *SMC3* (Log2FC=0,42), *CDCA5* (Log2FC=0,75), *RAD21* (Log2FC=0,28) [235] были значительно (с $p\text{-adj}<0,05$) активированы, в то время как ген *ATRX* (Log2FC=-0,32), продукт которого отвечает за регуляцию хроматина посредством депонирования гистона H3.3 на теломерах [236], и ген *PPP2R5A* (Log2FC=-0,28), продукт которого негативно регулирует рост [237] и деление клеток, были значительно (с $p\text{-adj}<0,05$) подавлены. Таким образом, можно предположить, что избыточная экспрессия *hTERT* прямо или косвенно влияет на уровни экспрессии генов клеточного цикла и стимулирует прогрессирование S-G2-M стадий клеточного цикла.

Клеточный цикл

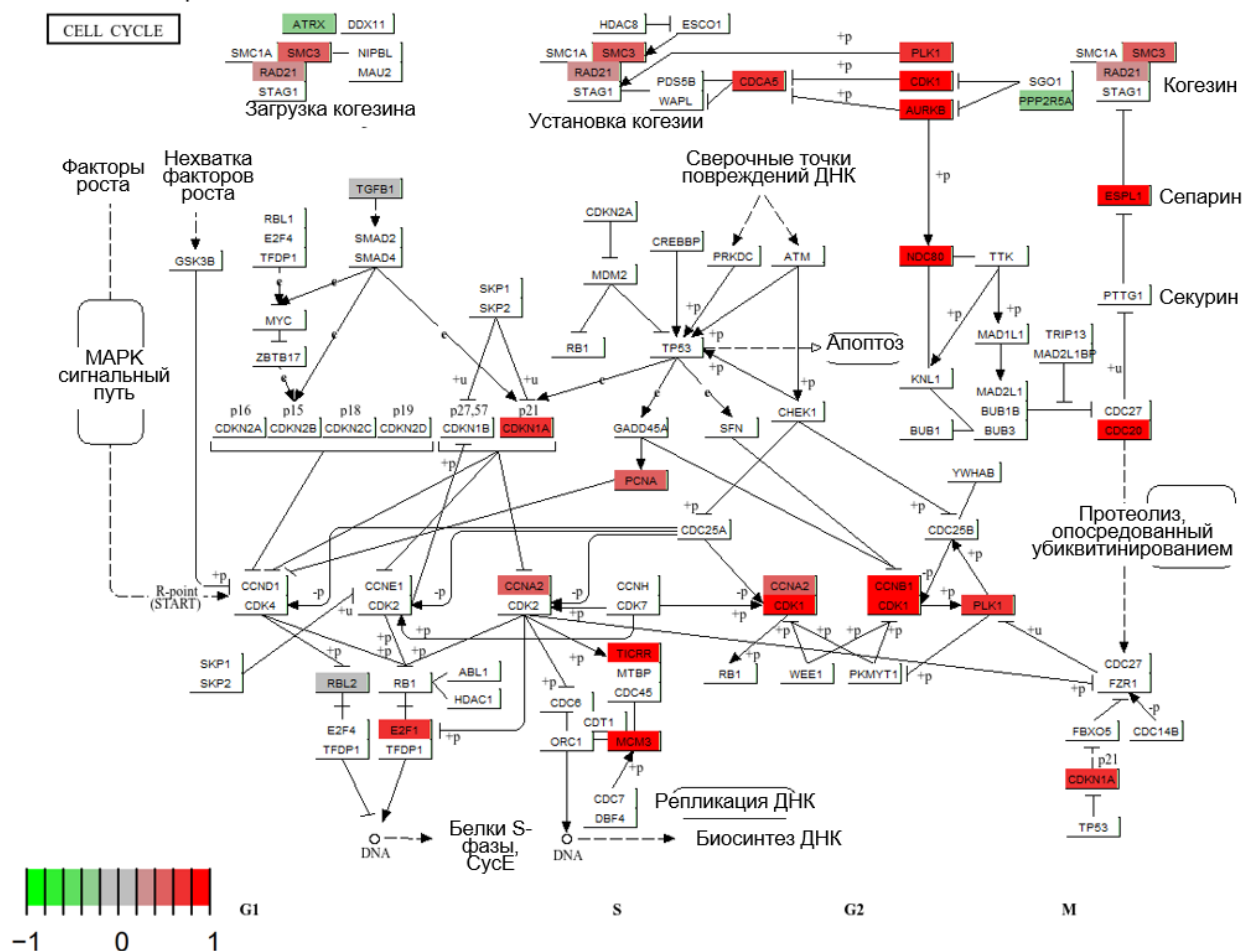


Рисунок 11. Репрезентативная диаграмма KEGG pathview данных РНК-секвенирования, предварительно проанализированных пакетом DESeq2, представляющая гены клеточного цикла для сравнения hTERT-NK-клеток против iCasp9-NK-клеток.

3.2.5 Уровни Eomes и T-Bet различаются у NK-клеток, модифицированных генами hTERT и/или iCASP9

Чтобы выявить вклад трансгенов *hTERT* и *iCASP9* в функциональные характеристики NK-клеток и степень их истощения в отдалённые моменты времени после выделения *ex vivo*, мы проследили динамику Eomes и уровня T-Bet с помощью внутриклеточного окрашивания с последующим анализом методом проточной цитометрии (Рисунок 12). Около 90% NK-клеток после выделения *ex vivo* были Eomes⁺T-Bet⁺, что указывает на их активное функциональное и пролиферативное состояние (Рисунок 12А). Истощённые NK-клетки Eomes⁻T-Bet⁻ составляли всего 2%. NK-клетки Eomes⁺T-Bet⁻ составляли 3%. NK-клетки Eomes⁺T-Bet⁻ относятся к менее дифференцированным подгруппам, которые постепенно приобретают экспрессию T-Bet в процессе созревания. Тогда как NK-клетки Eomes⁺T-Bet⁺ теряют экспрессию Eomes и в конечном итоге

заменяются терминально дифференцированными $Eomes^{-}T-Bet^{+}$ клетками (4,7%) (Рисунок 12А).

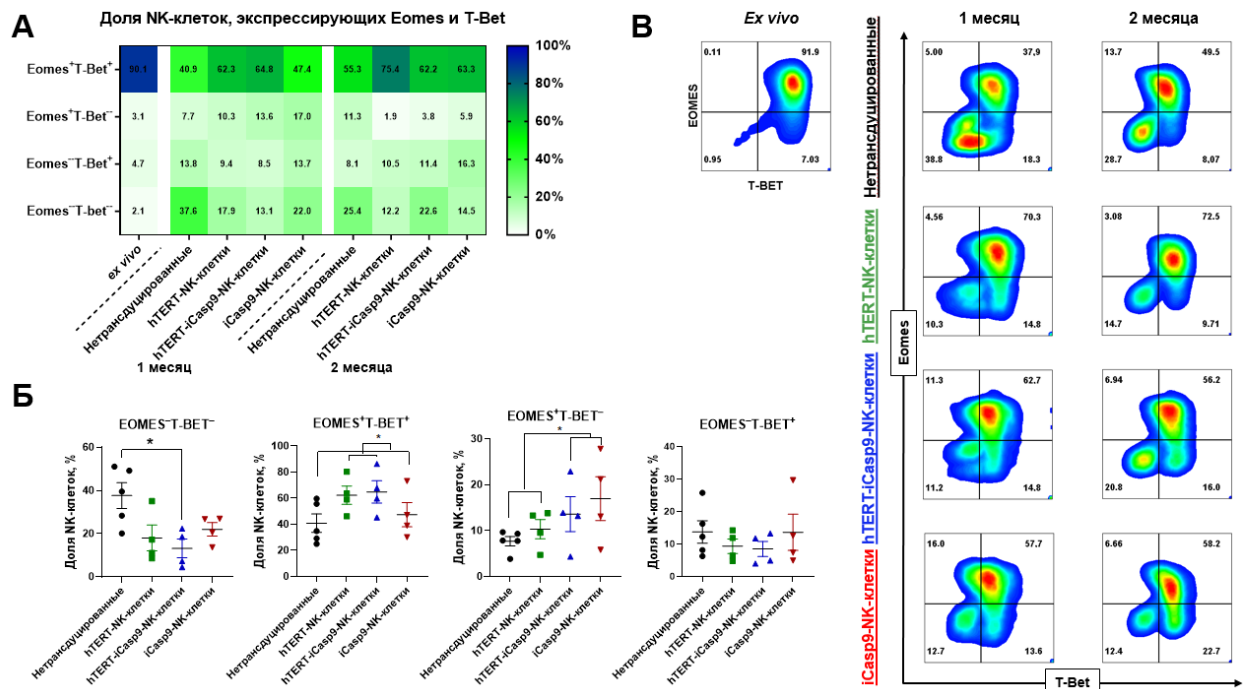


Рисунок 12. Экспрессия транскрипционных факторов Eomes и T-Bet в НК-клетках, модифицированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*. А) Изменение доли клеток, экспрессирующих Eomes и T-Bet, в течение 1-го и 2-го месяцев после выделения *ex vivo* (среднее значение $N_{ex vivo} = 8$, $N_{1 \text{ месяц}} = 5$, $N_{2 \text{ месяца}} = 2$). Представлены НК-клетки, культивируемые с IL-2+K562-mbIL21. Б) Распределение НК-клеток $Eomes^{+/-}T-Bet^{+/-}$, культивируемых в течение 1 месяца. Для сравнения субпопуляций НК-клеток $Eomes^{+}T-Bet^{+}$ данные были разделены на 2 группы (1-я: *hTERT*-НК-клетки с *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетками; 2-я: нетрансдуцированные с *iCasp9*-НК-клетками). Для сравнения $Eomes^{+}T-Bet^{-}$ были проанализированы 2 группы (1-я: нетрансдуцированные с *hTERT*-НК-клетками; 2-я: *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетки с *iCasp9*-НК-клетками). Измерение Eomes и T-Bet в НК-клетках, модифицированных *hTERT* и/или *iCASP9*, проводили через месяц после выделения *ex vivo* ($n = 5$). Непарный t-критерий, среднее значение, p-value: * $p < 0,05$. В) Репрезентативные графики распределения Eomes и T-Bet в НК-клетках *ex vivo*, через 1 и 2 месяца после выделения.

Однако распределение НК-клеток в субпопуляциях Eomes и T-Bet изменилось через месяц после выделения и трансдукции *ex vivo*. Доля клеток $Eomes^{-}T-Bet^{-}$ увеличилась с 2% до 37,6% в нетрансдуцированных НК-клетках, до 18% в *hTERT*-НК-клетках, до 13,1% в *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетках и до 22% в *iCasp9*-НК-клетках. Нетрансдуцированные НК-

клетки продемонстрировали самые высокие уровни дважды негативных клеток по сравнению с hTERT-iCasp9-NK-клетками. hTERT-модифицированные клетки показали тенденцию к уменьшению доли клеток Eomes⁻T-Bet⁻ по сравнению с NK-клетками, которые не были модифицированы hTERT (Рисунок 12B). Популяция клеток Eomes⁺T-Bet⁺ была широко представлена среди hTERT-модифицированных клеток и составляла 62,3% для hTERT-NK-клеток и 64,8% для hTERT-iCasp9-NK-клеток. Относительно момента выделения NK-клеток *ex vivo* за месяц было отмечено снижение уровня представленности популяции Eomes⁺T-Bet⁺ на 30% среди hTERT-модифицированных клеток и 40-50% для нетрансдуцированных и iCasp9-NK-клеток (Рисунок 12B). Популяция NK-клеток Eomes⁺T-Bet⁻ увеличивалась в процессе культивирования: в hTERT-iCasp9-NK-клетках достигала 13,6%, и 17% в iCasp9-NK-клетках (Рисунок 12B). Доля Eomes⁻T-Bet⁺ существенно не различалась среди групп трансдукции, а также была незначительно увеличена на 3-8% относительно *ex vivo* (Рисунок 12).

Следовательно, мы заметили, что трансген *iCASP9* в большей степени способствовал расширению подмножества клеток Eomes⁺T-Bet⁻, в то время как трансген *hTERT*, напротив, поддерживал одновременную экспрессию как Eomes, так и T-Bet.

3.2.6 NK-клетки сохраняли пропорцию субпопуляции Eomes⁺T-Bet⁺ после 2 месяцев культивирования *in vitro* с IL-2+K562-mbIL21

Поскольку самые высокие показатели пролиферации и повышенная выживаемость NK-клеток наблюдались при стимуляции IL-2+K562-mbIL21, мы продолжили измерения Eomes и T-Bet для NK-клеток, культивируемых с IL-2+K562-mbIL21. Через 2 месяца после выделения *ex vivo* NK-клетки Eomes⁺T-Bet⁺ представляли наиболее обширную фракцию в культурах, и их доля составляла 55-75%, в то время как другие субпопуляции Eomes^{+/-}T-Bet^{+/-} по отдельности составляли менее 30% клеток. Затем мы изучили изменение соотношения NK-клеток Eomes⁺ и T-Bet⁺ с первого по второй месяц после выделения *ex vivo*. Доля NK-клеток T-Bet⁺ увеличивалась на 14-30% независимо от типа трансдукции. Доля клеток Eomes⁺ увеличилась на 13-26% в нетрансдуцированных и hTERT-NK-клетках и осталась практически неизменной (менее 5%) в iCasp9-модифицированных NK-клетках. Мы также отслеживали изменения в пропорциях субпопуляций Eomes^{+/-}T-Bet^{+/-}, которые происходили в культурах NK-клеток в период между первым и вторым месяцем после выделения *ex vivo*. Фракция клеток Eomes⁺T-Bet⁺ сохраняла свою пропорцию с течением времени, что благоприятно влияло на состояние активации NK-клеток, поскольку предполагается, что эти клетки проявляют функциональную и пролиферативную

активность без признаков истощения. Фракции клеток Eomes⁻T-Bet⁺ и клеток Eomes⁻T-Bet⁻ оставались неизменными (Рисунок 12А). Таким образом, предположительно, трансгены *hTERT* и *iCASP9* регулируют баланс экспрессии Eomes и T-Bet, но стимуляция фидерными клетками K562-mbIL21 обеспечивала поддержание фракции функционально активных клеток Eomes⁺T-Bet⁺.

3.2.7 Несмотря на сходные уровни экспрессии генов *EOMES* и *TBX21*, через два месяца после выделения *ex vivo* НК-клетки продемонстрировали увеличение экспрессии проапоптотических факторов и более истощённый фенотип

Мы также изучили уровни экспрессии генов *EOMES* и *TBX21*, кодирующих факторы транскрипции Eomes и T-Bet; а также уровни экспрессии генов, способствующих выживанию, *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (BCL-X_L) и *BIRC5*; проапоптотических генов *BAX*, *BAD*, *BAK1*, *DIABLO* и *BBC3* (PUMA); генов *TIM3*, *TIGIT* и *LAG3*, кодирующие иммунные контрольные точки; и генов, ассоциированных с истощением *SOCS1-3* и *CISH* (Cis). В НК-клетках, стимулированных IL-2+K562-mbIL21 в течение двух месяцев, наблюдалось снижение уровней мРНК факторов, способствующих выживанию, а именно Bcl-2 и Birc-5, наряду с повышением уровня мРНК *BAK1* и *BBC3* (PUMA) проапоптотических факторов. Уровни мРНК транскрипционных факторов Eomes и T-Bet оставались неизменными. Уровень транскриптов *TIM3* иммунной контрольной точки со временем снижался, в то время как уровень гена *CISH*, кодирующего ингибитор цитокиновой сигнализации Cis, повышался. В целом, НК-клетки сместили баланс выживаемости в сторону гибели клеток, но уровни экспрессии транскриптов, кодирующих некоторые иммунные контрольные точки, не увеличились, а даже снизились (Рисунок 13).

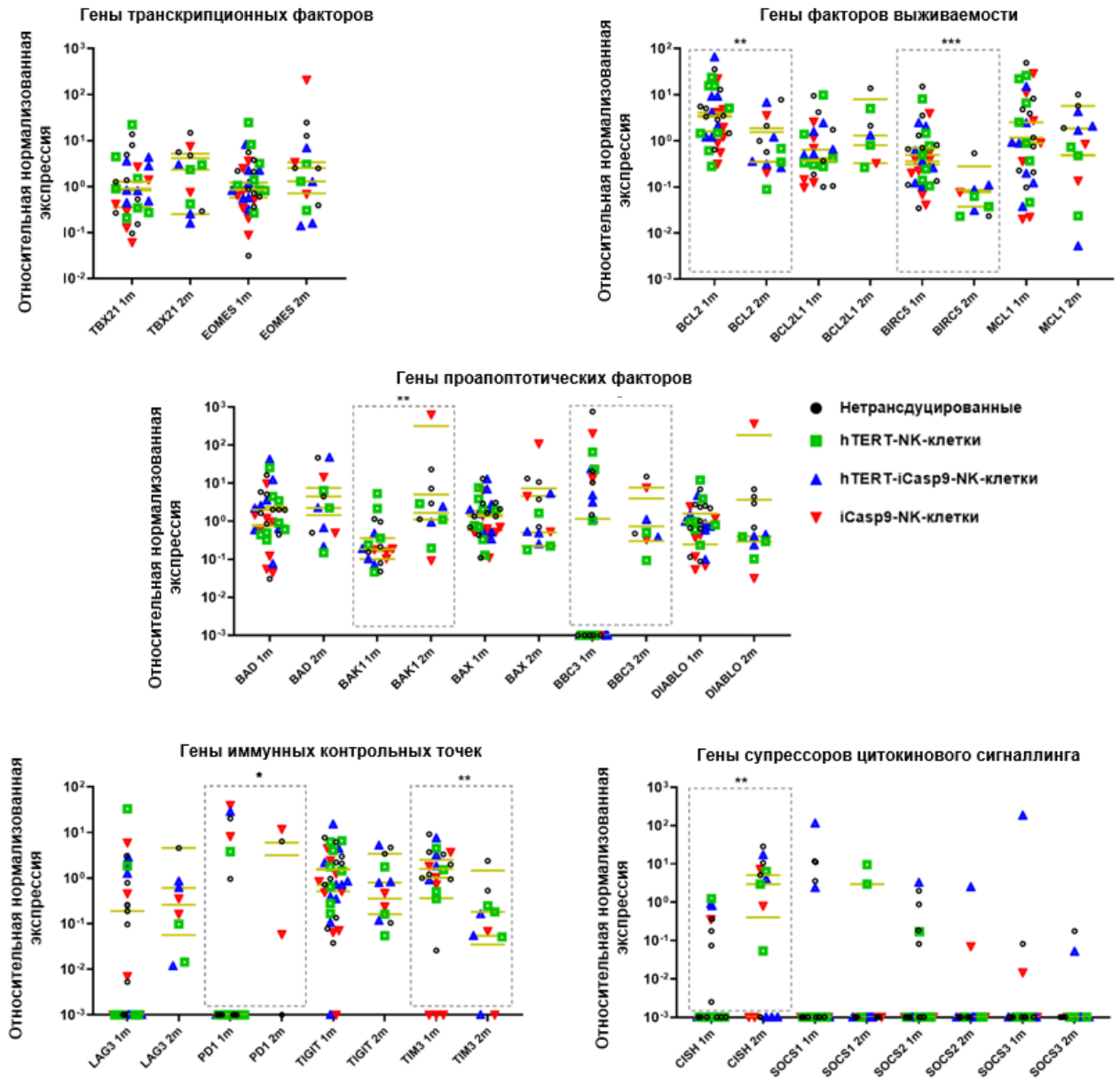


Рисунок 13. Динамика нормализованных уровней экспрессии мРНК генов *EOMES* и *TBX21*, кодирующих факторы транскрипции Eomes и T-Bet, а также уровни экспрессии факторов, способствующих выживанию, *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (BCL-X_L) и *BIRC5*, проапоптотических *BAX*, *BAD*, *BAK1*, *DIABLO* и *BBC3* (PUMA), кодирующих иммунные контрольные точки *TIM3*, *TIGIT* и *LAG3*, и генов и *SOCS1-3* и *CISH*, связанных с истощением. Данные получены для НК-клеток, модифицированных *hTERT* и/или *iCASP9* и культивируемых с IL-2+K562-mbIL21, в моменты времени через 1 месяц (1 м) и 2 месяца (2 м) после выделения *ex vivo*. Пунктирной линией обведены группы сравнения. Критерий Манна-Уитни, $N_{1m}=10$, $N_{2m}=3$, медиана, p-value: * p<0,05; * p<0,01; * p<0,001.

Можно сделать вывод, что, несмотря на соизмеримые уровни экспрессии *EOMES* и *TBX21* через 2 месяца после выделения клеток из периферической крови, по сравнению с

измерением, проведённым 4 неделями ранее, наблюдается сдвиг в балансе про-/противоапоптотических факторов в сторону увеличения уровней экспрессии проапоптотических генов у всех типов модифицированных НК-клеток. Наблюдаемое увеличение экспрессии гена *CISH*, продукт которого, как известно, блокирует каскад Jak-STAT, запускаемый стимуляцией цитокинами, может указывать на развитие истощения в НК-клетках. Повышение экспрессии гена *CISH*, скорее всего, связано с продолжительным культивированием клеток в среде с добавлением IL-2.

3.2.8 НК-клетки сохраняли поверхностную экспрессию активирующих рецепторов через два месяца после выделения *ex vivo*

Трансдуцированные НК-клетки были исследованы на наличие поверхностных маркеров, указывающих на их активное функциональное состояние. Мы не выявили каких-либо существенных трансген-опосредованных различий в поверхностных маркерах между НК-клетками, трансдуцированными генами *hTERT* и/или *iCASP9*. Во-первых, мы сравнили уровни экспрессии поверхностных рецепторов контрольных точек иммунитета PD-1, TIM-3, TIGIT и KLGR-1, которые обычно повышаются при стимуляции цитокинами и при хронических заболеваниях. Сигналы от этих иммунных контрольных точек резко подавляют пролиферативную и цитотоксическую активность НК-клеток [238]. НК-клетки, стимулированные IL-2 или IL-2+IL-15, в отличие от НК-клеток, стимулированных IL-2+K562-mbIL21, повышали уровень TIGIT и KLGR-1. Интересно, что *hTERT-iCasp9*-НК-клетки характеризовались более низкими уровнями экспрессии этих маркеров в условиях стимуляции IL-2+IL-15 (Рисунок 14А). Клетки, несущие PD-1 и TIGIT, составляли менее 20% НК-клеток, стимулированных IL2+K562-mbIL21. Однако большая часть (>50%) НК-клеток экспрессировала иммунную контрольную точку TIM-3 (Рисунок 14А). Самая высокая экспрессия TIM-3 наблюдалась среди НК-клеток, стимулированных IL2+K562-mbIL21, по сравнению с клетками, стимулированными цитокинами IL-2 или IL-2+IL-15 (Рисунок 14А).

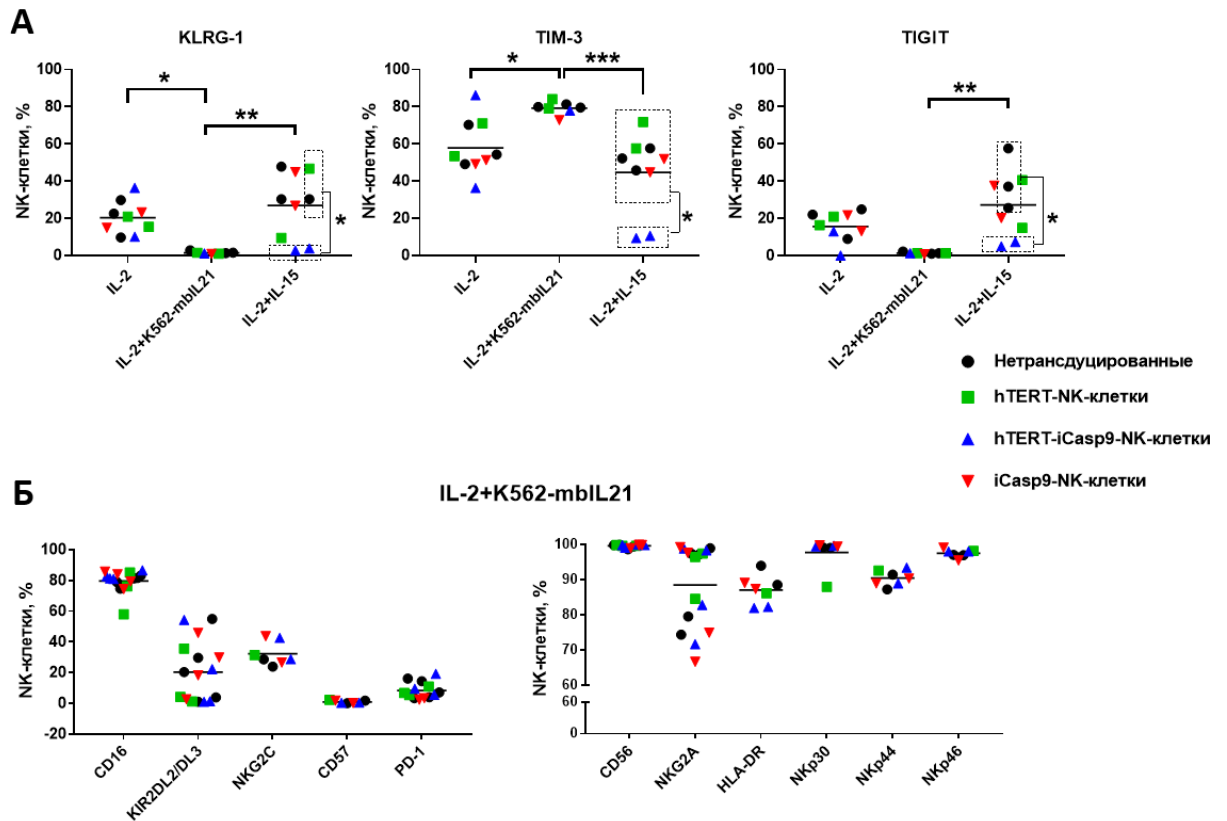


Рисунок 14. Соотношение NK-клеток, модифицированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*, через 2 месяца после выделения *ex vivo*. Представлены данные для 3 типов стимуляции: IL-2, IL-2+K562-mbIL21 и IL-2+IL-15. А) Уровни экспрессии иммунных контрольных точек TIM-3, TIGIT и KLRG-1. Пунктирные рамки обозначают сравниваемые группы. Двусторонний анализ ANOVA с использованием теста множественных сравнений Тьюки, $n=3$, среднее значение, p -value: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Б) Поверхностная экспрессия (средние значения) CD16, KIR (KIR2DL2/DL3), PD-1, NKG2C, CD57, CD56, NKG2A, HLA-DR, NKp30, NKp44 и NKp46 для NK-клеток, стимулированных IL2+K562-mbIL21.

Поскольку модифицированные NK-клетки, культивируемые в течение 2 месяцев с IL-2+K562-mbIL21, показали наибольшую экспансию и выживаемость, мы оценили дополнительный набор поверхностных маркеров, соответствующих состоянию активации NK-клеток (CD16, KIR (KIR2DL2/DL3), NKG2C, CD57, CD56, NKG2A, HLA-DR, NKp30, NKp44 и NKp46) (Рисунок 14Б).

Около 80% NK-клеток после двух месяцев культивирования с IL-2+K562-mbIL21 во всех культурах были положительными по наличию рецептора антителозависимой клеточной цитотоксичности CD16. Все NK-клетки имели чрезвычайно высокую плотность маркера CD56 на своей клеточной поверхности и демонстрировали высокие уровни

экспрессии NKp30, NKp44 и NKp46. В этих культурах также было отмечено низкое содержание клеток CD57⁺. Более 60% NK-клеток экспрессировали рецептор NKG2A, и менее 50% NK-клеток были KIR2DL2/DL3⁺ (Рисунок 14Б).

Таким образом, не было отмечено негативного влияния трансгенов на экспрессию различных поверхностных маркеров в модифицированных клетках. Все выявленные различия в фенотипе были в основном обусловлены различными типами стимуляции. Стимуляция комбинацией IL-2+K562-mbIL21 приводила к накоплению NK-клеток с фенотипом, который можно считать наиболее благоприятным для иммунотерапевтического применения.

3.2.9 Оверэкспрессия hTERT улучшает функциональную активность NK-клеток

Чтобы выявить пути, которыми hTERT участвует в поддержании функциональной активности NK-клеток, мы провели анализ RNAseq экспрессии генов и сравнили полученные данные с результатами функциональных тестов: анализом дегрануляции в ответ на распознавание клеточной линии K562 и анализом цитокин-индуцированной продукции IFN- γ . Предварительно активированные в течение 5 дней NK-клетки донора серопозитивного по антителам к цитомегаловирусу (hCMV), Эпштейн-Барр (EBV) вирусу и SARS-CoV-2 вирусу были трансдуцированы ретровирусными частицами для обеспечения стабильной экспрессии генов *iCASP9* и/или *hTERT*. В временной точке 1 месяц после выделения был проведен сбор данных функциональной активности и лизатов для последующего транскрипторного анализа.

Показано, что NK-клетки, несущие только ген *hTERT* характеризуются повышенным уровнем дегрануляции в ответ на распознавание клеток мишеней K562 в сравнении с hTERT-iCasp9-NK-клетками, iCasp9-NK-клетками. Также отмечена повышенная плотность LAMP-1 (LAMP-1 MFI) на поверхности hTERT-NK-клеток. Популяции hTERT-iCasp9-NK-клеток в образцах без добавления K562 показала повышенный уровень базовой дегранулирующих клеток LAMP-1⁺ в сравнении с hTERT-NK-клетками и iCasp9-NK-клетками (Рисунок 15А). Для клеток, несущих *iCASP9*, hTERT-iCasp9-NK-клеток и iCasp9-NK-клеток, отмечали склонность к повышенному уровню продукции IFN- γ в ответ на цитокиновую стимуляцию в сравнении с hTERT-NK-клетками, что согласовалось как с увеличением пропорции клеток IFN- γ ⁺, так и в повышении внутриклеточного содержания IFN- γ (Рисунок 15Б).

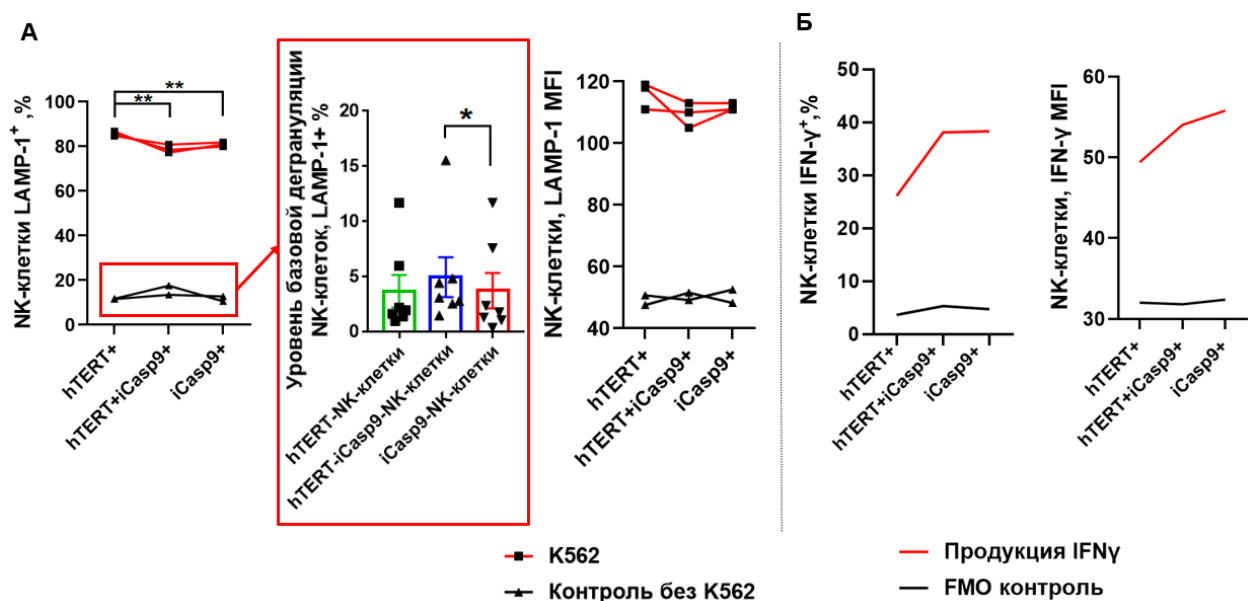


Рисунок 15. Функциональная активность hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток, iCasp9-NK-клеток. А) Дегрануляция в ответ на распознавание клеток линии K562. Левая половина – доля NK-клеток LAMP-1⁺, правая половина – средний уровень флуоресценции (MFI), отражающий плотность LAMP-1 на поверхности клетки. Дополнительно выделенная область показывает долю базово дегранулирующих (без добавления K562 в образец) NK-клеток на большей выборке доноров, N=7. Ранговый тест совпадающих пар по Уилкоксоу: p-value: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. Б) Цитокинзависимая продукция IFN-γ. Левая половина – доля NK-клеток IFNγ⁺, правая половина – средний уровень интенсивности флуоресценции (MFI), отражающий внутриклеточное содержание IFN-γ. 2-way ANOVA: p-value: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Экспериментальные данные были проанализированы в сочетании с данными RNA-seq, полученными в результате сравнения hTERT-NK-клеток и iCasp9-NK-клеток. Согласно анализу экспрессии генов, hTERT-NK-клетки характеризуются более высокими уровнями транскриптов гранзима В (*GZMB*). Это соответствует результатам, полученным при тестировании на дегрануляцию, поскольку гранзим В является основным компонентом литических везикул. Напротив, уровни транскрипта *IFNG* также были повышены в hTERT-NK-клетках, но анализ продукции IFN-γ, индуцированной цитокинами, показал более низкие уровни IFN-γ⁺ клеток в популяции hTERT-NK-клеток по сравнению с iCasp9-NK-клетками (Рисунок 16). Незначительное снижение активности гена *JAK1* при Log2FC=-0,20 и p-adj=5,4×10⁻³ может приводить к нарушению достаточной передачи сигнала от IL-2R и снижению продукции IFN-γ при стимуляции цитокинами. Однако экспрессия *IL2RA* была

повышена при $\text{Log}_2\text{FC}=0,39$ и $p\text{-adj}=1,15 \times 10^{-2}$, тогда как экспрессия *IL12RB2* была снижена при $\text{Log}_2\text{FC}=-0,34$ и $p\text{-adj}=2,7 \times 10^{-3}$ в hTERT-NK-клетках. Эти модуляции экспрессии не позволяют нам точно определить, какой фактор преобладает в снижении продукции IFN- γ в hTERT-NK-клетках, стимулируемых цитокинами. hTERT-NK-клетки по-прежнему демонстрировали более высокое состояние активации по сравнению с контролем, которое также заключалось в повышенном уровне CD69 с $\text{Log}_2\text{FC}=0,27$ и $p\text{-adj}=2,861 \times 10^{-7}$.

НК-клеточная цитотоксичность

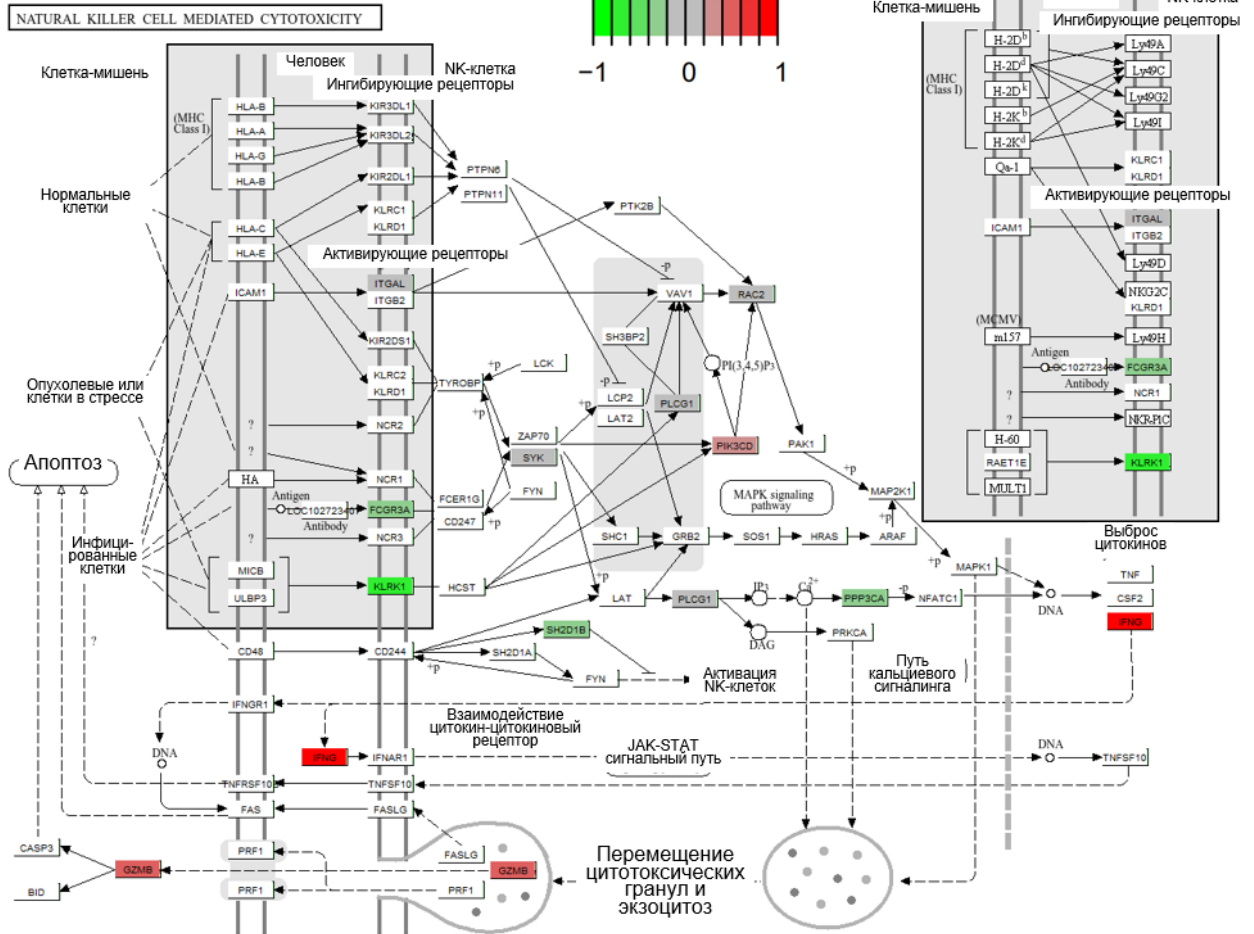


Рисунок 16. Репрезентативная диаграмма KEGG pathview данных РНК-секвенирования, предварительно прошедших обработку DESeq2. Представлены гены НК-клеточной натуральной цитотоксичности “Hsa04650” для сравнения hTERT-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток.

Транскриптомный анализ популяций hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток в сравнении с iCasp9-NK-клетками был проведён через месяц после выделения NK-клеток *ex vivo* с целью выявления ассоциации гиперэкспрессии гена теломеразы с функциональной активностью и выживаемостью исследуемых NK-клеток. Были идентифицированы дифференциально экспрессируемые гены (DEGs: $p\text{-adj} < 0,05$, $\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0,58$), а также гены

экспрессированные сходным образом в группах сравнения: 1) hTERT-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток и 2) hTERT-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток.

Для групп сравнения hTERT-NK-клеток против iCasp9-NK-клеток было выявлено 126 диффэкспрессированных гена (DEGs: $p\text{-adj} < 0,05$, $\text{abs}(\text{Log}_2(\text{FC})) > 0,58$). в сравнении hTERT-iCasp9-NK-клеток против iCasp9-NK-клеток было выявлено 105 DEGs. Среди данных генов было обнаружено 42 дифференциально экспрессированных гена, которые изменяли свою экспрессию в сходном направлении (были синхронно повышены или понижены) в обеих группах сравнения (Рисунок 17А, Таблица 4). Данные 42 гена, по все видимости, отражают влияние оверэкспрессии теломеразы на транскриптом NK-клеток. Среди этого перечня генов отмечали повышение экспрессии *hTERT*, что дополнительно подтверждает успешность проведенной модификации hTERT-NK-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клеток. Среди 42 генов диффэкспрессированы: 1) гены, ассоциированные с клеточной пролиферацией *TOP2A*, *CDK1*, *FOXM1*, *TYMS*, *NDC80*, *TPX2*, *DLGAP5* и *STMN1*; 2) гены, связанные с митозом, *ESPL1*, *NCAPH*, *NEK9*, *CDC20*, *SHCBP1*, *SPAG5*, *CDCA5*, *TIMELESS*, *TROAP*, и *CKAP2L*; 3) гены системы репарации и репликации *POLQ*, *LIG1*, *FEN1*, *FANCI*, *HJURP* и *TYMS*; 4) гены, ассоциированные с эффекторными функциями иммунных клеток, *IRF4*, *IFNG*, *CSF1*, *LIF*, *SGK1* и *CX3CR1* (Рисунок 17А, Таблица 4).

Далее, прицельно были исследованы гены, ассоциированные с функциональной активностью, пролиферацией и выживаемостью NK-клеток. Наблюдали синхронное повышение в популяциях с оверэкспрессией теломеразы (hTERT-NK-клетках и hTERT-iCasp9-NK-клетках) уровня транскриптов гена *CSF1*, кодирующего колониестимулирующий фактор 1, увеличение экспрессии *IFNG*, кодирующего IFN- γ , и транскриптов *LIF* (фактора, подавляющего лейкемию). Экспрессия хемокинового рецептора 1 с мотивом С-Х3-С (*CX3CR1*), наоборот, была понижена. В популяции hTERT-iCasp9-NK-клеток отмечали повышение экспрессии *SPRY1*, который активирует NF- κ B сигналинг. Среди hTERT-iCasp9-NK-клеток также был повышен уровень транскриптов *CSF2RB*, бета-субъединицы рецептора колониестимулирующего фактора 2. Экспрессия С-С хемокиновый рецептор 2-го типа (*CCR2*), наоборот была понижена (Рисунок 17Б, Таблица 4).

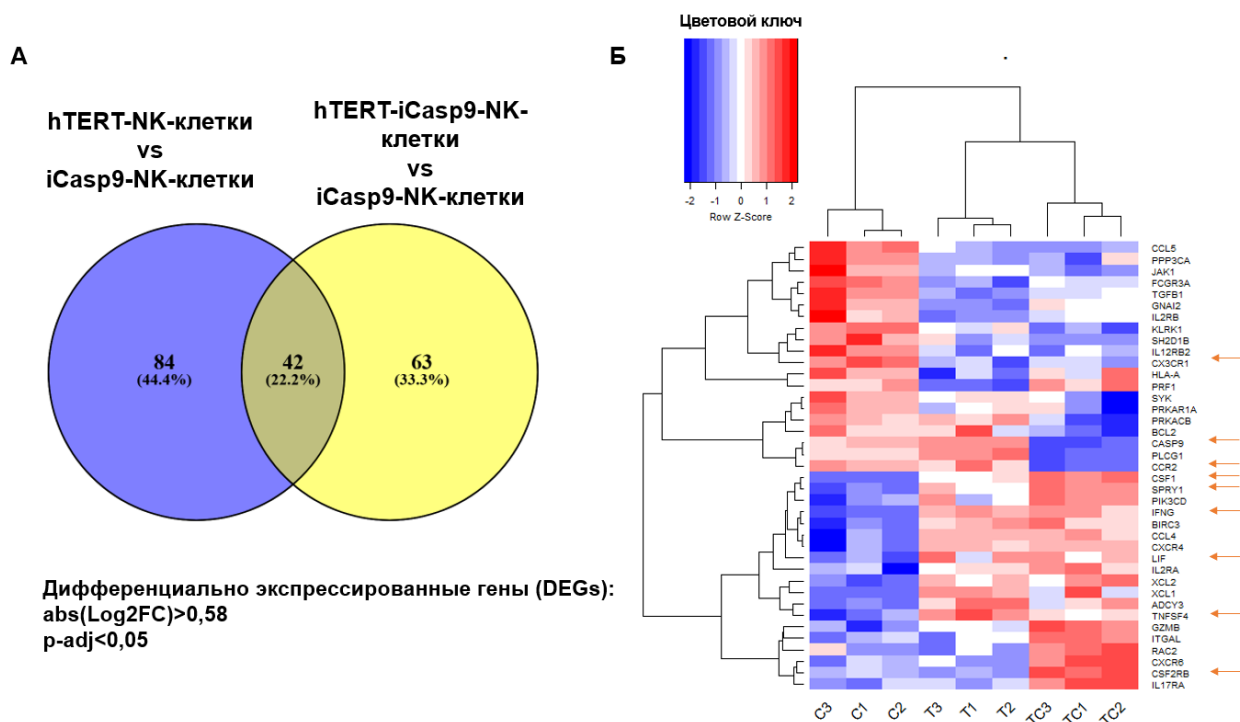


Рисунок 17. Общие черты транскрипционного профиля hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток в сравнении против iCasp9-NK-клеток. А) Визуализация общих дифференциально экспрессированных генов (DEGs: p-adj<0,05, abs(Log2FC)>0,58). Б) Тепловая карта нормализованного количества генов для hTERT-NK-клеток (Т), hTERT-iCasp9-NK-клеток (ТС) и iCasp9-NK-клеток (С). В рядах представлены нормализованные данные по Z-score. Красным цветом обозначены транскрипты с повышенной экспрессией, синим – с пониженной. Представлена выборка генов на основе базы данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG): “Hsa04650” Цитотоксичность, опосредуемая естественными клетками-киллерами, “Hsa04062” Сигнальный путь хемокинов, “Hsa04210” Апоптоз, “Hsa04060” Взаимодействие цитокин-цитоклиновый рецептор, “Hsa04630” Сигнальный путь Jak-STAT. Гены отфильтрованы по p-adj<0.05 из сравнений hTERT-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клеток в сравнении против iCasp9-NK-клеток. Стрелками отмечены DEGs.

Таблица 4. Общие дифференциально экспрессированные гены из групп сравнения hTERT-NK-клеток vs iCasp9-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-клеток.

Общие	Повышение / Понижение		
<i>TERT</i>	↑	telomerase reverse transcriptase	теломераза

<i>ARRDC3</i>	↑	arrestin domain containing 3	белок семейства аррестинов
<i>EIF3L</i>	↑	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	эукариотический фактор инициации трансляции 3 субъединица L
<i>ESPL1</i>	↑	extra spindle pole bodies like 1, separase	сепараза
<i>NEK9</i>	↑	NIMA related kinase 9	серин/треонин-протеинкиназа Nek9
<i>NCAPH</i>	↑	non-SMC condensin I complex subunit H	субъединица комплекса конденсина 2
<i>MYO1B</i>	↑	myosin IB	миозин IB
<i>IRF4</i>	↑	interferon regulatory factor 4	фактор регуляции интерферона 4
<i>CSF1</i>	↑	colony stimulating factor 1	колониестимулирующий фактор 1
<i>POLQ</i>	↑	DNA polymerase theta	ДНК-полимераза тета
<i>LIF</i>	↑	LIF interleukin 6 family cytokine	фактор, подавляющий лейкемию
<i>NDC80</i>	↑	NDC80 kinetochore complex component	компонент кинетохорного комплекса NDC80
<i>HJURP</i>	↑	Holliday junction recognition protein	белок распознавания соединения Холлидея
<i>CIT</i>	↑	citron rho-interacting serine/threonine kinase	цитрон-rho-взаимодействующая серин/треонинкиназа
<i>LIG1</i>	↑	DNA ligase 1	ДНК-лигаза 1
<i>CDC20</i>	↑	cell division cycle 20	белок цикла клеточного деления 20
<i>SHCBP1</i>	↑	SHC binding and spindle associated 1	SHC связывающий и ассоциированный с веретеном деления 1

<i>SGK1</i>	↑	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	киназа 1, регулируемая сывороткой/глюкокортикоидами
<i>IFNG</i>	↑	interferon gamma	интерферон гамма
<i>CDK1</i>	↑	cyclin dependent kinase 1	циклин-зависимая киназа
<i>FOXM1</i>	↑	forkhead box M1	транскрипционный фактор Forkhead box protein M1
<i>FANCI</i>	↑	FA complementation group I	группа I комплементации при анемии Фанкони
<i>TROAP</i>	↑	trophinin associated protein	белок, ассоциированный с трофинином
<i>DEK</i>	↑	DEK proto-oncogene	Протоонкоген DEK
<i>FAM111B</i>	↑	FAM111 trypsin like peptidase B	FAM111 трипсиноподобная пептидаза B
<i>TYMS</i>	↑	thymidylate synthetase	тимидилатсинтетаза
<i>SLC5A3</i>	↑	solute carrier family 5 member 3	семейство переносчиков растворенных веществ 5 член 3
<i>NUP88</i>	↑	nucleoporin 88	нуклеопорин 88
<i>SPAG5</i>	↑	sperm associated antigen 5	ассоциированный со сперматозоидами антиген 5
<i>TOP2A</i>	↑	DNA topoisomerase II alpha	ДНК-топоизомераза II альфа
<i>CDC45</i>	↑	cell division cycle associated 5	связанный с циклом клеточного деления 5
<i>TIMELESS</i>	↑	timeless circadian regulator	вечный циркадный регулятор
<i>TPX2</i>	↑	TPX2 microtubule nucleation factor	фактор нуклеации микротрубочек TPX2
<i>CKAP2L</i>	↑	cytoskeleton associated protein 2 like	белок 2 связанный с цитоскелетом
<i>NUP98</i>	↑	nucleoporin 98 and 96 precursor	предшественник нуклеопоринов 98 и 96

<i>TXN</i>	↑	thioredoxin	тиоредоксин
<i>DLGAP5</i>	↑	DLG associated protein 5	ассоциированный с DLG белок 5
<i>STMN1</i>	↑	stathmin 1	Статмин (онкопротеин 18)
<i>FEN1</i>	↑	flap structure-specific endonuclease 1	эндонуклеаза Flap 1
<i>CYP20A1</i>	↓	cytochrome P450 family 20 subfamily A member 1	цитохром P450, семейство 20, субсумуйство А, полипептид 1
<i>CX3CR1</i>	↓	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H1
<i>HNRNPH1</i>	↓	C-X3-C motif chemokine receptor 1	хемокиновый рецептор 1 с мотивом C-X3-C

3.2.10 Функциональная активность НК-клеток, трансдуцированных *hTERT* и/или *iCASP9*, опосредована донором

Далее, мы исследовали большую выборку НК-клеток, трансдуцированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*, от разных доноров. НК-клетки подвергли анализу на цитокин-опосредованную продукцию IFN- γ (Рисунок 18А) и тесту на дегрануляцию, в ответ на распознавание клеточной линии K562, через месяц после выделения *ex vivo* (Рисунок 18Б). Не было обнаружено существенных различий между НК-клетками, модифицированными трансгенами *hTERT* и/или *iCASP9*, хотя в *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетках наблюдалось незначительное снижение доли клеток LAMP-1⁺ по сравнению с другими культурами НК-клеток: 60% в нетрансдуцированных НК-клетках, 67% в *hTERT*-НК-клеток, 48,4% в *hTERT*-*iCasp9*-НК-клетках и 66,9% в *iCasp9*-НК-клетках (Рисунок 18Б). Мы отметили распределение НК-клеток по доли клеток IFN- γ ⁺, ответивших на цитокиновую стимуляцию, на 2 почти равные группы (группа I: IFN- γ >50% и группа II: IFN- γ <50%). Причём подобное разделение было выявлено для всех попяций НК-клеток, нетрансдуцированных или модифицированных *hTERT* и/или *iCASP9* (Рисунок 18). Аналогичные группы наблюдались для данных по дегрануляции, где группа I соответствовала слабо дегранулированным клеткам с MFI<5, тогда как группа II характеризовалась MFI>5. Таким образом, в группе I большинство НК-клеток были способны к интенсивной продукции IFN- γ и демонстрировали низкую интенсивность дегрануляции на клетку. Во II группе, напротив,

НК-клетки были менее вовлечены в выработку IFN- γ , но были способны к интенсивной дегрануляции.

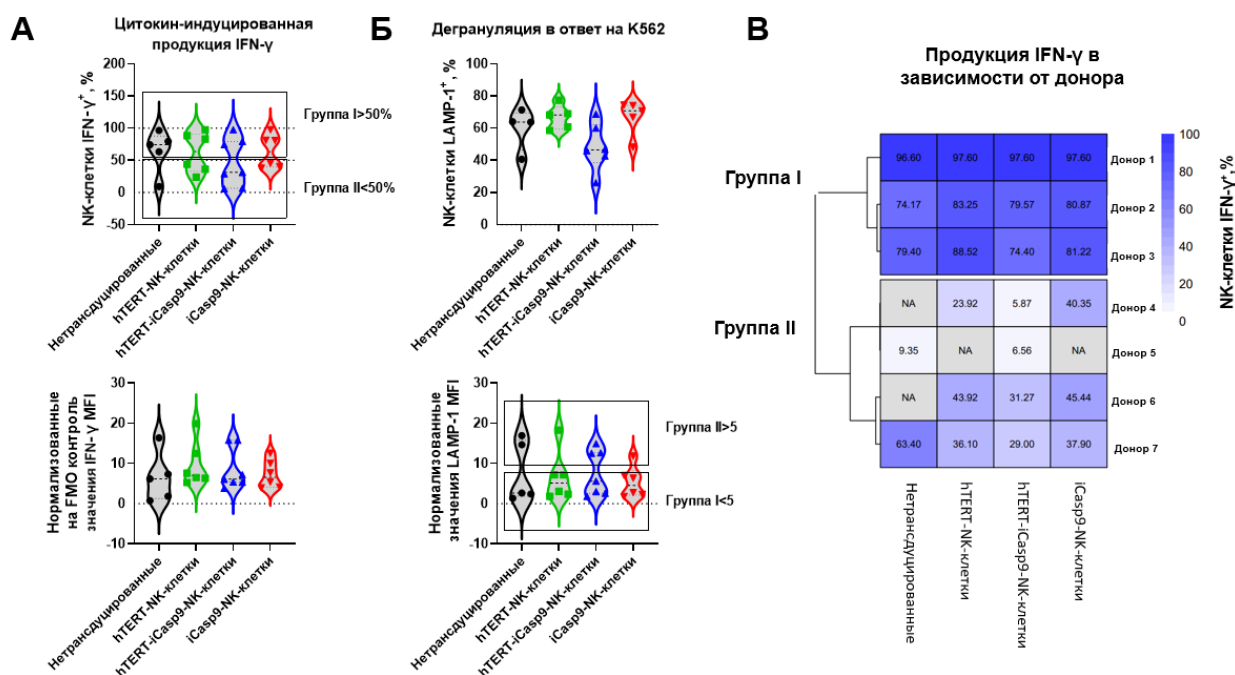


Рисунок 18. Функциональная активность НК-клеток, модифицированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*, через месяц после их выделения *ex vivo*. А) Доля НК-клеток, накапливающих IFN- γ в ответ на цитокины IL-2, IL-12 и IL-18 (верхний график). Интенсивность, нормализованной к FMO контролю, цитокинзависимой продукции IFN- γ в пересчёте на клетку измеряли по средней интенсивности флуоресценции (MFI) (нижний график). Б) Доля НК-клеток, способных к дегрануляции, измеренная по наличию поверхностной экспрессии LAMP-1 в ответ на распознавание клеток-мишеней K562 (верхний график). Интенсивность дегрануляции в среднем на клетку в ответ на распознавание клеток K562, которая была измерена по средней интенсивности флуоресценции, нормализованной на уровень базальной дегрануляции (нижний график). Клетки также были разделены на группы I (IFN- γ >50% и MFI LAMP-1<5) и II (IFN- γ <50% и MFI LAMP-1>5). В) Зависимость продукции IFN- γ от донора. Обычный односторонний анализ ANOVA, $n = 7$ доноров.

Такая группировка позволила нам определить прогностические факторы, которые могли бы влиять на силу функционального ответа у изученных типов НК-клеток. Интересно, что функциональная активность в конце первого месяца после выделения различалась среди доноров (Рисунок 18Б).

Были исследованы уровни экспрессии транскрипционных факторов Eomes и T-Bet, которые, как известно, оказывают непосредственное влияние на функциональное состояние НК-клеток [57]. Экспрессию генов определяли с помощью qPCR через месяц после выделения *ex vivo*. Уровень экспрессии мРНК *TBX21* (кодирует T-Bet) был значительно выше в группе I по сравнению с группой II, в то время как для *EOMES* очевидной разницы выявлено не было (Рисунок 19).

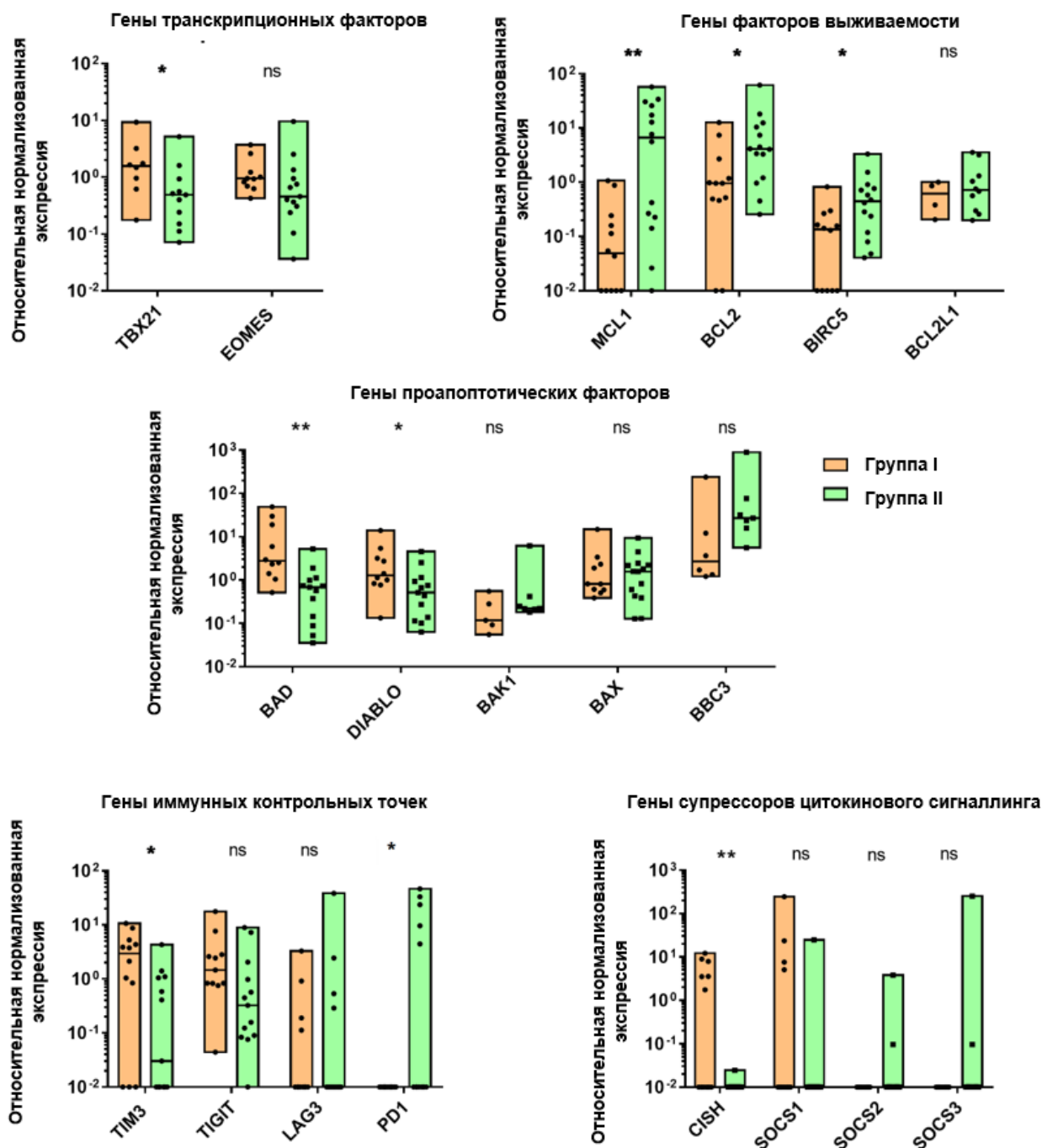


Рисунок 19. Нормализованные уровни экспрессии транскриптов, *EOMES* и *TBX21*, кодирующих факторы транскрипции Eomes и T-Bet, а также уровни экспрессии

транскриптов *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (BCL-X_L) и *BIRC5* факторов, способствующих выживанию, транскриптов *BAX*, *BAD*, *BAK1*, *DIABLO* и *BBC3* (PUMA) проапоптотических факторов, транскриптов *TIM3*, *TIGIT* и *LAG3* контрольных точек иммунитета и транскриптов *SOCS1-3* и *CISH* ингибиторов цитокинового сигналинга для NK-клеток группы I (IFN- γ >50% и MFI LAMP-1<5) и группы II (IFN- γ <50% и MFI LAMP-1>5) через месяц после выделения *ex vivo*. Анализ по критерию Манна-Уитни, n= 7 доноров (группа I: n=13, группа II: n=14), медиана, p-value: * p<0,05; ** p<0,01.

Наряду с уровнями экспрессии *EOMES* и *TBX21*, были определены уровни мРНК *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (BCL-X_L) и *BIRC5* генов, отвечающих за выживание, проапоптотических генов *BAX*, *BAD*, *BAK1*, *DIABLO* и *BBC3* (PUMA) и генов *SOCS1-3* и *CISH*, ассоциированных с истощением, и были оценены гены *TIM3*, *TIGIT* и *LAG3*, кодирующие контрольные точки иммунитета (Рисунок 19). NK-клетки I группы характеризовались более высокими уровнями экспрессии транскриптов *TBX21*, проапоптотических факторов *DIABLO*, *BAD*, транскриптов иммунных контрольных точек *TIM3* и транскриптов *CISH*, связанных с истощением, и более низкими уровнями экспрессии генов обеспечивающих выживание *MCL1*, *BCL2*, *BIRC5*, по сравнению с популяциями NK-клеток группы II. Для других исследованных генов существенных различий не наблюдалось.

В результате было показано, что выработка IFN- γ повышается одновременно с уровнями T-Vet и варьирует у разных доноров. Однако нам не удалось подтвердить какую-либо связь между цитокин-зависимой продукцией IFN- γ и другими характеристиками донора, такими как пол, возраст, серопозитивность к вирусным инфекциям, таким как hCMV, SARS-CoV-2 и EBV.

3.3 Изучение эффективности направленной элиминации в iCasp9-клетках

3.3.1 Эффективность направленной элиминации зависит от уровня экспрессии трансгена и времени инкубации с димеризатором в клетках iCasp9-Raji

Клетки iCasp-Raji были исследованы в качестве модельной системы. iCasp-Raji были отсортированы по уровню флуоресценции репортерного белка GFP на популяции “High 1” (MFI: 8266 \pm 94,42 SEM), “High 2” (MFI: 7564 \pm 93,45 SEM) и “Low” (MFI: 3118 \pm 75,61 SEM) и проинкубированы с CID (10, 20, 100, 150, 200 нМ) в течение 1ч, 2ч, 24ч. Так, было показано, что концентрации 10 нМ CID достаточно для запуска апоптоза клеток iCasp-Raji, увеличение концентрации димеризатора не влияет на снижение доли живых клеток

при длительной инкубации (24ч), эффективность действия CID зависит от уровня экспрессии трансгена в трансдуцированных клетках. Также отмечен выход на разноуровневое плато по доли живых клеток в результате инкубации 24ч в зависимости от исходного уровня MFI GFP популяций. Вероятно, клетки с низким уровнем экспрессии трансгена не способны уйти в апоптоз при данных условиях. При малых длительностях инкубации (1ч и 2ч) доля живых клеток снижается по мере увеличения концентрации димеризатора, что, возможно, связано с большей скоростью индукции апоптоза при повышении концентрации димеризатора. Присутствие ДМСО, растворителя CID, в среде не влияет на выживаемость клеток (Рисунок 20).

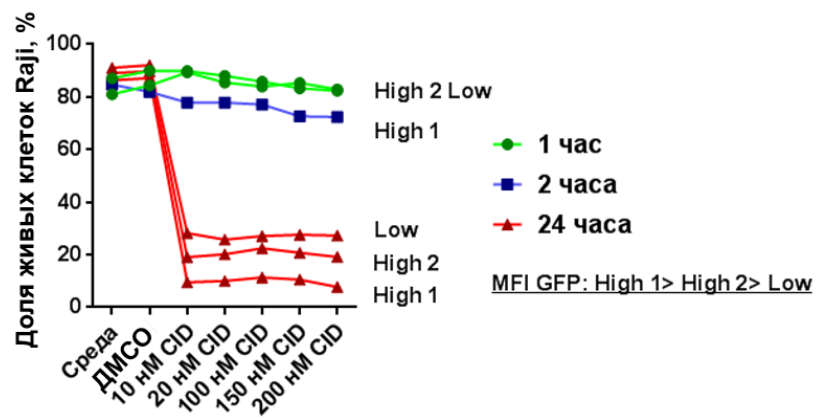


Рисунок 20. Изучение эффективности направленной элиминации *iCasp9*-модифицированных клеток линии Raji, отсортированных по средним уровням флуоресценции GFP на “High 1”, “High 2” и “Low”.

3.3.2 Индукция апоптоза в ответ на химический индуктор димеризации в субпопуляциях $CD57^-KIR2DL2/3^{+/-}NKG2C^{+/-}$ *iCasp9*-NK-клеток

Затем мы проанализировали возможность индукции клеточной гибели путём активации апоптоза димеризацией суицидной конструкции на основе каспаза-9 в *iCasp9*-модифицированных NK-клетках (Рисунок 21). NK-клетки, инкубированные с химическим индуктором димеризации (CID) или ДМСО (растворителем CID), окрашивались флуоресцентномеченным AnnexinV-PE и SYTOX-VioBlue. Во-первых, мы убедились, что присутствие ДМСО (растворителя CID) в среде в концентрациях, равных содержанию ДМСО в образцах с CID, не влияет на выживаемость клеток (Рисунок 21А). Добавление CID приводило к уменьшению доли NK-клеток GFP^+ в смешанной популяции клеток GFP^+ и GFP^- после трансдукции (Рисунок 21А). CID не повышал уровень апоптоза в немодифицированных NK-клетках, тогда как заметный проапоптотический эффект CID наблюдался в *iCasp9*-NK-клетках GFP^+ (Рисунок 21А). Концентрация CID и

продолжительность инкубации влияли на долю живых *iCasp9*-NK-клеток, при этом самый высокий процент мёртвых клеток наблюдался у *iCasp9*-NK-клеток, инкубированных со 100 нМ CID в течение 24 часов (Рисунок 21Б).

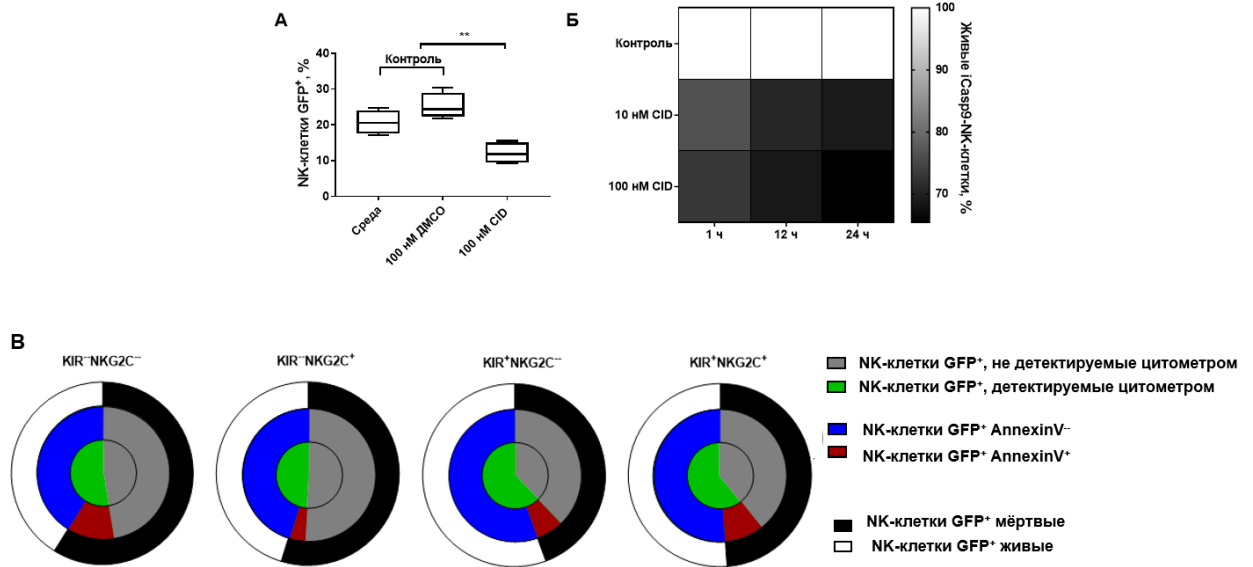


Рисунок 21. Индукция апоптоза в *iCasp9*-GFP-позитивных NK-клетках химическим индуктором димеризации (CID). А) Доля живых NK-клеток GFP⁺ после 24-часовой инкубации со средой, содержащей ДМСО и 100 нМ CID, n=3. Б) Сравнение живых *iCasp9*-NK-клеток после инкубации в течение 1ч, 12ч и 24ч с CID 10 нМ и 100 нМ. Показано процентное содержание живых клеток после инкубации с CID, нормализованное по доле живых *iCasp9*-NK-клеток в контроле (среда и 100 нМ ДМСО). Представлено среднее процентное содержание (n=2). В) Соотношение живых/мёртвых *iCasp9*-NK-клеток после 24-часовой инкубации при 100 нМ CID было нормализовано по отношению к общему количеству живых/мёртвых клеток в контрольной группе, n=2. Фракция мёртвых *iCasp9*-NK-клеток (чёрная) состоит из клеток Annexin V⁺ и/или SytoxVioBlue⁺ (красная) и клеток, разрушенных до измерения и не видимых при проточной цитометрии как NK-клетки GFP⁺ (серая). Фракция живых клеток (белая) состоит из NK-клеток GFP⁺ (зеленая) и NK-клеток AnnexinV⁻ SytoxVioBlue⁻ (синяя).

Стоит отметить, что NK-клетки, модифицированные геном *iCASP9*, инкубировали с CID на 11-й день после трансдукции. В этот период времени трансдуцированные NK-клетки демонстрировали высокую пролиферативную активность (Рисунок 6В). Мы выявили более высокие уровни индукции апоптоза в *iCasp9*-модифицированных субпопуляциях NK-клеток KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻ и KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺ по сравнению с KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻ и KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺. Тем не менее, некоторые *iCasp9*-NK-клетки GFP⁺ все ещё оставались

живыми после инкубации с CID. Также донор-зависимые различия индукции апоптоза наблюдались в ответ на обработку iCasp9-NK-клеток димеризатором. Мы также обнаружили, что более дифференцированные NK-клетки (по наличию экспрессии CD57 и KIR2DL2/3), по-видимому, более устойчивы к индукции апоптоза, опосредованного CID (Рисунок 21). Подводя итог, можно сказать, что различные факторы, включая состояние дифференцировки NK-клеток, скорость пролиферации и статус активации, а также уровень экспрессии iCasp9-трансгена, могут влиять на регуляцию баланса сигналов выживаемости популяций NK-клеток, трансдуцированных *iCASP9*.

3.3.3 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, мы получили 4 субпопуляции: нетрансдуцированные NK-клетки, hTERT-NK-клетки, iCasp9-NK-клетки, hTERT-iCasp9-NK-клетки, DN-hTERT-iCasp9-NK-клетки. Популяции были протестированы на эффективность направленной элиминации клеток с помощью суицидальной конструкции iCasp9. Мы сравнили общие уровни апоптоза, индуцированного CID, в hTERT-iCasp9-NK-клетках и iCasp9-NK-клетках после 24ч инкубации. Несмотря на то, что hTERT-iCasp9-NK-клетки и iCasp9-NK-клетки продемонстрировали сопоставимые уровни экспрессии транскриптов *iCASP9*, 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 21А, Б). А именно, после 24-часовой инкубации 10 нМ или 100 нМ CID запускали индукцию клеточной гибели до 56% (в среднем 28,6%) популяции iCasp9-NK-клеток, тогда как менее 19% (в среднем 10%) популяции hTERT-iCasp9-NK-клеток реагировали на димеризатор. Примечательно, что ни hTERT-NK-клетки, ни нетрансдуцированные NK-клетки не подвергались индукции апоптоза при инкубации с CID.

Принимая во внимание, что оверэкспрессия hTERT может противодействовать индукции клеточной гибели [239], мы решили определить возможную роль неканонических функций, опосредованных теломеразой (функций, которые не заключаются в удлинении теломер), 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 21А, Б). Поскольку DN-hTERT кодирует доминантно-негативную форму hTERT, у которого отсутствуют каталитические функции,

полученные результаты подтвердили идею о том, что неканонические функции hTERT могут противодействовать апоптозу, вызванному iCasp9 при добавлении CID.

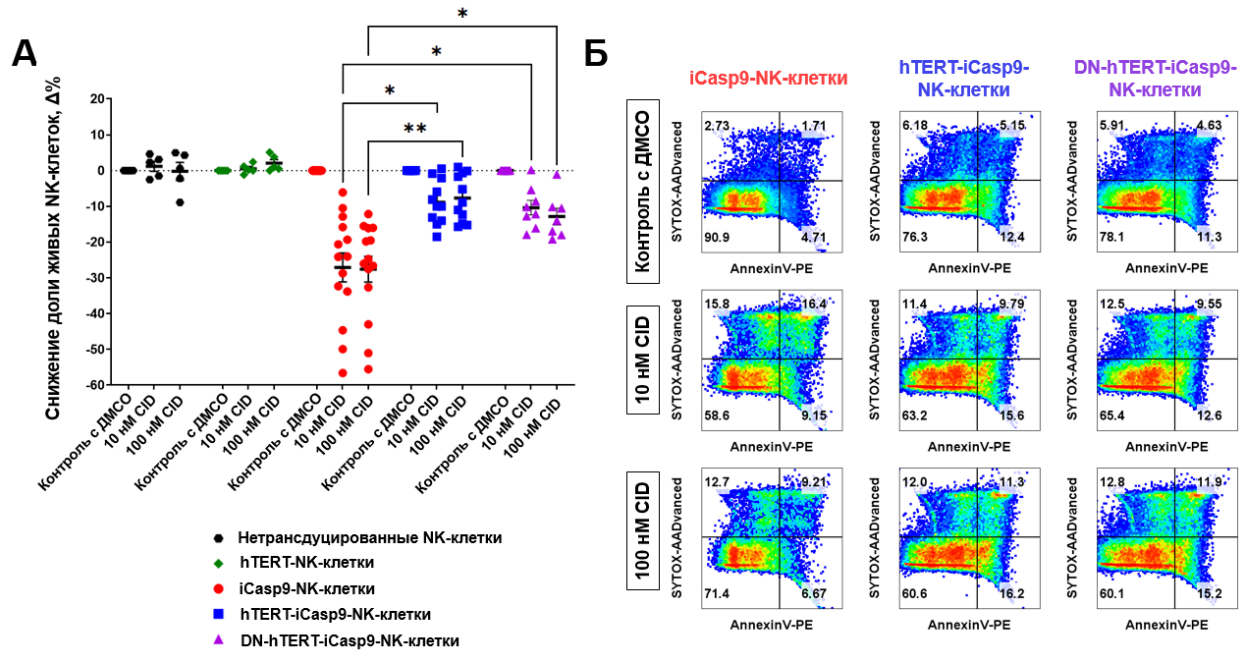


Рисунок 21. Оценка эффективности индукции клеточной гибели суицидальной конструкцией iCasp9 в НК-клетках, трансдуцированных генами *iCASP9*, *hTERT* и *DN-hTERT*. А) Снижение доли живых НК-клеток после обработки 10 нМ и 100 нМ CID в течение 24 часов нормализовалось по проценту живых НК-клеток в контрольной группе клеток, инкубированных в присутствии ДМСО, растворителя CID. Тест множественных сравнений Тьюки использовали для сравнения нетрансдуцированных НК-клеток, n=5; hTERT-НК-клеток, n=4; iCasp9-НК-клеток, n=14; hTERT-iCasp9-НК-клеток, n=11; DN-hTERT-iCasp9-НК-клеток, n=8. Среднее \pm SEM. Б) Репрезентативные графики НК-клеток, окрашенных AnnexinV-PE и SYTOX-AADvanced, после 24-часовой обработки CID.

3.3.4 НК-клетки с различными типами трансгенов (*hTERT*, *hTERT+iCASP9*, *iCASP9*) по-разному регулируют выживаемость и апоптоз

hTERT известен своими неканоническими функциями, которые могут способствовать выживанию клеток. Теломераза может напрямую (например, в качестве кофактора транскрипции [240,241] или косвенно (например, путём настройки передачи сигналов NF-κB [180]) модулировать уровни транскрипции генов, способствующих выживанию или апоптозу. Принимая во внимание повышенную выживаемость hTERT-iCasp9-НК-клеток по сравнению с iCasp9-НК-клетками после добавления CID, мы проанализировали изменения уровней мРНК с помощью qPCR: 1) трансгенов *hTERT* и *iCasp9*, 2) *EOMES* и *TBX21*, кодирующих факторы транскрипции Eomes и T-bet; 3) гены,

DIABLO, *BAX* и *BAD* проапоптотических факторов; 4) гены *BIRC5*, *MCL1*, *BCL2*, *BCL2L1*, способствующие выживанию.

Поскольку уровни трансгенов и экспрессии апоптотических генов могут зависеть друг от друга, мы выявили ассоциации между генами выживаемости и проапоптотическими генами с помощью корреляционного анализа. Данные об экспрессии генов, собранные с помощью qPCR, были разделены на 4 группы в соответствии с генетическими модификациями: нетрансдуцированные НК-клетки, hTERT-НК-клетки, hTERT-iCasp9-НК-клетки и iCasp9-НК-клетки (Рисунок 22).

В качестве контроля использовали нетрансдуцированные НК-клетки, поскольку баланс про- и противоапоптотических факторов в этих клетках в основном определяется условиями окружающей среды, доступностью цитокинов и факторов роста. Нетрансдуцированные НК-клетки образовали кластер положительно ассоциированных генов, таких как *DIABLO*, *EOMES*, *BIRC5*, *BAX* и *MCL1* (ассоциированного с *BAX* и *BIRC5*). *DIABLO* показал положительную корреляцию уровней экспрессии с *BAD*, а *MCL1* также коррелировал с *BCL2*. *TBX21* был положительно связан с *BCL2L1* и кластеризовался отдельно от других изученных генов (Рисунок 22А). В hTERT-НК-клетках корреляционный анализ выявил иную картину взаимосвязей между уровнями экспрессии генов: уровни мРНК *BCL2* и *BAX* были достоверно положительно связаны, в то время как *hTERT* демонстрировал тенденцию к отрицательной корреляции с *DIABLO* (Рисунок 22Б). Для анализа эффектов трансгена *iCASP9* были изучены корреляции внутри iCasp9-НК-клеток. Часть кластера, ранее наблюдавшегося в нетрансдуцированных НК-клетках, сохранилась в iCasp9-НК-клетках и включала гены *EOMES*, *BIRC5*, *BAD*, *BCL2*. Отдельно *iCASP9* был положительно связан с *DIABLO*, который, в свою очередь, положительно коррелировал с *TBX21*. Мы также заметили сильную положительную корреляцию для *hTERT* и *BCL2L1* и отдельно для *BCL2* и *MCL1* (Рисунок 22В). Наконец, мы изучили взаимодействие между генами *hTERT* и *iCASP9* в hTERT-iCasp9-НК-клетках. Были обнаружены два отдельных кластера: 1-й – *iCASP9*, *BAD*, *BAX*, *BCL2*, *MCL1*; 2-й – *DIABLO*, *EOMES*, *BCL2L1*, *BIRC5* и *TBX21* с тенденцией к положительной ассоциации с *hTERT* (Рисунок 22Г).

Таким образом, *iCASP9* показал положительную связь с проапоптотическим геном *DIABLO* или *BAD*, тогда как *hTERT* положительно коррелировал с факторами *BCL2L1* и *BIRC5*, способствующими выживанию, и отрицательно - с *DIABLO*. Для hTERT-iCasp9-НК-клеток мы заметили наиболее очевидное разделение уровней транскрипции изученных

генов на два кластера. Это указывает на независимый эффект каждого из трансгенов, *hTERT* и *iCASP9*, способствующий выживанию НК-клеток.

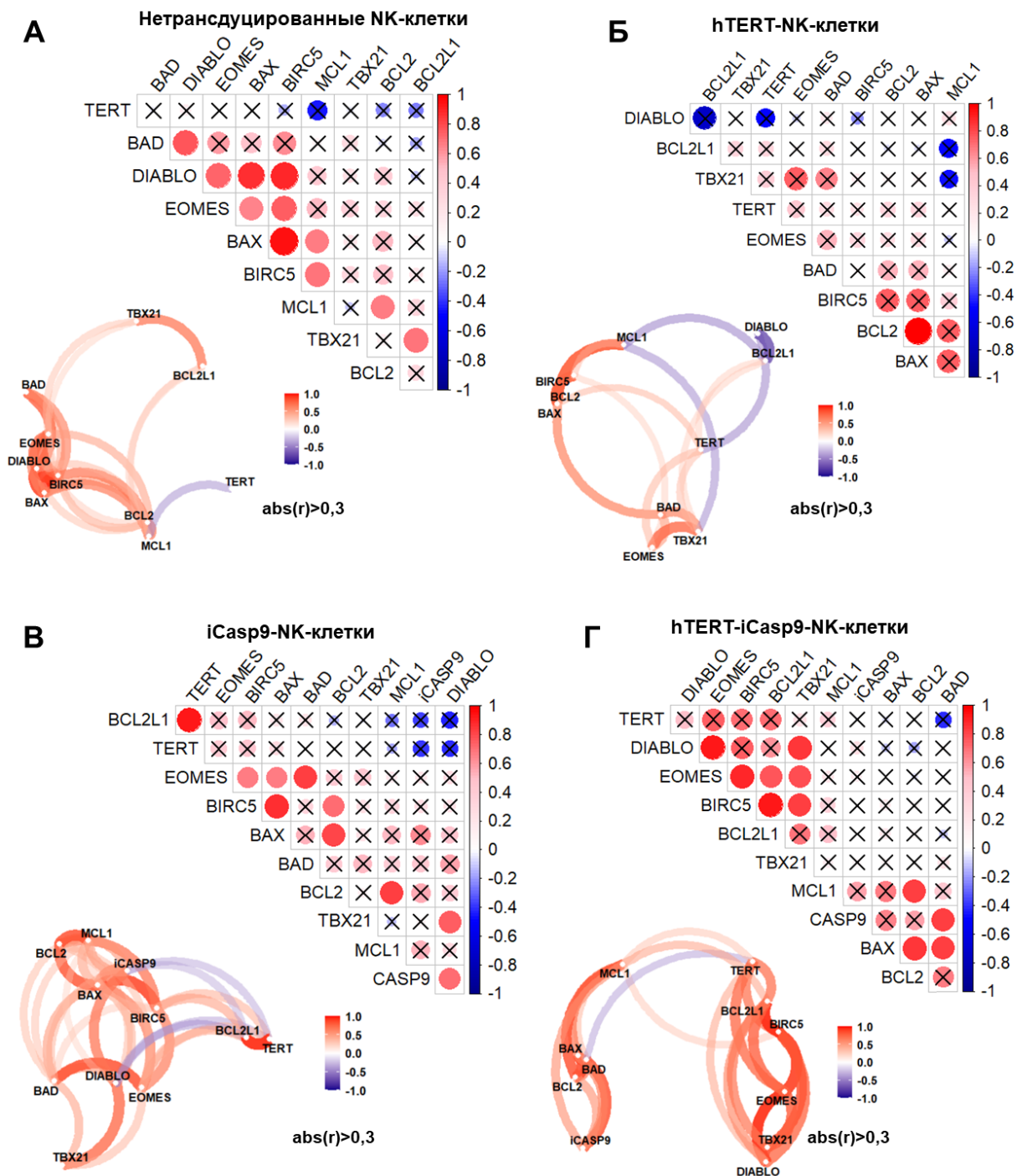


Рисунок 22. Взаимосвязь уровней экспрессии генов апоптоза *BAD*, *BAX*, *DIABLO*, *BCL2*, *BCL2L1* (*Bcl-X_L*), *MCL1*, *BIRC5*, трансгенов *hTERT* и *iCASP9*, а также генов *EOMES* и *TBX21*, кодирующих транскрипционные факторы Eomes и T-bet, в НК-клетках. В правом верхнем углу каждого графика представлены сгруппированные корреляционные матрицы, а в левом нижнем углу - графическое представление данных ($abs(r) > 0,3$). Показаны

корреляции уровней экспрессии генов для А) нетрансдуцированных NK-клеток, n=10; Б) hTERT-NK-клеток, n=7; В) iCasp9-NK-клеток, n=9; Г) hTERT-iCasp9-NK-клеток, n=7. Корреляционный тест Спирмена. Крестиком обозначено $p\text{-value} > 0,05$.

3.3.5 “Выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки и “резистентные” hTERT-iCasp9-NK-клетки по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками имеют тенденцию активировать гены, связанные с клеточным циклом, в то время как повышенные уровни *BIRC3*, не являются единственным фактором, определяющим выживаемость NK-клеток после активации iCasp9

Принимая во внимание, что hTERT может модулировать внутриклеточные сигнальные пути и транскриптомную активность в NK-клетках и усиливать пути, способствующие выживанию [182,242], гиперэкспрессия hTERT может противодействовать гибели клеток, опосредованной iCasp9. Ранее мы показали, что гиперэкспрессия hTERT и суицидная конструкция iCasp9 по-разному модулируют баланс про- и противоапоптотических факторов в NK-клетках. В результате, мы исследовали транскриптомные изменения в модифицированных клетках с использованием анализа методом РНК секвенирования для более глубокого понимания возможных причин повышенной выживаемости hTERT-iCasp9-NK-клеток при добавлении CID. Мы исследовали 3 набора модифицированных NK-клеток: hTERT-iCasp9-NK-клетки, iCasp9-NK-клетки и (CID)-iCasp9-NK-клетки (iCasp9-NK-клетки, которые подвергались 24-часовому воздействию CID в концентрации 100 нМ).

Все измерения были проведены в тот же момент времени, когда были собраны образцы для транскриптомного анализа, а именно через месяц после выделения NK-клеток из периферической крови. Сначала мы сравнили iCasp9-NK-клетки, обработанные CID ((CID)-iCasp9-NK-клетки), с iCasp9-NK-клетками. Мы определили 402 дифференциально экспрессируемых гена (DEGs) ($p\text{-adj} < 0,05$ и $\text{abs}(\text{Log2FC}) > 0,58$), из которых 251 DEGs был активирован (upDEGs), а 151 DEGs был снижен (downDEGs) (Рисунок 23А, Б). *ZC3HC1*, *CDC25A*, *CCNE2*, *ESCO2*, связанные с клеточным делением, были одними из наиболее значимо активированных генов. Мы также наблюдали снижение активности *IFIT3*, белковый продукт которого защищает от апоптоза, опосредованного митохондриями [243]. Уровень *ZNF550*, кодирующего транскрипционный фактор с предсказанной ДНК-связывающей активностью, также был значительно повышен, тогда как уровень другого транскрипционного фактора *FOSB* был снижен. Среди факторов, связанных с апоптозом, были повышены уровни *BIRC3* и *FADD*, тогда как *NAIP*, *FOS*, *CTSK*, *iCASP9*, *NFKBIA*,

DDIT3 были снижены. Таким образом, “выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки демонстрировали большое количество DEGs, участвующих во внутриклеточных сигнальных путях, способных компенсировать разрушительные эффекты iCasp9 (Рисунок 23Б).

Во-вторых, мы провели сравнение hTERT-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками. Поскольку мы уже показали, что hTERT-iCasp9-NK-клетки более устойчивы к индукции клеточной гибели димеризатором, мы идентифицировали некоторые особенности, определяющие повышенную выживаемость hTERT-iCasp9-NK-клеток. При сравнении hTERT-iCasp9-NK-клеток и iCasp9-NK-клеток мы определили 63 upDEGs и 13 downDEGs (Рисунок 23Б, В). Среди upDEGs мы подтвердили оверэкспрессию *TERT* и обнаружили несколько генов, связанных с клеточным циклом: *NCAPH*, *TTK* и *CDCA5*. Транскрипты *IFNG* также накапливались в hTERT-iCasp9-NK-клетках. Был повышен уровень фактора, кодирующего *EIF3L*, связанного с инициацией трансляции. Среди генов с пониженной экспрессией мы наблюдали *HNRNP1* и *SNRPD3*, кодирующие белки, которые участвуют в сплайсинге РНК. *DNAJB14*, кодирующий белок, который участвует в шапероновом рефолдинге белков, был снижен (Рисунок 23Б). Следовательно, оверэкспрессия hTERT связана с усилением экспрессии генов, стимулирующих клеточный цикл, активирующих транскрипцию и модулирующих сплайсинг в NK-клетках.

Мы сопоставили транскриптомные данные двух групп сравнения 1) (CID)-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток и 2) hTERT-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток. (CID)-iCasp9-NK-клетки активировали множество генов, участвующих в связывании 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 (Рисунок 23Г). Используя анализ обогащения генного набора GeneOntology, мы обнаружили значительное подавление программ клеточного развития и путей регуляции клеточной гибели в (CID)-iCasp9-NK-клетках, тогда как для hTERT-iCasp9-NK-клеток была показана активация путей, участвующих в регуляции клеточного цикла. Таким образом, (CID)-iCasp9-NK-клетки и hTERT-iCasp9-NK-клетки характеризовались разнонаправленными транскриптомными изменениями по сравнению с iCasp9-NK-клетками (Рисунок 23Г).

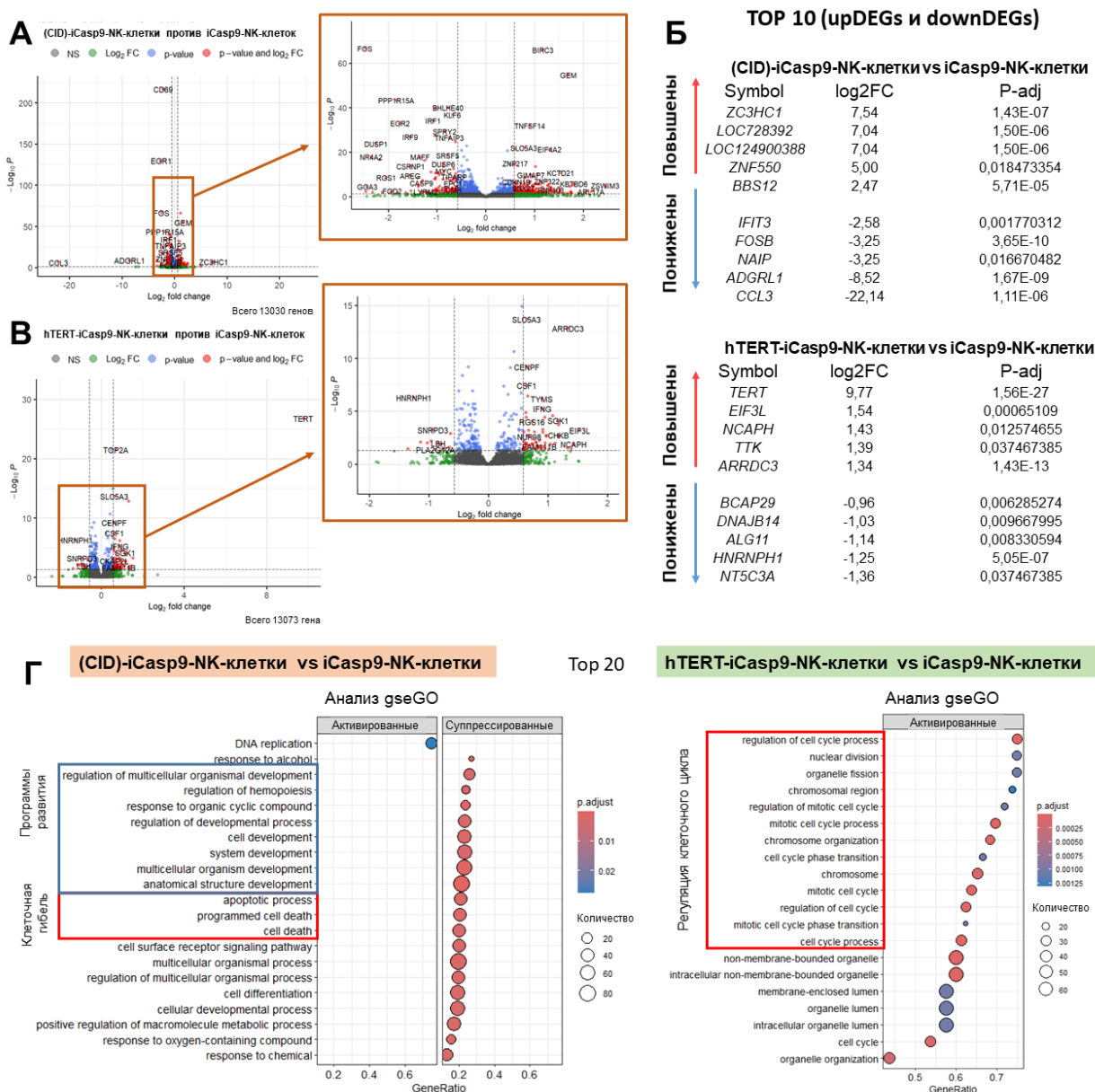


Рисунок 23. Вулкан сравнения: А) “выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки, подвергнутые инкубации со 100 нм CID в течение 24 часов, по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками; В) “устойчивые” hTERT-iCasp9-NK-клетки по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. $p\text{-adj} < 0,05$ и $\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0,58$. Б) Таблица, представляющая топ-10 генов (5 повышенных и 5 пониженных) для обоих сравнений, представленных на графике вулкана. Г) Представление данных RNA seq для “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток, “устойчивых” hTERT-iCasp9-NK-клеток в сравнении с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками, которые подвергались инкубации со 100 нм CID в течение 24 часов. Значения DEG ($p\text{-adj} < 0,05$ и $\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0,58$). Точечная диаграмма GeneOntology обогащения набора генов, где ось y представляет молекулярные пути GO, а именно биологические процессы (BP). Чем больше размер круга, тем больше

число генов, участвующих в пути. Круги окрашены в соответствии со значениями *p*-adjusted.

Мы тщательно изучили уровни транскрипции генов, связанных с апоптотическими путями, в этих трёх типах клеток. (CID)-iCasp9-NK-клетки имели изменённые уровни экспрессии про- и противоапоптотических генов по сравнению с iCasp9-NK-клетками. Среди генов, ассоциированных с гибелью клеток, были повышены гены, ассоциированные с TNF сигналингом, гены, кодирующие *Vim* (*BCL2L11*), каспазы-3, -2 и -10, в то время как уровень каспазы-9 был снижен. Среди генов, способствующих выживанию, ген *NFKB1* и связанные с ним *BIRC3* и *TRAF2* также были активированы (Рисунок 24А). При сравнении hTERT-iCasp9-NK-клеток против iCasp9-NK-клеток уровень *BIRC3* тоже был повышен. Мы также проверили уровни транскриптов *BIRC3* в NK-клетках с помощью qPCR: в NK-клетках со сверхэкспрессией hTERT (hTERT- и hTERT-iCasp9-NK-клетках) экспрессия *BIRC3* была повышена по сравнению с нетрансдуцированными и iCasp9-модифицированными NK-клетками (Рисунок 24Б). Поскольку iCasp9 действует на поздних стадиях апоптоза, повышенная экспрессия *BIRC3* (кодирующего c-IAP2) может препятствовать апоптозу, индуцированному каспазой-9, и так может способствовать устойчивости NK-клеток к гибели, опосредованной iCasp9. Мы встроили конструкцию *U6-shBIRC3-cPPT* в существующие векторы для снижения уровня транскрипта *BIRC3* в модифицированных NK-клетках. NK-клетки, модифицированные *shBIRC3* и генами *iCASP9*, *hTERT* и *DN-hTERT*, обрабатывали 10 нМ и 100 нМ CID в течение 24ч и оценивали индукцию клеточной гибели в них. Мы не обнаружили каких-либо существенных изменений в соотношении доли апоптотических клеток после 24ч инкубации с CID между *shBIRC3*-модифицированными клетками и соответствующими контрольными клетками (Рисунок 24В). Эти результаты позволяют предположить, что различные неканонические функции hTERT модулируют выживаемость клеток, защищая NK-клетки.

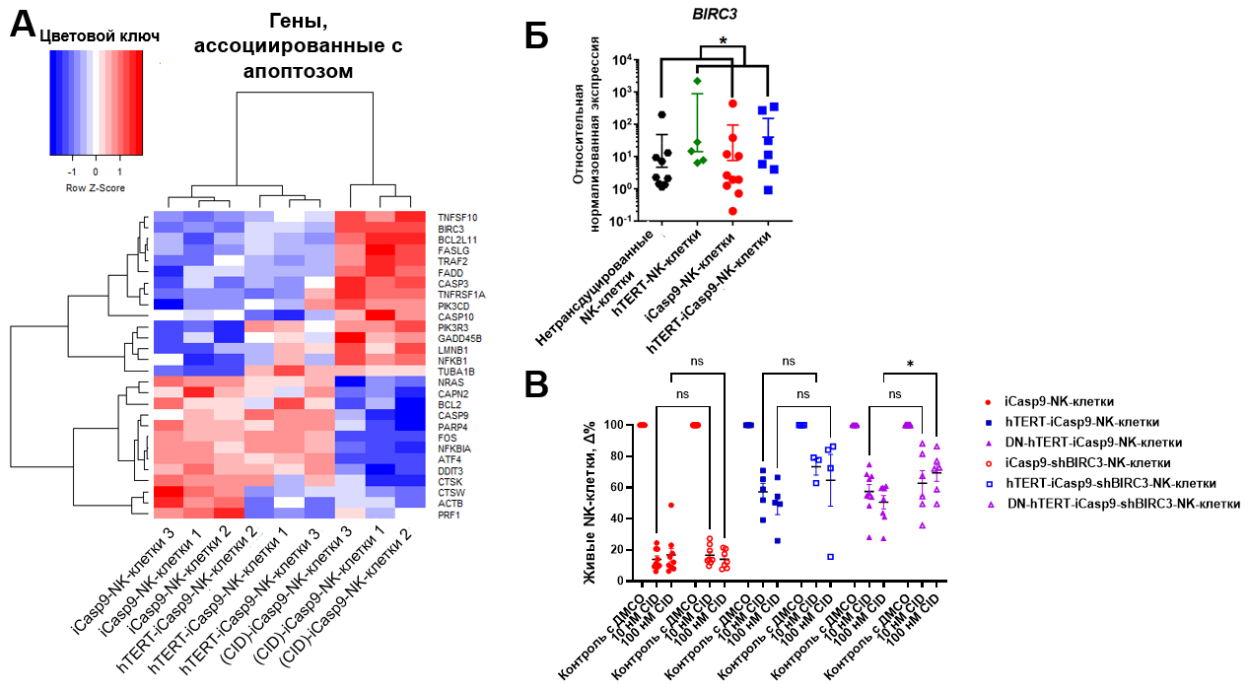


Рисунок 24. Исследование индукции клеточной гибели, опосредованной iCasp9, в NK-клетках с нокдауном *BIRC3*. А) Для всех популяций NK-клеток с использованием базы данных “Киотская энциклопедия генов и геномов” (KEGG) были получены нормализованные значения количества генов, соответствующих пути апоптоза "Hsa04210", с $p\text{-adj} < 0,05$ из сравнения (CID)-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток, и нанесены на тепловую диаграмму. Представлены данные, нормализованные по Z-score, в каждой строке. Красным обозначены транскрипты с повышенной экспрессией, а синим – с пониженной экспрессией. Б) относительная представленность транскриптов *BIRC3* в популяциях нетрансдуцированных NK-клеток и трансдуцированных трансгенами *hTERT*, *hTERT+iCASP9* и *iCASP9*. Тест Манна-Уитни проведен для объединённых групп данных нетрансдуцированных и iCasp9-NK-клеток ($n=19$) в сравнении с hTERT-NK-клетками и hTERT-iCasp9-NK-клетками ($n=12$). Группы были разделены по уровню экспрессии hTERT в них: нетрансдуцированные и iCasp9-NK-клетки характеризуются низкой экспрессией hTERT по сравнению с hTERT-оверэкспрессивными hTERT-NK-клетками и hTERT-iCasp9-NK-клетками. Среднее \pm -SEM. В) Снижение доли живых NK-клеток после обработки 24ч 10 нМ и 100 нМ CID нормализовалось по количеству и процентному содержанию живых NK-клеток в контрольной группе, инкубированной с ДМСО, растворителем CID. Тест множественных сравнений Тьюки. 10 популяций трансдуцированных клеток от 8 доноров (iCasp9-NK клетки, $n=9$; hTERT-iCasp9-NK клетки, $n=5$; DN-hTERT-iCasp9-NK клетки, $n=9$; iCasp9-shBIRC3-NK клетки, $n=8$; hTERT-iCasp9-shBIRC3-NK клетки, $n=3$; DN-hTERT-iCasp9-shBIRC3-NK клетки, $n=6$). Среднее \pm -SEM.

3.3.6 hTERT-iCasp9-NK-клетки и (CID)-iCasp9-NK-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 изменены среди “выживших” и “резистентных” клеток относительно “восприимчивых” клеток, с помощью анализа данных РНК-секвенирования.

Поскольку (CID)-iCasp9-NK-клетки и hTERT-iCasp9-NK-клетки изменили свой транскриптомный профиль разнонаправленно по сравнению с iCasp9-NK-клетками, мы решили сосредоточить наше исследование на общих сигнатурах между (CID)-iCasp9-NK-клетками и hTERT-iCasp9-NK-клетками, чтобы найти особенности, определяющие повышенную выживаемость NK-клеток при добавлении CID. Затем из данных, полученных при сравнении (CID)-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками и hTERT-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками, были выделены пути, которые одновременно активировались или подавлялись в обоих группах сравнения.

Мы проанализировали полученные DEGs с использованием диаграммы Венна. 1096 генов с $p\text{-adj} < 0,05$ из сравнения (CID)-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток были противопоставлены 266 генам с $p\text{-adj} < 0,05$ из сравнения hTERT-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток. 126 генов были общими для NK-клеток, устойчивых к индукции апоптоза, опосредованной iCasp9. Мы определили повышение экспрессии 17 генов в обоих сравнениях (Рисунок 25А, В) и 2 общих пониженных гена, которые отвечают за обработку РНК в рибонуклеопротеиновых комплексах (Рисунок 25Б, В). Было обнаружено, что активированные общие гены участвуют в биологических процессах, таких как деление клеток, иммунологических процессах и миграции клеток; а их продукты обладают серин-треонинкиназной, гистон-модифицирующей и гистонкиназной или протеинсеринкиназной активностью. 126 общих генов ($p\text{-adj} < 0,05$) из диаграммы Венна были проанализированы: ранжированы по соответствующим уровням Log_2FC , взятым из сравнения (CID)-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками (Рисунок 25Д). Так, общие пути, связанные с миграцией клеток и гомеостазом кальция, были подавлены, в то время как пути, связанные с прогрессированием клеточного цикла, были активированы (Рисунок 25Г, Д).

Для путей, проанализированных по базе данных Hallmark, было показано обогащение генов-мишеней транскрипционного фактора E2F, которые отвечают за регуляцию клеточного цикла и участвуют в репликации ДНК (Рисунок 25Е). Аналогичные

результаты были получены при исследовании путей базы данных Reactome. Показано увеличение экспрессии генов “митотического клеточного цикла” (“cell cycle mitotic”) (Рисунок 25Ж). Пути “Hallmark TNFa signaling via NFkB”, а также “Reactome signaling via NTRKS”, “Reactome nuclear events kinase and transcription factor activation” и “Reactome signaling by receptor tyrosine kinase” были значительно снижены (Рисунок 25Е, Ж). Мы также выявили вовлеченность ряда транскрипционных факторов в повышение или понижение экспрессии генов-мишеней. Таким образом, модуляция генов-мишеней транскрипционных факторов: активация *HSD17D8*, *ASH1L*, *BARX2*, *FOXD2*, *ZNF350* и *CEBPZ*, и подавление связывания *TATAAA TATA 01* – может регулировать внутренние процессы НК-клеток, ответственные за их выживание (Рисунок 253).

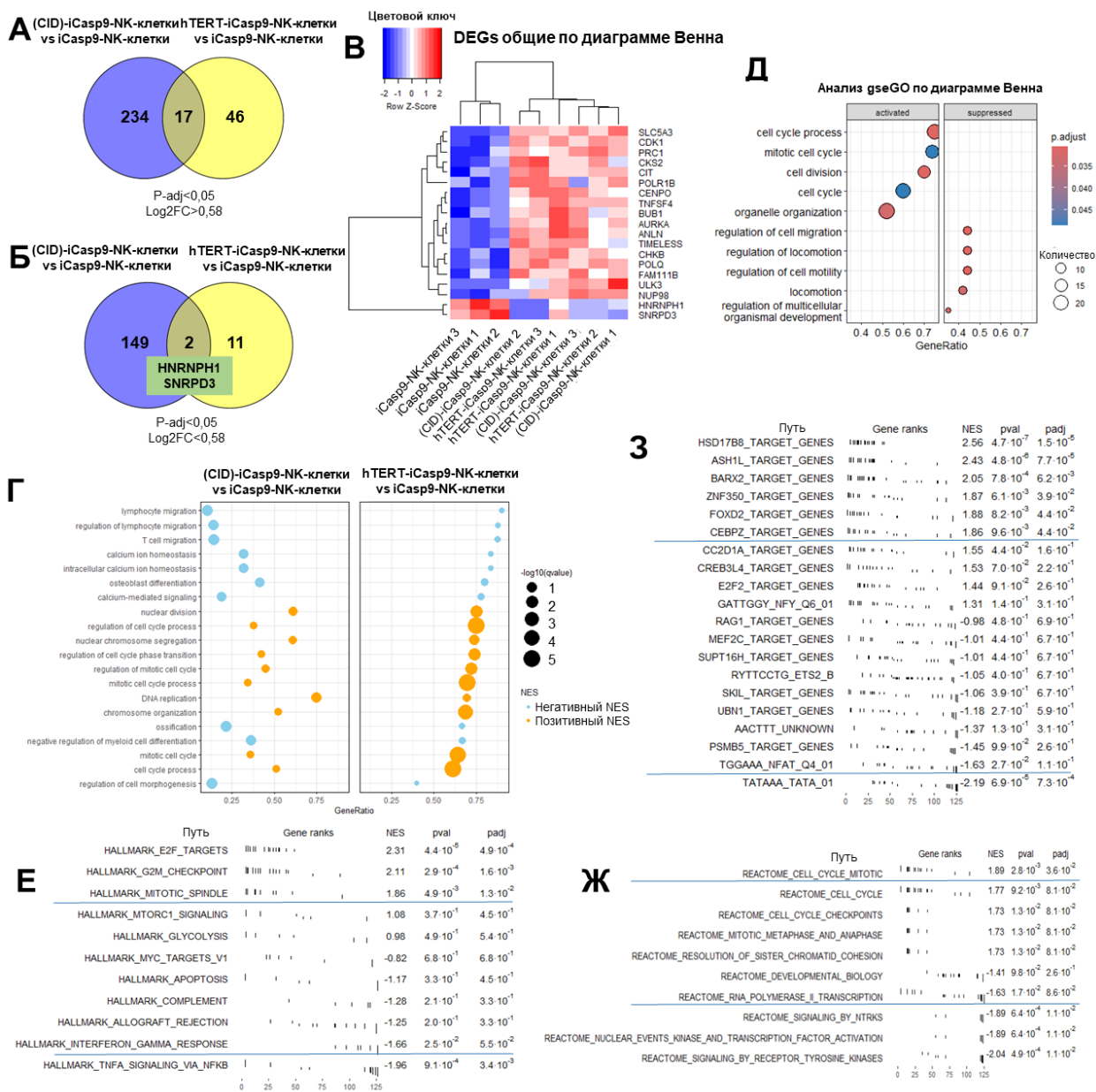


Рисунок 25. Представление данных транскриптомного анализа “резистентных” hTERT-iCasp9-NK-клеток и “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток, которые подвергались инкубации со 100 нм CID в течение 24 часов, по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. Представлены DEGs ($p\text{-adj}<0,05$ и $\text{abs}(\text{Log2FC})>0,58$), где значения upDEGs ($p\text{-adj}<0,05$ и $\text{Log2FC}>0,58$) и downDEGs ($p\text{-adj}<0,05$ и $\text{Log2FC}<0,58$). Двухкруговые диаграммы Венна для общих значений А) upDEGs и Б) downDEGs. В) Нормализованные значения upDEGs и downDEGS были получены для всех популяций NK-клеток и нанесены на тепловую карту. Представлены нормализованные данные Z-score по строкам. Красным цветом обозначены транскрипты с повышенной экспрессией, а синим – с пониженной. Г) Сравнительный график GSEA для анализа молекулярных путей GO, а именно биологических процессов (BP), для обогащения набора генов GeneOntology. Для сравнения (CID)-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток и для сравнения hTERT-iCasp9-NK-клеток vs iCasp9-NK-клеток были выбраны 10 наиболее значимо-изменённых путей общих для обоих сравнений с NES>0,9 перцентиля. Пути с отрицательными значениями NES обозначены синим цветом, а с положительными значениями NES – жёлтым. Чем больше размер круга, тем больше значение. Д) Представление данных РНК секвенирования “резистентных” hTERT-iCasp9-NK-клеток и “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток, которые подвергались инкубации со 100 нм CID в течение 24 часов, по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. Общие 126 генов DE с $p\text{-adj}<0,05$ из обоих сравнений были проанализированы с помощью анализа обогащения набора генов (GSEA) и анализа GeneOntology обогащения набора генов (gseGO). Соответствующие значения Log2FC были получены для “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток в сравнении с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. gseGO представляет молекулярные пути GO, а именно 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 гены. Столбчатые диаграммы представляют нормализованные показатели обогащения (NES) GSEA для Е) путей Hallmark, Ж) путей Reactome, З) транскрипционных факторов-мишеней (TFT). На графиках Е) Ж) З) синими линиями показаны пути, значительно изменённые в соответствии с $p\text{-adjusted}$.

3.3.7 NK-клетки, устойчивые к индукции апоптоза, опосредованной CID, показали повышенную регуляцию генов, стимулирующих клеточный цикл

Чтобы определить изменения, происходящие в регуляции клеточного цикла NK-клеток, мы обратились к анализу данных с использованием базы данных KEGG. Также мы извлекли нормализованные значения для мишеней HALLMARK E2F, которые были

дополнительно отфильтрованы по $p\text{-adj} < 0,05$, полученном при сравнении (CID)-iCasp9-NK-клеток против iCasp9-NK-клеток (Рисунок 26А). “Выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки активировали гены, ответственные за прохождение всего клеточного цикла, в то время как hTERT-iCasp9-NK-клетки более узко регулировались на стадии G2 клеточного цикла. Что касается мишеней E2F, то подавляющее большинство генов изменили свою экспрессию в одном и том же направлении при сопоставлении (CID)-iCasp9-NK-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клеток относительно iCasp9-NK-клеток. Однако такие гены, как *LRB*, *LUC7L3*, *NUP153*, *CDKN1B*, *MYC* и *ING3*, по-разному изменяли экспрессию своей мРНК в hTERT-iCasp9-NK-клетках и (CID)-iCasp9-NK-клетках по сравнению с iCasp9-NK-клетками (Рисунок 26Б).

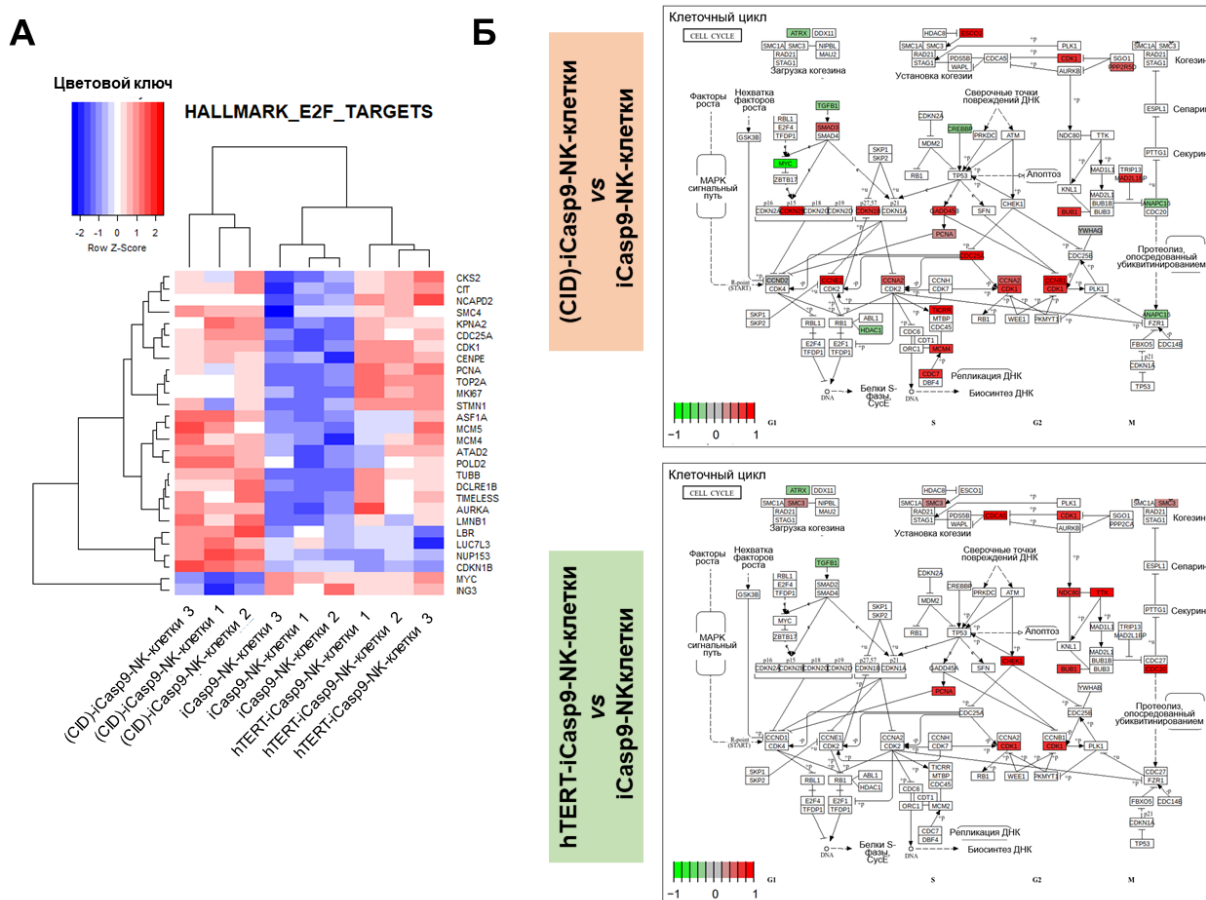


Рисунок 26. Представление данных анализа РНК секвенирования “резистентных” hTERT-iCasp9-NK-клеток и “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток, которые подвергались инкубации со 100 нМ CID в течение 24 часов, по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. А) На основании базы данных “Киотская энциклопедия генов и геномов” (KEGG), нормализованное количество генов, соответствующих пути клеточного цикла “Hsa04110” с $p\text{-adj} < 0,05$, из сравнения (CID)-iCasp9-NK-клеток с iCasp9-NK-клетками, было извлечено для всех популяций NK-клеток и нанесено на тепловую диаграмму. Представлены нормализованные данные Z-score по строкам. Красным цветом обозначены

транскрипты с повышенной экспрессией, а жёлтым – с пониженной экспрессией. Б) Графики KEGG pathview для пути клеточного цикла “Hsa04110”. В верхней части представлены данные из сравнения для “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клеток vs “восприимчивых” iCasp9-NK-клеток. В нижней части – график для “резистентных” hTERT-iCasp9-NK-клеток в сравнении с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками.

3.3.8 Выжившие и резистентные клетки были охарактеризованы несколькими альтернативно сплайсированными транскриптами

Регуляция клеточных факторов и их функциональное состояние зависит не только от изменения уровня экспрессии транскриптов. Разнообразие сплайсированных изоформ мРНК также определяет конечное количество, структуру и качество белка. Чтобы исследовать изменения, связанные со сплайсингом, которые могут влиять на выживаемость клеток, мы провели анализ вариантов сплайсинга в 3 группах сравнения: (CID)-iCasp9-NK-клетки vs iCasp9-NK-клеток, hTERT-iCasp9-NK-клетки vs iCasp9-NK-клеток и hTERT-NK-клетки vs iCasp9-NK-клеток. Мы также сравнили hTERT-NK-клетки с iCasp9-NK-клетками, чтобы подчеркнуть роль гиперэкспрессии hTERT в наблюдаемых 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. Эти гены в первую очередь участвуют в фундаментальных процессах экспрессии генов и клеточного метаболизма. Затем мы наблюдали 12 транскриптов (*PSMF1*, *CEBPB*, *ERCC5*, *RBM8A*, *VPS18*, *PLAAT4*, *ZNF706*, *HDHD3*, *AKAP11*, *NCK2*, *MED24*, *AARS1*), которые являются общими для “выживших” и “резистентных” NK-клеток и связаны с меньшей склонностью этих клеток к апоптозу (Рисунок 27). В совокупности они играют ключевую роль в поддержании клеточного гомеостаза, реакции на стресс и целостности генома. Мы также наблюдали изоформы, чувствительные к NMD (нонсенс-опосредованному распаду), которые подвержены деградации (Рисунок 27). Таким образом, мы определили профиль по-разному экспрессируемых изоформ сплайсинга, баланс которых определяет уровни экспрессии функциональных белков.

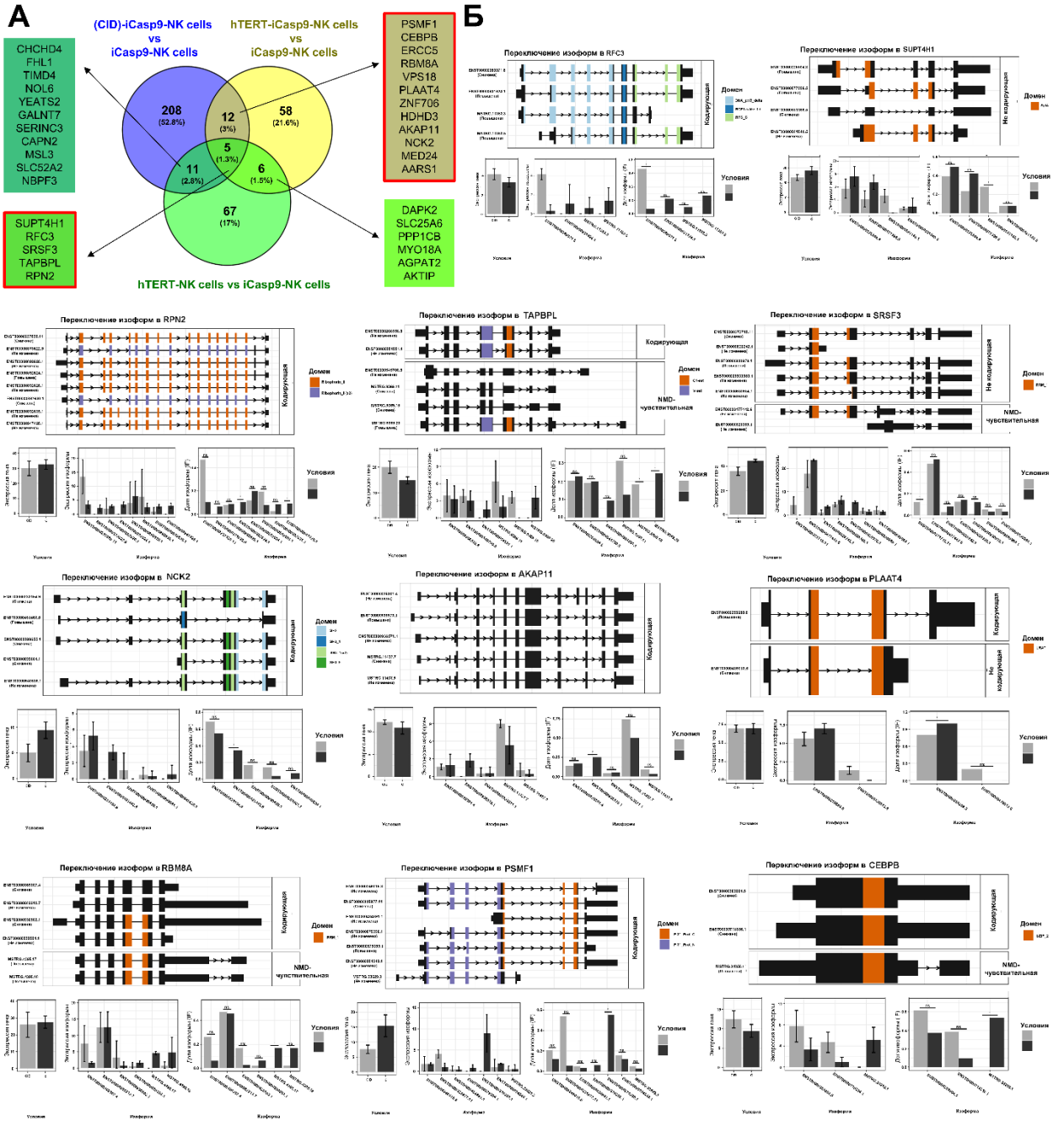


Рисунок 27. Альтернативно сплайсированные транскрипты были оценены в популяциях NK-клеток. “Резистентные” hTERT-iCasp9-NK-клетки, hTERT-оверэкспрессирующие hTERT-NK-клетки и “выжившие” (CID)-iCasp9-NK-клетки, которые подвергались инкубации со 100 нМ CID в течение 24 часов, сравнивали с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. А) Общие события сплайсинга были проанализированы с использованием диаграмм Виенна. Б) Представлены репрезентативные графики для генов, перечисленных в красных рамках на диаграмме Виенна. Верхние графики представляют наиболее распространённые изоформы, обнаруженные с некоторыми выделенными доменами. В нижней строке слева направо

показаны: экспрессия гена, экспрессия изоформы и использование изоформы. Серые полосы обозначают (CID)-iCasp9-NK-клетки и hTERT-iCasp9-NK-клетки, а черные полосы отражают iCasp9-NK-клетки. Анализ был выполнен на платформе Galaxy в соответствии с инструкцией

<https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/transcriptomics/tutorials/differential-isoform-expression/tutorial.html>.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Применение НК-клеток против злокачественных новообразований является развивающейся и перспективной областью иммунотерапии. НК-клетки обладают рядом преимуществ перед Т-клетками [93].

Истощение иммунных клеток и их низкая пролиферативная способность в течение нескольких недель после выделения остаются ключевыми препятствиями для терапии на основе НК-клеток. Дополнительные манипуляции, такие как ретровирусная генетическая модификация и интенсивная стимуляция пролиферации, могут усугублять эти проблемы, сокращая продолжительность жизни клеток и снижая их активационный потенциал. Получение достаточного количества НК-клеток для клинического применения связано с рядом трудностей. Например, при терапии злокачественных новообразований необходимо введение значительного числа модифицированных клеток (от $1 \times 10^6/\text{кг}$ до $9,3 \times 10^6/\text{кг}$) [238]. Однако их получение осложнено из-за низкого содержания НК-клеток в периферической крови и сравнительно низкого пролиферативного потенциала донорских НК-клеток *ex vivo*. Кроме того, эффективная трансдукция НК-клеток затруднена ввиду их врождённой устойчивости к вирусной трансдукции [244], что приводит к низкому проценту успешно модифицированных клеток по сравнению с Т-клетками, уже широко используемыми в терапии [101]. Процесс культивирования НК-клеток *in vitro* также занимает длительное время (около месяца), включая этапы предварительной стимуляции, трансдукции с последующим наращиванием уже модифицированных клеток [238], при этом длительная цитокиновая стимуляция может сама по себе вызывать истощение НК-клеток.

Для преодоления этих ограничений, в частности для восстановления пролиферативного потенциала и снижения клеточного истощения, мы трансдуцировали НК-клетки геном *hTERT*, кодирующим каталитическую субъединицу теломеразы [13,14]. Терапевтическое использование *hTERT*-модифицированных НК-клеток связано с потенциальными рисками безопасности, что требует введения специальных механизмов контроля над *hTERT*-НК-клетками. Конструкции, содержащие ген клеточного суицида, в настоящее время используются для контроля долгоживущих генетически модифицированных лимфоцитов. Одним из таких генетических конструкторов является суицидная система *iCasp9*, основанная на индуцируемой каспазе-9, уже показавшая многообещающие результаты в клинических исследованиях [245]. Применение индуцируемой каспазы-9 (*iCasp9*), которая активируется путём связывания с химическим индуктором димеризации (CID) [117], доказало свою эффективность в уничтожении CAR-

НК-клеток как в доклинических исследованиях *in vitro*, так и *in vivo* [246]. Поэтому в данной работе мы объединили два подхода: повышение пролиферативного потенциала и функциональной активности НК-клеток за счет сверхэкспрессии hTERT, сопряженное с обеспечением безопасности модифицированных НК-клеток путем введения гена индуцируемой каспазы-9 (iCasp9).

4.1 Оптимизация ретровирусной трансдукции

Ранние попытки трансдукции первичных НК-клеток были значительно менее эффективны по сравнению с трансдукцией других лимфоцитов, например, Т-клеток, и достижение высокой эффективности инфицирования считалось крайне сложной задачей [62,101,247,248]. Поэтому определение оптимального метода трансдукции НК-клеток для достижения максимальной эффективности модификации является важной областью исследований. Мы выявили требования и методы получения ретровирусных частиц с высоким титром и установили условия для достижения оптимальной эффективности трансдукции НК-клеток периферической крови человека. Как правило, в исследованиях описаны протоколы сбора вирусосодержащего супернатанта через 24 часа после трансфекции [249]. В нашей работе мы сравнили эффективность модификации клеток RD114-псевдотипированными вирусными частицами, собранными через 24ч, 48ч, 72ч и 96ч после проведения процедуры трансфекции (Рисунок 4А, Б). Мы наблюдали значительные изменения в соотношении GFP⁺ позитивных клеток в зависимости от времени сбора вируса (Рисунок 4А, Б). Наши результаты показали, что максимальный титр вирусных частиц может быть получен через 24ч после сбора вирусосодержащего супернатанта. Более позднее накопление вирусных частиц может быть связано с более медленной сборкой вирусных частиц с RD114 по сравнению с VSV-G. Это подтверждается недавним исследованием, описывающим изменения в скорости накопления SARS-CoV-2 в результате мутаций в белке оболочки [250]. Здесь мы показали, что наиболее эффективное время для сбора супернатанта вируса с псевдотипом RD114 составляет от 48 до 72 часов. Было замечено, что, несмотря на увеличение доли трансдуцированных клеток, среднее количество GFP на клетку статистически не увеличивалось независимо от времени сбора вирусного супернатанта (Рисунок 4Б). Таким образом, доля трансдуцированных клеток, но не количество копий трансгена в них, увеличивалась в зависимости от сроков сбора вируса.

В настоящее время широко используется общепринятая методика расчёта MOI (multiplicity of infection) путём тестирования стока вирусных частиц на клеточных линиях [221]. После полученные значения MOI используются для расчёта количества вируса для

оптимального инфицирования первичных NK-клеток. Зачастую, авторы указывают количество MOI без указания линии клеток, по которой производились расчёты MOI [222–225]. Однако результаты титрования вирусного супернатанта могут различаться в зависимости от различных клеточных линий (Рисунок 4, Таблицы 2 и 3).

Согласно нашим данным, несмотря на различное соотношение трансдуцированных клеток линий Raji и Jurkat, уровень экспрессии GFP на клетку оставался неизменным (Рисунок 4). Это может быть связано с различными уровнями поверхностной экспрессии переносчика аминокислот SLC1A5 [251,252], который определяет количество RD114-псевдотипированных вирусных частиц, которые могут связаться с клеткой и проникнуть в неё. Экспрессия SLC1A5 на свежесыводенных или кратковременноактивированных (6-24 часа) NK-клетках может варьировать во времени [253–255]. В большинстве исследований на длительно активированных NK-клетках также была зарегистрирована экспрессия мРНК *ASCT2* [223] или транслируемого с нее белка SLC1A5 [222]. Стоит отметить, что трансдукция является комплексным процессом, эффективность которого также определяется скоростью деления клеток и врождённой способностью NK-клеток защищаться от чужеродных нуклеиновых кислот [256].

Низкая скорость деления NK-клеток по сравнению с клетками Raji может обуславливать их сниженную восприимчивость к трансдукции, поскольку генетическая модификация ретровирусными частицами возможна только при отсутствии ядерной оболочки [257]. Например, исследование, проведённое Толгой Сутлу (Tolga Sutlu) и соавторами, продемонстрировало, что ингибирование противовирусного сигнального пути через TBK1/IKK α / β / ϵ с использованием неспецифического ингибитора PDK1, VX-795, приводит к повышению эффективности трансдукции NK-клеток [256]. Более поздняя работа показала, что блокирование противовирусной защиты NK-клеток усиливает эффективность заражения VSV-G-псевдотипированными вирусными частицами [258,259]. Таким образом, более низкие уровни трансдукции NK-клеток могут указывать на работу определённых противовирусных механизмов в первичных NK-клетках наряду со вкладом экспрессии SLC1A5 на поверхности клеток.

Далее, была исследована восприимчивость отдельных популяций NK-клеток к ретровирусной трансдукции. Использование NK-клеток, подобных адаптивным, в иммунотерапии также имеет определённые преимущества: NK-клетки NKG2C⁺, например, связаны с предотвращением РТПХ [260] и демонстрируют более высокие уровни антителозависимой цитотоксичности (ADCC) [261,262].; они способны не только уничтожать

злокачественные новообразования HLA-E⁺, но и обладают повышенной алло-реактивностью у реципиентов, несовместимых по HLA [226].

Субпопуляция NK-клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ характеризуется фенотипом, подобным клеткам памяти [263], но из-за низкого пролиферативного потенциала генетическая модификация этих клеток остаётся затрудненной. Подгруппа NK-клеток CD57⁺NKG2C⁺ часто встречается у людей, инфицированных hCMV, который вызывает экспансию и дифференцировку KIR2DL2/3(KIR)-экспрессирующих NK-клеток [226]. В то же время некоторые из NK-клеток CD57⁺NKG2C⁺ могут проявлять свойства адаптивности, при этом демонстрируя лучший пролиферативный потенциал [229]. Учитывая, что генетическая модификация NK-клеток CD57⁺ неэффективна [96], в этой работе мы решили исследовать эффективность ретровирусной трансдукции субпопуляций менее дифференцированных NK-клеток CD57⁻, которые предшествуют “memory-like” NK-клеткам [10].

Приобретение NK-клетками поверхностной экспрессии KIR связано с процессом, называемым “лицензированием”. На этой стадии созревания NK-клетки модулируют свою реакцию активации и повышают функциональную активность [264]. Чтобы изучить восприимчивость к ретровирусной NK-клеток на разных стаях созревания, мы разделили NK-клетки CD57⁻ на 4 субпопуляции, различные по уровню дифференцировки: KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻, KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺, KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻ и KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺.

В результате трансдукции было показано, что NK-клетки субпопуляции KIR2DL2/3⁺ по сравнению с субпопуляцией KIR2DL2/3⁻, характеризуются наибольшей восприимчивостью к ретровирусной модификации. В то время как уровень интенсивности флуоресценции GFP был значительно выше в субпопуляции клеток KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺ по сравнению с клетками KIR2DL2/3⁻NKG2C⁻ в каждом эксперименте (Рисунок 5). Предпочтительная трансдукция клеток KIR⁺ по сравнению с NK-клетками KIR⁻ может быть обусловлена более высоким уровнем экспрессии SLC1A5, именно, в подгруппе KIR⁺ [251], поскольку активированные “memory-like” NK-клетки обладают повышенной экспрессией рецептора SLC1A5 [254]. Увеличенная пролиферативная активность предшественников “memory-like” NK-клеток сопряжена с повышением их метаболизма, что поддерживает функциональную составляющую данных клеток. Кроме того, было показано, что NK-клетки, трансдуцированные ретровирусными частицами, демонстрировали повышенные уровни рецепторов KIR2DL2/DL3 и маркера активации HLA-DR на поверхности [10,13].

Для синтетической конструкции iCasp9 было проверено отсутствие часто наблюдаемой в клетках млекопитающих потери экспрессии трансгена после ретровирусной трансдукции [265]. В этой работе мы использовали конструкцию pMSCV-F-del Casp9.IRES.GFP, где трансген был окружён ретровирусными интегрантами с куриным бета-глобиновым хроматиновым изолятором [265]. Ранее было показано, что эта модификация повышала экспрессию трансгена в трансдуцированных клетках 293Т, но не оказывала существенного влияния при трансдукции первичных Т-клеток [209]. Мы не обнаружили никакого снижения доли модифицированных клеток GFP⁺ на протяжении всего эксперимента (Рисунок 6А). Однако спонтанная димеризация iCasp9, приводящая к непреднамеренной гибели клеток, может представлять ещё одну проблему для данной системы. Спонтанная димеризация ранее была описана для индуцируемых систем на основе Fas [266,267]. Однако, для iCasp9-модифицированных клеток, наоборот, были описаны длительная персистенция *in vivo* и низкий уровень спонтанной смертности [9], что согласуется с нашими наблюдениями (Рисунок 6А, Б). Тем не менее, во всех исследованных подгруппах НК-клеток было зарегистрировано снижение флуоресценции GFP модифицированных клеток в первые дни после процедуры трансдукции (Рисунок 6Б). Подобное снижение также может быть объяснено активной пролиферацией клеток в этот промежуток времени. Однако мы также не исключаем возможности спонтанной димеризации iCasp9, особенно в условиях её быстрого внутриклеточного накопления в первые дни после трансдукции.

4.2 Изучение развития истощения у hTERT-трансдуцированных НК-клеток

Так как известно, что гиперэкспрессия теломеразы способна в течение продолжительного времени поддерживать пролиферацию НК-клеток, а также их функциональное состояние, а именно, поверхностную экспрессию рецепторов NKp30, NKp44, NKp46 и NKG2D [14], мы провели оценку состояния hTERT-модифицированных клеток (hTERT-НК-клеток и hTERT-iCasp9-НК-клеток) и iCasp9-НК-клетками через месяц после выделения, что соответствует времени применения модифицированных НК-клетках в терапевтических целях. Согласно результатам анализа активности теломеразы и уровням экспрессии мРНК *hTERT*, мы достигли стабильной эктопической экспрессии трансгена *hTERT* в hTERT-модифицированных НК-клетках.

Было описано, что каталитическая субъединица теломеразы, кодируемая геном hTERT, выполняет различные функции [107,108]. Повышенная экспрессия hTERT характерна для раковых клеток, где она улучшает многие характеристики клеток, такие как

способность к пролиферации, выживаемость, снижение АФК и защищает митохондрии [268]. Было показано, что hTERT участвует в модуляции транскрипции генов-мишеней Wnt/b-катенина и NF-κB. Таким образом, мы попытались определить, как устойчивая оверэкспрессия hTERT может изменять характеристики NK-клеток на функциональном и транскрипционном уровнях: может ли оверэкспрессия hTERT усиливать врождённые свойства NK-клеток, такие как способность к пролиферации и функциональную активность. Мы изучили экспрессию транскрипционных факторов Eomes и T-Bet для NK-клеток, модифицированных генами *hTERT* и/или *iCASP9*. Доля фракции функционально и пролиферативно активных NK-клеток Eomes⁺T-Bet⁺, которая была доминирующей после выделения *ex vivo*, снизилась до >30% после месяца культивирования *in vitro* (Рисунок 12А). hTERT-модифицированные NK-клетки показали более высокий процент клеток Eomes⁺T-Bet⁺ (Рисунок 12Б), что соответствует предположению о том, что оверэкспрессия hTERT положительно влияет на функциональное состояние NK-клеток [14]. Eomes связан с hTERT по пути β-катенин/Wnt, что согласуется с улучшенной выживаемостью, созреванием и цитотоксичностью NK-клеток [269]. T-Bet участвует в регуляции клеточного цикла посредством mTORC [270,271]. В целом, увеличение экспрессии Eomes было характерно для iCasp9-модифицированных NK-клеток (iCasp9-NK-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клеток), а увеличение числа дважды положительных Eomes⁺T-Bet⁺ клеток наблюдалось для hTERT-модифицированных NK-клеток (hTERT-NK-клеток и hTERT-iCasp9-NK-клеток). Мы предположили, что наличие iCasp9 в клетках способствует сохранению клеток Eomes⁺T-Bet⁻, а hTERT поддерживает фракцию функционально активных дважды позитивных клеток. hTERT-iCasp9-NK-клетки, по-видимому, занимают промежуточное положение за счет вклада обоих трансгенов. hTERT-iCasp9-NK-клетки характеризуются значительно меньшей долей истощённых клеток Eomes⁻T-Bet⁻ по сравнению с нетрансдуцированными NK-клетками. Мы также отметили некоторое несоответствие между анализом экспрессии qPCR и данными FACS, отражающими внутриклеточное присутствие белков, которые могут быть вызваны различной кинетикой процессов транскрипции, трансляции и деградации.

Чтобы изучить эффекты hTERT на транскрипционном уровне, мы собрали NK-клетки у 25-летнего здорового добровольца, который был серопозитивен как по hCMV, так и по EBV. Как показано Дуровичем Durovic и соавторами., [272] именно у пациентов с hCMV⁺EBV⁺, как правило, с возрастом накапливается более высокий процент CD56^{neg} NK-клеток под давлением постоянной вирусной нагрузки. NK-клетки у людей с hCMV⁺EBV⁺, вероятно, истощаются. С другой стороны, эти NK-клетки содержат часть клеток, подобных

клеткам памяти, которые обладают повышенной цитотоксической активностью и выживаемостью [273].

4.3 Изучение пролиферативной активности модифицированных НК-клеток

Мы сравнили влияние цитокинов, IL-2 и комбинации IL-2 с IL-15, на пролиферацию НК-клеток через месяц после выделения *ex vivo*. IL-15 повышает продолжительность жизни, пролиферативный потенциал и противоопухолевую функцию НК-клеток и является важным дополнением в НК-клеточной терапии [274]. Передача сигналов от IL-15 приводит к повышению экспрессии генов-мишеней STAT5, включая различные факторы, способствующие выживанию, а именно Mcl-1, потеря которого запускает апоптоз в НК-клетках [274]. Чтобы исследовать потенциальное влияние оверэкспрессии hTERT на выживаемость и пролиферативную способность НК-клеток, мы наблюдали за культивированием НК-клеток в среде, содержащей IL-2 или (IL-2 + IL-15), со второго месяца до 3,5 месяцев после выделения. Мы ожидали увидеть улучшение показателей пролиферации и выживаемости, как это было описано Стрельцовой и соавторами [13] и Fujisaki et. al. [14]. Однако наши данные показали, что НК-клетки, как немодифицированные, так и модифицированные одним из трансгенов (*hTERT* или *iCASP9*), с постепенно элиминируются под постоянной стимуляцией IL-15 в комбинации с IL-2 (Рисунок 9Б, В). Согласно полученным данным, показатели пролиферации hTERT-НК-клеток, стимулированных цитокинами IL-2 или IL-2+IL-15, в течение второго месяца после выделения существенно не отличаются от соответствующих показателей iCasp9-НК-клеток (Рисунок 7Б). Сравнимая скорость пролиферации hTERT-НК-клеток и iCasp9-НК-клеток может быть обусловлена повышенной активностью теломеразы, вызванной стимуляцией IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-mbIL21 перед ретровирусной трансдукцией, поскольку ретровирусные частицы не способны интегрироваться в геном неделящихся клеток [11]. Это предположение согласуется с данными об активности теломеразы (Рисунок 7В), поскольку активность обратной транскриптазы теломеразы была обнаружена в iCasp9-НК-клетках через месяц после выделения клеток. Это наблюдение согласуется с выводами Денмана С. Дж. и соавторов Denman C. J. et al. [97], которые показали повышенную активность теломеразы в НК-клетках, стимулированных комбинацией IL-2 (100 ед./мл) и фидерных клеток K562-mbIL21.

Интересно, что только hTERT-iCasp9-НК-клетки выживали в течение месяца культивирования и сохраняли пролиферацию как в среде с IL-2, так и в условиях комбинации IL-2 с IL-15 по сравнению с iCasp9-НК-клетками. Результаты показывают, что

спонтанная димеризация *iCasp9*, вероятно, способствует отбору НК-клеток с балансом про- и противоапоптотических факторов, смещённых в сторону выживания НК-клеток. В то время как оверэкспрессия *hTERT* неканоничными путями может способствовать ускользанию от клеточной гибели, вызванной димеризацией *iCasp9*, в *hTERT-iCasp9*-НК-клетках [107,208,275–277], что было аналогично описано для *Bcl-2* трансгенных мышей при депривации *IL-15* [274]. В то же время, более высокий уровень *hTERT* в *hTERT*-НК-клетках по сравнению с *hTERT-iCasp9*-НК-клетками, по-видимому, не способен улучшить выживаемость в такой степени, как это было показано для *hTERT-iCasp9*-НК-клеток, поэтому влияние трансгена *iCASP9*, по-видимому, существенно изменяет выживаемость НК-клеток. Повышенная выживаемость при воздействии всех типов стимулов, использованных в исследовании, наблюдалась у *hTERT-iCasp9*-НК-клеток (Рисунок 9Г), в то время как продолжительность жизни *iCasp9*-НК-клеток была ограниченной. Их численность быстро снижалась после 4 недель стимуляции (через 2 месяца после выделения *ex vivo*). Это соответствует данным экспрессии генов, полученным через 2 месяца после выделения НК-клеток методом qPCR: уровни про-апоптотических факторов, кодируемых генами *BAK1*, *BAX* и *DIABLO* положительно коррелировали с экспрессией *iCASP9* в *iCasp9*-НК-клетках (Рисунок 13). Аналогичное снижение количества живых клеток наблюдали для *hTERT*-НК-клеток, несмотря на ожидаемую роль трансгена *hTERT* в поддержании выживаемости (Рисунок 9Б, В).

Сообщалось [57], что регуляция чувствительности НК-клеток к *IL-15* сложна и в значительной степени зависит от правильного баланса между экспрессией *Eomes* и *T-Bet*. Как *Eomes*-, так и *T-Bet*-дефицитные НК-клетки характеризуются снижением жизнеспособности при стимуляции *IL-15*. Другое объяснение сокращения количеств НК-клеток после 2 месяцев культивирования может быть вызвано активацией *Cis*, кодируемого геном *CISH*, который подавляет ответы *IL-15* путём связывания с *IL-15R* и ингибирования киназы *Jak1* [66,274]. Ранее мы упоминали, что *hTERT-iCasp9*-НК-клетки сочетают в себе черты как *hTERT*-НК-клеток, так и *iCasp9*-НК-клеток (Рисунок 12Б), что позволяет предположить тонкую настройку функций *Eomes* и *T-Bet* с точки зрения регуляции выживаемости НК-клеток. Экспрессия рецепторов цитокинов (*IL-15R* и *IL-2R*) и одновременный вклад обоих трансгенов, могут способствовать выживаемости *hTERT-iCasp9*-НК-клеток в течение продолжительного времени при постоянной цитокиновой поддержке. Интересно, что сокращение продолжительности жизни культур *iCasp9*-НК-клеток также было связано с наименьшим уровнем экспрессии *hTERT* (Рисунок 7А),

возможно, из-за токсичности, вызванной спонтанной димеризацией суицидальной конструкции iCasp9 [118].

hTERT-NK-клетки и hTERT-iCasp9-NK-клетки также характеризовались повышенной экспрессией генов, связанных с прохождением клеточного цикла, что согласуется с данными пролиферативных тестов нами ранее [13,99,278] и в работах С. Denman [97] и Н. Fujiiisaki [14], где показана связь выживаемости клеток и пролиферации и теломеразной активности [279]. Интересно, что оверэкспрессия *hTERT*, по-видимому, положительно модулирует экспрессию огромного числа генов клеточного цикла (Рисунок 11). Гены *E2F1*, *CDKN1A*, *CCNA2*, *TICRR*, *MCM3*, *PCNA*, *CDK1*, *CCNB1*, *PLK1*, *NDC80*, *CDC20*, *ESPL1*, *SMC3*, *RAD21*, *AURKB*, *CDCA5*, которые в основном способствуют прогрессированию клеточного цикла на всех стадиях, были активированы, тогда как ген *PPP2R5A*, который ингибирует деление клеток, и ген *ATRX*, белок которого участвует в ремоделировании хроматина с помощью гистонового варианта H3.3, были снижены. Мы заметили повышенную экспрессию гена фактора транскрипции *E2F1*. Это согласуется с результатами работы Дробышева и соавт. (Drobyshev et al.) [280], который сообщил о положительной корреляции между экспрессией *TERT* и *E2F1* и экспрессией генов *CCNA2*, *TICRR*, *MCM3*, *PCNA*, *CDK1*, *CCNB1*, *PLK1*, *NDC80*, *CDC20*, *ESPL1*, *RAD21*, *AURKB*, *CDCA5*, *MKI67* в раковых клетках hTERT⁺. Согласно литературным данным, транскрипционный фактор E2F1 известен своей положительной регуляцией генов, стимулирующих клеточный цикл (*CCNA2*, *TICRR*, *CDK1*, *PLK1*, *MCM3*, *PCNA*, *NDC80*, *AURKB*, *CDC20*, *SMC3*, *RAD21*). Продукты генов *CCNA2*, *CDK1* участвуют в переходе от фазы G2 к фазе M. Продукты генов *TICRR*, *MCM3*, *PCNA* участвуют в репликации. Продукты генов *PLK1*, *NDC80*, *AURKB*, *CDC20* участвуют в митозе. Продукты генов *SMC3* и *RAD21* образуют комплекс когезина [281,282]. Однако ген *CDKN1A*, кодирующий белок p21, и гены *CCNB1*, *ESPL1*, *CDCA5*, *ATRX*, *PPP2R5A*, по-видимому, регулируются независимо от фактора транскрипции E2F1. Было показано, что hTERT снижает клеточный стресс, а именно уменьшает степень повреждения ДНК из-за роли hTERT в удлинении теломер [283].

Среди генов, регулирующих клеточный цикл, мы идентифицировали гены *CDKN1A*, *CCNB1*, *CDCA5*, *PPP2R5A*, на которые непосредственно воздействует белок p53, являющийся основным сенсором стресса клеток. Связывание p53 с промоторными участками *CDKN1A* активирует экспрессию белка p21, который, в свою очередь, снижает активность нескольких циклинкиназ и вызывает опосредованное белком ретинобластомы pRb снижение экспрессии генов, стимулирующих клеточный цикл, и остановку клеточного

цикла [231,284]. Продукты работы генов *CCNB1* и *CDC45* стимулируют клеточный цикл. *CCNB1* кодирует циклин В1, который в комплексе с Cdk1 участвует в продвижении ранних стадий митоза. *CDC45* кодирует сорорин, который участвует в связывании сестринских хроматид и регулирует удаление когезина из хроматина [285]. В hTERT-NK-клетках наблюдали снижение экспрессии гена *PPP2R5A*. Ген *PPP2R5A* кодирует протеинфосфатазу 2, регуляторную субъединицу В (В56), альфа-изоформу 5R. *PPP2R5A* относится к Ser/Thr фосфатазам и участвует в негативной регуляции роста и деления клеток [286]. Таким образом, мы обнаружили повышение уровня транскриптов *CDKN1A* и понижение уровня транскриптов *PPP2R5A*, которые кодируют белки, ответственные за ингибирование прохождения клеточного цикла. Возможно, участие других путей может влиять как на уровень экспрессии, так и на функциональное состояние этих белков, поскольку, например, путь PI3/Akt также модулирует как *PPP2R5A*, так и *CDKN1A* [287].

Другой ген, *ATRX*, который отвечает за ремоделирование хроматина и старение клеток, был подавлен. *ATRX* депонирует вариант гистона H3.3 в основном в теломерных областях и других геномных повторах, чтобы заглушить эти участки. Показано, что гистоновый вариант H3.3 накапливается с возрастом. *ATRX* также может модулировать факультативный гетерохроматин. *ATRX* необходим для репликации ДНК и может локализоваться в местах повреждения ДНК. В совокупности *ATRX* способствует переходу покоящихся клеток в состояние старения [288,289], а его подавление свидетельствует о том, что hTERT-NK-клетки не истощены в плане пролиферации и не проявляют признаков истощения. Кроме того, JiaYu Liu и соавт. [290] предположили, что экспрессия *ATRX* и *TERT* является взаимоисключающей из-за функциональной избыточности кодируемых белков, поэтому избыточная экспрессия *hTERT* в нашей работе может снижать экспрессию *ATRX* таким образом. Мы также обнаружили повышенную экспрессию Ki-67 (гена *MKI67*), который является клеточным маркером пролиферации [291]. В целом, оверэкспрессия *hTERT* повышает скорость пролиферации NK-клеток, что может быть полезно для обеспечения длительного иммунного надзора у пациентов.

Самая высокая доля живых клеток наряду с высокой интенсивностью пролиферации наблюдалась в трансдуцированных NK-клетках, стимулированных IL-2+K562-mbIL21 (Рисунок 9). Однако популяции нетрансдуцированных и iCasp9-NK-клеток быстро сократились через 3 месяца после выделения *ex vivo* (Рисунок 9Б, В). Чтобы изучить условия, обуславливающие низкий ответ культур NK-клеток на третью стимуляцию фидерными клетками K562-mbIL21, мы исследовали соотношение субпопуляций EOMES^{+/-} и T-BET^{+/-} через 2 месяца после выделения *ex vivo*. Как показано на рисунке 12А,

НК-клетки EOMES⁺T-BET⁺ были в значительной мере представлены во всех исследованных популяциях. Более того, повышение уровней Cis наблюдалось при длительной активации STAT5, вызванной IL-2 или IL-15 [66,118,274], и приводила к отбору клеток, менее подверженных апоптозу, что соответствовало данным qPCR в “группе I” (НК-клетки IFN- γ ⁺>50% и LAMP-1 MFI<5) и “группе II” (НК-клетки IFN- γ ⁺<50% и LAMP-1 MFI>5) (Рисунок 19). НК-клетки с повышенной экспрессией T-Bet характеризовались более высокими уровнями проапоптотических факторов, таких как DIABLO и Bad, тогда как более низкая экспрессия T-Bet была связана с более высокими уровнями экспрессии факторов, способствующих выживанию, Bcl-2, Mcl-1 и BIRC-5. Эти данные показывают, что, поскольку iCasp9 может спонтанно димеризоваться и запускать апоптоз. iCasp9-НК-клетки и hTERT-iCasp9-НК-клетки должны поддерживать уровни Eomes, чтобы выжить, поскольку этот фактор транскрипции индуцирует экспрессию многих генов, обеспечивающих сигналы выживания (таких как некоторые рецепторы НК-клеток) [57,269].

Затем мы исследовали функциональную активность hTERT-НК-клеток через месяц после выделения клеток. Как и ожидалось, hTERT способствовал сохранению функциональных характеристик hTERT-НК-клеток во времени благодаря своим неканоническим функциям [108]. hTERT-НК-клетки характеризовались активированным состоянием, наряду с более высокой экспрессией CD69 по сравнению с iCasp9-НК-клетками. То же самое наблюдалось группой Хироюки Фудзисаки и соавторов (Hiroyuki Fujisaki et al.) [14], которые продемонстрировали экспрессию CD69 на поверхности иммортализованных hTERT-НК-клеток.

Через месяц после выделения, когда модифицированные НК-клетки потенциально готовы для применения в терапевтических целях, мы провели оценку функционального состояния hTERT-модифицированных клеток (hTERT-НК-клеток и hTERT-iCasp9-НК-клеток) в сравнении с iCasp9-НК-клетками. hTERT-iCasp9-НК-клетки характеризовались усилением цитокин-индуцированной продукции IFN- γ в сравнении с hTERT-НК-клетками, тогда как транскриптомный анализ показал одновременное повышение экспрессии гена *IFNG* в обеих hTERT-оверэкспрессирующих популяциях в сравнении с iCasp9-НК-клетками (Рисунок 15, 16). Такое расхождение экспериментальных результатов и функционального теста может быть объяснено, в первую очередь, способом измерения: на уровне транскриптов методом РНК-секвенирования и на белковом уровне в функциональном тесте. Повышение уровня мРНК *IFNG* (зарегистрированное при исследовании транскрипта) не всегда коррелирует с количеством белка, выбрасываемого

клеткой при краткосрочной цитокиновой стимуляции. Обнаруженное повышение *IRF4* объясняет рост экспрессии транскриптов *IFNG*, поскольку *IRF4* регулирует этот ген, однако итоговый уровень секреции *IFN-γ* зависит от дополнительных сигналов и рецепторной чувствительности. В то же время, стоит отметить, что *IRF4* может действовать как активатор, так и как репрессор [292,293]. Интересно, что *IRF4* сильно экспрессирован в предшественниках NK-клеток, но практически отсутствует в незрелых и зрелых NK-клетках, что свидетельствует о предотвращении в hTERT-оверэкспрессирующих NK-клетках истощения [294]. Более того, мы отмечаем тенденцию к повышению уровней транскриптов *IL2RA*, кодирующих альфа-цепь рецептора интерлейкина-2, что повышает чувствительность клеток к низким дозам IL-2, а также тенденцию к понижению *IL12RB*, кодирующего бета-2 субъединицу рецептора интерлейкина-12, и *IL2RB*, кодирующих бета-цепь рецептора интерлейкина-2. При этом, тенденция к наибольшему снижению *IL2RB* была отмечена в hTERT-NK-клетках, что может объяснять меньший уровень продукции *IFN-γ* под стимуляцией цитокинами IL-2, IL-12, IL-18 [87,295].

Для hTERT-модифицированных NK-клеток было показано значимое повышение транскриптов цитокинов *CSF1*, *TNFSF4*, *LIF* и снижение уровня мРНК *CSF2RB*, кодирующего субъединицу нескольких цитокиновых рецепторов к IL-3, IL-5 и GM-CSF [296]. Повышение уровня транскриптов *CSF1* и *TNFSF4* указывает на то, что модифицированные NK-клетки могут влиять на другие клетки иммунной системы. *CSF1* в норме образуется NK-клетками в малых количествах или не экспрессируется вовсе [297]. Его рецептор - *CSF1R* - высоко экспрессируется в миелоидных клетках, способствует выживанию, пролиферации и дифференцировке многих типов миелоидных клеток *in vivo* и *in vitro*. Количество NK-клеток уменьшалось при ингибировании *CSF1R*, из-за снижения уровня IL-15, который является важным фактором для выживаемости Т-клеток и NK-клеток [298]. *TNFSF4* принадлежит к семейству лигандов фактора некроза опухоли и участвует в Т-клеточных взаимодействиях, стимуляции пролиферации и выработке цитокинов Т-клетками [299]. *LIF* участвует в защите эпителиальных клеток от бактериальных инфекций [300]. Появление экспрессии *LIF* сближает модифицированные NK-клетки с фенотипом врождённых лимфоидных клеток 3-го типа (ILC3), в частности, с популяцией мукозальных клеток NK-22 [300]. В ряде работ показана прямая связь *CSF1* [301] и *TNFSF4* [299] с худшими прогнозами в терапии злокачественных новообразований, тогда как блокада передачи сигналов от этих цитокинов восстанавливала терапевтический ответ. Таким образом, изменения в экспрессии генов перепрограммируют NK-клетки в сторону усиления их иммунорегуляторной функции (воздействие на миелоидные и Т-клетки) и

тканепротективных свойств, но также эти изменения могут нести потенциальные онкологические риски, связанные с формированием иммуносупрессивного микроокружения.

hTERT-NK-клетки показали наибольший уровень дегрануляции против K562. При этом, наличие тенденции повышения базовой дегрануляции в популяции hTERT-iCasp9-NK-клеток согласуется с тенденциями к повышению уровней мРНК *GZMB* и *PRF1* в сравнении с iCasp9-NK-клетками [43].

Рецепторы хемокинов, участвующие в миграции NK-клеток к очагу воспаления, CCR2, CCR5, CXCR3 и CX3CR1, играют ключевую роль в инфильтрации NK-клеток в опухолевый сайт [302]. Среди хемокиновых рецепторов уровень транскриптов *CX3CR1* и *CCR2* был значимо снижен в группах с оверэкспрессией теломеразы, hTERT-NK-клетках и hTERT-iCasp9-NK-клетках, в сравнении с iCasp9-NK-клетками. CX3CR1 вместе с другими рецепторами хемокинов в стабильном состоянии регулирует локализацию NK-клеток в периферических тканях, а также их миграцию в условиях воспаления, поэтому его подавление имеет важные последствия для функционирования NK-клеток. Также экспрессия CX3CR1 и CXCR4 определяет миграцию NK-клеток в костный мозг и их выход из него [303]. Mary J. G. van Helden et al. на мышинной модели показали необходимость CCR2 для миграции NK-клеток при заражении вирусом гриппа и других инфекциях [304]. Также сигналинг через CCR2 опосредует проникновение NK-клеток в опухолевые сайты [305]. Таким образом, миграционный потенциал NK-клеток с оверэкспрессией теломеразы может быть снижен в отсутствие дополнительной стимуляции. Тем не менее, мы наблюдали тенденцию повышения уровней транскриптов рецепторов CXCR4, CXCR6 и молекулы клеточной адгезии ITGAL. Снижение экспрессии CXCR4 способствует высвобождению NK-клеток из костного мозга, тогда как стимуляция экспрессии CXCR4 в NK-клетках может улучшить их проникновение в костный мозг и другие ткани негематопоезического происхождения (головной мозг, легкие, печень, строму, эндотелий) [306,307], что может быть полезно при терапии некоторых типов злокачественных новообразований. NK-клетки, несущие хемокиновый рецептор CXCR6, были идентифицированы как фенотипически незрелые клетки, обнаруживаемые в тканях мышей и человека. Небольшая часть NK-клеток периферической крови экспрессирует CXCR6. Хотя, как CD56^{lo}, так и CD56^{hi} NK-клетки периферической крови экспрессируют CXCR6, более высокое содержание CXCR6⁺ NK-клеток приходится на субпопуляцию CD56^{hi}. Фенотип этой небольшой доли CXCR6⁺ NK-клеток поразительно похож на NK-клетки, обнаруженные во вторичных лимфоидных органах (CD56^{hi}, CXCR6⁺ CD16^{lo}, CD69⁺ Eomes⁺) [308]. Таким образом, оверэкспрессия

hTERT перестраивает функциональный профиль NK-клеток, усиливая их цитотоксический потенциал и пролиферативную активность. Одновременно изменяется предпочтительная тканевая локализация NK-клеток с гиперэкспрессией hTERT: снижается способность к миграции сигналам от CCR2, CX3CR1 и повышается чувствительность к сигналингу от CXCR4, CXCR6. Также отмечена тенденция к повышению уровня экспрессии мРНК хемокинов XCL2, XCL1 и CCL4. Рекрутирование определенных популяций иммунных клеток в опухолевое микроокружение может повышать эффективность терапии. XCL2, например, рекрутирует многие иммунные клетки при раке, в частности, положительно коррелирует с макрофагами M1 и CD8-T-клетками [309]. Концентрации XCL1 также позитивно коррелируют с общей выживаемостью при остром лимфобластном лейкозе [310]. CCL4 может усиливать противоопухолевый иммунитет, привлекая цитолитические лимфоциты и макрофаги, обладающие фагоцитарной способностью [311]. Это перераспределение миграционного потенциала в сочетании с усиленной продукцией иммунорекрутирующих хемокинов (XCL1, XCL2, CCL4) может перенаправить такие клетки в определенные тканевые ниши (костный мозг, строма, некоторые паренхиматозные органы) и способствовать формированию местного противоопухолевого иммунитета. Таким образом, NK-клетки с гиперэкспрессией теломеразы могут характеризоваться уникальным хемокиновым профилем, который может опосредовать привлечение различных иммунных клеток в опухолевый очаг.

Отмеченные выше изменения в стимуляции клеточного цикла и изменения миграционного потенциала согласуются с повышением экспрессии *SGK1* - киназы 1, регулируемой сывороткой/глюкокортикоидами. Данная киназа координирует множество внутриклеточных путей, к которым относятся регуляция клеточного цикла, аутофагия, выживаемость клеток и их миграционный потенциал. SGK1 часто экспрессирована при злокачественных трансформациях клеток [312], что может подтверждать связь с теломеразой.

В целом, клетки с гиперэкспрессией теломеразы (hTERT-NK-клетки и hTERT-iCasp9-NK-клетки) обладают рядом свойств, благоприятных для терапевтического применения hTERT-iCasp9-NK-клеток. Во-первых, мы отметили повышение генов, ассоциированных с прохождением клеточного цикла. Во-вторых, hTERT-модифицированные клетки характеризовались накоплением транскриптов *IFNG*, *GZMB*, *PRF1*, напрямую обеспечивающих функциональную активность клеток. В-третьих, профиль экспрессируемых хемокиновых рецепторов, вероятно, способствует локализации NK-

клеток с гиперэкспрессией hTERT в костном мозге, а также в тканях и вторичных лимфоидных органах.

Гиперэкспрессия hTERT определяет в НК-клетках уникальный спектр эффекторных функций: усиленный цитотоксический потенциал и повышенная способность к иммунорекрутированию, которые сочетаются с измененными предпочтениями к интратканевой локализации (снижением миграции по одним сигналам и повышением по другим) и измененной чувствительностью к цитокиновой стимуляции. Такой фенотип открывает новые перспективы для терапии, позволяя НК-клеткам лучше проникать в определенные ткани (костный мозг, легкие, печень, строму) и создавать там терапевтически благоприятное микроокружение за счет секреции хемокинов. Однако подобный фенотип несет потенциальные риски, связанные с поддержанием иммуносупрессивного микроокружения (через CSF1 и TNFSF4), что также требует внимания при разработке терапевтических стратегий с применением hTERT-гиперэкспрессирующих клеток. Полученные данные подчеркивают, что модификация геном *hTERT* не просто увеличивает жизнеспособность клеток, а качественно изменяет их функциональные свойства.

4.3 Изучение эффективности направленной элиминации конструкцией iCasp9

Устойчивость модифицированных клеток к индукции клеточной гибели при добавлении CID является ещё одной проблемой для суицидальной системы, основанной на iCasp9. Активация противоапоптотических генов приводит к увеличению выживаемости модифицированных клеток. Такое подавление индукции клеточной гибели в клетках, модифицированных конструкциями, несущими гены клеточного самоубийства, уже наблюдалось в аналогичных системах, направленных на различные элементы путей клеточной гибели, в том числе Fas-опосредованный путь запуска апоптоза [313]. По сравнению с другими белками апоптотического каскада, активация каспазы-9 происходит на более поздних стадиях, и поэтому ожидается, что она не подвергается ингибированию антиапоптотическими регуляторами, такими как c-FLIP и белками семейства BCL-2 [10,209].

Мы обнаружили, что после 24-часовой инкубации со 100 нМ CID всё ещё остаётся часть (около 20%) iCasp9-НК-клеток без признаков индукции апоптоза. В более ранней работе было показано, что 30-минутной инкубации с 10 нМ CID было достаточно для активации iCasp9 во всех iCasp9-НК-92-клетках, а доля живых iCasp9-НК-92-клеток снизилась до 2% после 26-часовой инкубации с CID [118]. Неполная элиминация была описана как для iCasp9-модифицированных клеточных линий, таких как Karpas 299 [210] и

для iCasp9-HSPC, и, вероятно, была связана с повышенной экспрессией антиапоптотических факторов, в частности Bcl-2 [210]. Несмотря на то, что Bcl-2 находится выше по пути сигналинга и регулирует апоптоз на уровне митохондрий, Bcl-2 косвенно влияет на активность ингибиторов каспазы, таких как IAP (ингибиторы белков апоптоза), а следовательно, и на сами каспазы [314]. Кроме того, НК-клетки, прошедшие “лицензионную” стадию дифференцировки, приобретают более высокую устойчивость к клеточной гибели благодаря повышенной экспрессии антиапоптотических белков семейства BCL-2 (Bcl-2 и Bcl-X_L). Было показано, что CD57⁺ НК-клетки, экспрессирующие ингибиторные KIRs и NKG2A/C, выживают лучше, чем клетки, у которых отсутствуют эти поверхностные молекулы [214]. Кроме того, экспрессия белков семейства BCL-2, которая увеличивается при передаче сигналов от общей γ -цепи IL-рецепторов (IL-2R, IL-15R, IL-21R) опосредует дифференцировку и выживание более зрелых НК-клеток [315]. Таким образом, мы предполагаем, что повышенная выживаемость iCasp9-НК-клеток в подгруппе KIR⁺NKG2C⁺ может быть связана с повышенным уровнем экспрессии Bcl-2 в этих клетках, что, в свою очередь, соответствует более высокой поверхностной экспрессии CD57 в трансдуцированных клетках. В то время как НК-клетки CD57⁺ характеризуются как более дифференцированные клетки с низким пролиферативным потенциалом [227], что также указывает на возможную связь между повышенной устойчивостью к гибели и накоплением Bcl-2 среди более дифференцированных покоящихся НК-клеток [315]. С другой стороны, низкий уровень экспрессии трансгена iCasp9 может быть недостаточным для индукции апоптоза во всех iCasp9-клетках при добавлении CID. Однако сообщалось, что клетки после сортировки по экспрессии репортерного гена увеличивали свою восприимчивость к CID на 99% [209].

Несмотря на удобство НК-клеток с точки зрения клеточной терапии рака, все ещё существует ряд ограничений, касающихся накопления достаточного количества клеток без потери функциональных характеристик. В предыдущей работе мы сосредоточились на общих подходах: повышение выживаемости НК-клеток путём индукции оверэкспрессии hTERT. Мы также попытались обеспечить надлежащий контроль “суицидального переключения”, используя конструкцию iCasp9, но заметили, что iCasp9-модифицированные НК-клетки со оверэкспрессией hTERT проявляют устойчивость к индукции апоптоза после добавления CID. Таким образом, мы провели исследование того, как активация hTERT может противодействовать индукции клеточной гибели на поздних стадиях апоптотического пути. Поскольку иммунотерапевтические НК-клетки обычно активируются фидерными клетками, например, K562-mbIL21, которые повышают уровни

hTERT и каталитическую активность в НК-клетках. Высокие уровни hTERT могут влиять на эффективность суицидальной конструкции и снижать безопасность иммунотерапевтических iCasp9-НК-клеток. В этой работе мы сосредоточились на общих подходах: изучить эффективность суицидальной конструкции iCasp9 с точки зрения гиперэкспрессии hTERT в НК-клетках и выявить возможные неканонические функции hTERT в регуляции клеточной гибели. Подход, основанный на комбинации генов *hTERT* и *iCASP9*, позволяет повысить выживаемость НК-клеток и обеспечить надлежащий контроль для будущего терапевтического применения этих клеток. Поэтому мы стремились доставить трансгены *hTERT* и *iCASP9* в первичные НК-клетки. Чтобы проверить эффективность конструкции iCasp9, мы индуцировали апоптоз в клетках, модифицированных iCasp9, путём 24-часовой инкубации с 10 нМ и 100 нМ CID, поскольку 10 нМ CID достаточно для инициации гибели клеток в iCasp9-клетках согласно Cecilia N. Varese [210]. Мы наблюдали неполную элиминацию iCasp9-НК-клеток, особенно низкая эффективность iCasp9-суицидальной конструкции была отмечена в клетках, гиперэкспрессирующих hTERT, включая DN-hTERT-модифицированные НК-клетки. Ранее неполная элиминация iCasp9-HeLa-клеток также наблюдалась Yuan Yuan et.al [316], что совпадает с нашими результатами. Мы также отмечали наличие корреляции между исходным уровнем iCasp9 в клетках iCasp9-Raji и долей мёртвых клеток после инкубации с CID (Рисунок 20), что совпадает с данными, представленными Karin C. Straathof и соавторами [209]. Однако уровень CID-ответа в hTERT-iCasp9-НК-клетках был снижен по сравнению с iCasp9-НК-клетками несмотря на то, что уровни экспрессии трансгена *iCASP9* в iCasp9-НК-клетках были понижены относительно hTERT-iCasp9-НК-клеток [278]. Принимая во внимание возможную роль hTERT или DN-hTERT в ингибировании индукции апоптоза, опосредованного iCasp9, мы предположили, что hTERT может модулировать выживаемость НК-клеток способами, отличными от канонического удлинения теломер [108,109,144,205,240,276,278].

Чтобы выяснить причины частичной устойчивости hTERT-iCasp9-клеток к апоптозу, мы провели исследование ассоциации экспрессии генов различных про- и противоапоптотических факторов в клетках, трансдуцированных генами *iCASP9* и/или hTERT. Поскольку баланс между жизнью и смертью зависит от различных внешних факторов, которые могут колебаться в зависимости от условий окружающей среды, доступности питательных веществ, температуры, pH среды и межклеточных сигналов, нам удалось проследить корреляции только между уровнями экспрессии изучаемых генов. Антиапоптотические транскрипты *BCL2* и *MCL1*, и проапоптотические транскрипты *BAX*

во всех группах НК-клеток (нетрансдуцированных, hTERT, hTERT-iCasp9 и iCasp9) были сгруппированы вместе, что, согласно литературным данным, может быть опосредовано передачей сигналов от цитокиновых рецепторов [89,315].

Мы отметили, что в (hTERT)-iCasp9-НК-клетках *hTERT* положительно коррелирует с *BCL2L1* (Bcl-X_L), *BIRC5* (сурвивин) и *EOMES*. *iCASP9*, в свою очередь, положительно коррелировал с *BAX*, *BAD* и *DIABLO*. Согласно литературным данным, *DIABLO* напрямую связан с сигнализацией p53 и вместе с Bad участвует в клеточных реакциях на стресс [317,318]. Таким образом, наши данные свидетельствуют о повышенном уровне клеточного стресса в группах hTERT-iCasp9-НК-клеток и iCasp9-НК-клеток, в отличие от групп нетрансдуцированных клеток и hTERT-НК-клеток.

Гены *BIRC5* и *BIRC3* кодируют белки, которые являются членами семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP) [211,319]. Эти белки действуют противоапоптотически, блокируя действие каспазы. В отличие от Yuan Yuan et.al. и Varese C et.al. [210,316], нам не удалось зафиксировать каких-либо существенных изменений в уровнях экспрессии *BIRC4* (XIAP) и *BIRC5* (сурвивин) с помощью RNAseq (*BIRC4* и *BIRC5*) и qPCR-анализа (только *BIRC5*), но наши данные показали изменение уровней экспрессии *BIRC3* в НК-клетках, резистентных и выживших после инкубации с CID, что также согласуется с повышением уровней мРНК *BIRC3* (с-IAP2) в hTERT-модифицированных клетках (hTERT-НК-клетках и hTERT-iCasp9-НК-клетках). Поскольку ген *BIRC3* относится к генам, чувствительным к NFκB/Rel, его активация может быть стимулирована путём активации пути NFκB, способствующего выживанию [320]. Поскольку с-IAP2 может напрямую ингибировать активность каспазы-9 наряду с нижестоящими каспазами-3 и каспазой-7 [211], мы решили снизить уровень *BIRC3* методом РНК-интерференции с помощью конструкции *shBIRC3* в сочетании с ретровирусными векторами, несущими *iCASP9*, *hTERT-iCASP9*, *DN-hTERT-iCASP9*. К сожалению, конструкция *shBIRC3* существенно не улучшала ответ на димеризатор для hTERT/DN-hTERT-iCasp9-shBIRC3-НК-клеток по сравнению с hTERT/DN-hTERT-iCasp9-НК-клетками, поэтому мы не стали продолжать увеличивать количество повторов эксперимента с использованием данного подхода. Таким образом, НК-клетки со оверэкспрессией hTERT или DN-hTERT проявляли устойчивость к индукции апоптоза на последних этапах апоптотического пути, который, по-видимому, регулируется не только уровнями экспрессии *BIRC3*. Принимая во внимание, что как hTERT, так и DN-hTERT, оверэкспрессирующие НК-клетки, слабо реагировали на действие CID, вероятно, неканонические (независимые от функции удлинения теломер) функции теломеразы участвуют в регуляции данного процесса.

В соответствии со способностью hTERT модулировать активность транскрипции [182,321] мы провели анализ RNAseq для hTERT-iCasp9-NK-клеток (клеток, “резистентных” к действию CID), (CID)-iCasp9-NK-клеток (клеток, “выживших” после добавления CID) и iCasp9-NK-клеток (клеток, “чувствительных” к действию CID). В клетках с оверэкспрессией hTERT мы наблюдали усиление экспрессии общего набора генов; были активированы гены сигналинга TNF-NFkB, клеточного цикла и апоптоза. Схожие закономерности ранее уже отмечали Mishima M. и соавторы [242]. Для (CID)-iCasp9-NK-клеток, отмечали тенденцию подавлять различные пути, связанные с программами развития. Ранее мы показали, что hTERT-модифицированные клетки обогащены популяцией T-Bet⁺, тогда как iCasp9-модифицированные клетки характеризовались большей долей популяции Eomes⁺ [278]. Мы предполагаем, поскольку Eomes, согласно литературным данным, связан с hTERT по пути b-катенин/Wnt и участвует в регуляции генов апоптоза, а T-Bet участвует в регуляции клеточного цикла через mTORC [57,182,322] что возможно ингибирование апоптоза в наших NK-клетках, экспрессирующих iCasp9, может происходить из-за положительной перекрёстной регуляции генов *EOMES* и *TBX21*. Мы также наблюдали снижение экспрессии генов путей, связанных с гибелью клеток, что свидетельствует об изменениях, способствующих выживанию iCasp9-NK-клеток после инкубации с CID, которые помогают преодолеть индукцию апоптоза путём активации каспазы-9.

Согласно базе данных “transcription target”, мы отметили несколько общих генов-мишеней, связанных с факторами транскрипции *HSD17B8*, *ASH1L*, *BARX2*, *FOXD2*, *ZNF350*, *CEBPZ*, *TATAAA_TATA_01*. *ASH1L* — это гистонметилтрансфераза (группы Trithorax), которая метилирует H3K36/H3K4, поддерживая активность хроматина. Нокдаун *ASH1L* увеличивает скорость апоптоза, за счет усиления экспрессии апоптотических генов *CASP3*, *BAX* и повышения соотношения *BAX/BCL2*, и ингибирует пролиферацию клеток [323]. *FOXD2* способствует перепрограммированию MLL4-зависимого энхансера посредством ремоделирования хроматина и модулирует экспрессию гена, зависимого от p53 [324]. Гены, связанные с *BARX2*, участвуют в функционировании иммунных клеток и развитии тканей. Гены-мишени *BARX2* связаны с такими процессами, как воспаление, ангиогенез, пролиферация и дифференцировка клеток. Ранее сообщалось, что *BARX2* содержится в большом количестве в иммунных клетках, таких как лимфоциты, эндотелиальные клетки и железистые клетки, и участвует в иммунном ответе [40] на ранних стадиях развития тканей [325]. Непосредственными регуляторными мишенями *BARX2* являются молекулы, которые контролируют рост клеток рака молочной железы MCF7

[326]. СЕВРZ, также известный как ССААТ/энхансерсвязывающий белок zeta, функционирует как ДНК-связывающий активатор транскрипции, который регулирует промоторы с блоками ССААТ и элементами теплового шока, в частности, стимулируя экспрессию HSP70 в ответ на стресс. СЕВРZ создает скафолды из комплексов NF- Υ для усиления рекрутирования РНК Pol II в промоторах, связанных с ростом. С/ЕВРZ может улучшать пролиферацию путём ингибирования экспрессии С/ЕВРа и индуцирования перехода клеточного цикла из фазы G1 в S-фазу [327,328]. ZNF350 кодирует ZBRK1, который связывается с последовательностью распознавания GGGXXXCAGXXXXTTT. Такие последовательности находятся в регуляторных областях подмножества генов-мишеней BRCA1, которые включают гены, ответственные за контроль контрольных точек клеточного цикла, пролиферацию и дифференцировку [329]. Мы наблюдали обширное пересечение генов-мишеней E2F с повышенной экспрессией, которые связаны с прогрессированием клеточного цикла в hTERT-iCasp9-NK-клетках и (CID)-iCasp9-NK-клетках. В целом, многочисленные кластеры дифференциально экспрессируемых генов были связаны с пролиферацией и выживанием, что могло быть связано с ремоделированием хроматина.

Другой общей особенностью клеток hTERT-iCasp9-NK и (CID)-iCasp9-NK является подавление экспрессии генов *HNRNP1* и *SNRPD3*. Продукты обоих генов относятся к ядерным рибонуклеопротеидам и участвуют в процессинге, сплайсинге и метаболизме РНК. Нокдаун этих генов останавливает пролиферацию и приводит к гибели клеток [330–332]. Интересно, что Элис Салиб и др. идентифицированы *BIRC5* (сурвивин) и *CDK10*, которые являются наиболее дифференцированно сплайсрованными генами клеточного цикла при избыточной экспрессии *MYCN* и подавлении *SNRPD3* [333], но мы не обнаружили экспрессии *MYCN* в наших клетках. Затем мы более точно изучили изменения сплайсинга между “выжившими” (CID)-iCasp9-NK-клетками и “резистентными” hTERT-iCasp9-NK-клетками по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK-клетками. Чтобы оценить изменения в сплайсинге, связанные с оверэкспрессией теломеразы, мы также сравнили hTERT-NK-клетки с iCasp9-NK-клетками. Мы обнаружили изоформы транскриптов *SUPT4H1*, *RFC3*, *SRSF3*, *TAPBPL* и *RPN2*, сплайсированные схожим образом, во всех группах: “выживших” (CID)-iCasp9-NK-клетках, “резистентных” hTERT-iCasp9-NK-клетках и hTERT-NK-клетках, которые были противопоставлены “восприимчивым” iCasp9-NK-клеткам (Рисунок 27). Эти изоформы транскриптов могут отражать hTERT-зависимые изменения в клетках, которые в то же время опосредуют выживание NK-клеток при добавлении CID.

Богатый серином/аргинином фактор сплайсинга 3 (SRSF3) управляет экспрессией 687 генов и изменением сплайсинга транскриптов 807 генов. SRSF3 сверхэкспрессируется в различных опухолях человека и способствует росту и выживанию клеток [334,335]. SRSF3 участвует в регуляции пути HRR (гомологичной рекомбинационной репарации), основного механизма восстановления DSBs (двухцепочечных разрывов) [336]. SUPT4H1 (SPT4) является частью комплекса DSIF для процессивности Pol II; альтернативные транскрипты могут модулировать общий уровень РНК [337]. RFC3 - это субъединица фактора репликации С, необходимая для репликации ДНК. Чжиченг Яо (Zhicheng Yao) et al и соавт. выявили что нокдаун RFC3 снижает как жизнеспособность клеток, так и пролиферацию в клетках гепатоцеллюлярной карциномы. Снижение экспрессии RFC3 привело к остановке клеточного цикла в фазе S и было связано с белками p21, p53, p57 и циклином А [338]. RPN2 - это рибофорин в олигосахарилтрансферазном комплексе, имеющий решающее значение для N-гликозилирования и гомеостаза ER [339]. Экспрессия RPN2 была связана с лекарственной устойчивостью в различных раковых клетках [339]. TAPBPL помогает TAP в загрузке антигена в МНС класса I [340], сплайсинг может влиять на эффективность презентации антигена и на выживаемость/уклонение опухолей от NK-клеток или Т-клеток CD8⁺. В целом, изменения при сплайсинге перечисленных транскриптов могут модулировать выживаемость NK-клеток и прогрессирование клеточного цикла зависимым от hTERT образом, что проливает свет на возможные новые аспекты неканонической функции hTERT в регуляции клеточной гибели и клеточного деления.

Мы выявили альтернативно сплайсированные транскрипты *PSMF1 (PI31)*, *CEBPB*, *ERCC5*, *RBM8A*, *VPS18*, *PLAAT4*, *ZNF706*, *HDHD3*, *AKAP11*, *NCK2*, *MED24*, *AARS1* среди “выживших” (CID)-iCasp9-NK клеток и “резистентных” hTERT-iCasp9-NK клеток по сравнению с “восприимчивыми” iCasp9-NK клетками. Так, мы оценили изменения транскриптов, которые могли бы способствовать выживанию NK-клеток. Nck1 и Nck2 являются модульными адапторными белками, несущими домены Nck SH2 и Nck SH3. Было показано, что уровни Nck1 и Nck2 повышаются при множестве раковых заболеваниях и усиливают пролиферацию, а также снижают апоптоз клеток [341]. РНК-связывающий мотивный белок 8A (RBM8A) является частью основного компонента комплекса экзонных соединений (EJC). Он широко экспрессируется в клетках и участвует в регуляции клеточной пролиферации, метастазирования, апоптоза и других биологических функциях. Также было показано, что нокдаун RBM8A может снижать лекарственную устойчивость по пути АКТ/mTOR [342]. Истощение RBM8A снижает уровень белка p21, что наряду с aberrантной экспрессией p53 повышает чувствительность клеток к генотоксическим

агентам [343]. AKAPs (белки, закрепляющие А-киназу) поддерживают гомеостаз митохондрий и защищают клетки от стрессовых ситуаций и клеточной гибели [344–346].

ERCC5 участвует в нуклеотидной эксцизионной репарации (NER) [347]. PLAAT4, опухолевый супрессор II класса, широко распространён в нормальных тканях. PLAAT4 способствует дифференцировке и апоптозу, но ингибирует пролиферацию клеток и замедляет рост опухоли [348]. СЕВРВ генерирует множество изоформ (LAP1, LAP2, LIP) посредством альтернативной инициации трансляции; длинные изоформы белков поддерживают дифференцировку или цитостаз, тогда как укороченный LIP способствует пролиферации и выживанию при многих видах рака, смещая транскрипцию в сторону экспрессии генов циклина и противоапоптотических генов [349]. Протеасомосвязывающий белок PI31 (протеасомальный ингибитор 31kD) способствует сборке 26S и функционирует как адаптер для транспортировки протеасом. Потеря функции PI31 нарушает гомеостаз белков [350]. MED24 является медиатором транскрипционной субъединицы 24 РНК-полимеразы II. AARS1 - аланил-тРНК-синтетаза человека (AARS), принадлежащая к семейству тРНК-синтаз, участвующих в процессе транскрипции. Таким образом, набор альтернативно сплайсированных транскриптов *PSMF1 (PI31)*, *CEBPB*, *ERCC5*, *RBM8A*, *VPS18*, *PLAAT4*, *ZNF706*, *HDHD3*, *AKAP11*, *NCK2*, *MED24*, *AARS1* появляется в НК-клетках, устойчивых к индукции клеточной гибели на поздних стадиях апоптотического пути, индуцируемого каспазой-9. Эти изменения могут быть совершенно независимыми и регулироваться другими механизмами НК-клеток. Однако мы наблюдали, что устойчивость НК-клеток к индукции апоптоза сопровождалась изменениями уровней транскриптов, связанных с клеточным циклом. Связь между клеточным циклом и апоптозом была также описана в обзорной статье Б. Пуччи (Pucci) et al и соавторов [351].

ВЫВОДЫ

1. Получены NK-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-NK-клетки в наименьшей степени подвергались истощению при цитокиновой стимуляции в сравнении с NK-клетками немодифицированными или трансдуцированными одним из трансгенов;
4. Добавление CID к iCasp9-клеткам индуцирует апоптоз, но эффективность направленной элиминации варьирует в популяциях NK-клеток и снижается при гиперэкспрессии hTERT;
5. 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы генетически модифицировали первичные NK-клетки человека генами *hTERT* и *iCASP9* с целью получить длительно пролиферирующие NK-клетки наряду с возможностью направленной элиминации модифицированных клеток. Интересно, что модифицированные *hTERT-iCasp9*-NK-клетки показали значительно более высокую скорость пролиферации по сравнению с *iCasp9*-NK-клетками и тенденцию к увеличению продолжительности жизни по сравнению с NK-клетками, трансдуцированными только одним из трансгенов. Такой эффект может быть достигнут за счет одновременного действия обоих трансгенов, где *hTERT* способствует выживанию благодаря своим каноническим и неканоническим функциям, а *iCasp9* обеспечивает отбор наиболее “живых” NK-клеток путем спонтанной димеризации. Однако точное влияние конструкции *iCasp9* на выживаемость NK-клеток все еще требует изучения. Таким образом, *hTERT* обеспечивает своего рода спасение для *iCasp9*-модифицированных NK-клеток, что проявляется при длительном культивировании. Функциональная активность существенно не варьировала в зависимости от типа трансгена, а скорее зависела от уровня экспрессии T-Bet у каждого донора на момент 1 месяца культивирования. Однако, 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 для получения генно-инженерных NK-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 NK-клеток. Стоит отметить, что NK-клетки, стимулированные IL-2+K562-mbIL21, также характеризовались менее истощенным фенотипом по сравнению с NK-клетками, стимулированными IL-2 или IL-2+IL-15.

Сложное функциональное взаимодействие продуктов генов *hTERT* и *iCASP9* в NK-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 канонической функции *hTERT*, что указывает на его неканоническую роль в выживании клеток. Примечательно, что сходный транскриптомный ландшафт “резистентных” и “выживших” клеток позволяет предположить, что оверэкспрессия *hTERT* ассоциирована с изменением экспрессии генов клеточного цикла и модуляции сплайсинга клеток, что позволяет предположить наличие

некоторого hTERT-опосредованного механизма ускользания от запуска апоптоза на поздних стадиях апоптотического каскада.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая диссертация была выполнена благодаря помощи и поддержке многих людей. Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность моему научному руководителю, к.б.н. М.А. Стельцовой, за постоянное внимание к работе, обучение новым методикам, а также всестороннюю поддержку на всех этапах данной работы. Автор благодарен руководителю за плодотворное научное руководство, критические обсуждения рукописей и постоянную поддержку исследовательских инициатив, которые позволили развиваться разнонаправленно. Отдельная благодарность руководителю группы изучения НК-клеток к.б.н. Е.И. Коваленко за критический анализ структуры и содержания работ, за обучение искусству письма и грамотного изложения материала. Также автор благодарит весь коллектив группы изучения НК-клеток. Методологическая помощь и совместное обсуждение результатов были крайне важны для реализации данной работы. Автор сердечно благодарит всех сотрудников лаборатории клеточных взаимодействий, а также руководителя лаборатории д.б.н. А.М. Сапожникова за создание исключительно доброжелательной и продуктивной рабочей среды. Отдельное спасибо к.б.н. Е.В. Свищевской за обучение методике Вестерн-блота и к.б.н. М. А. Шевченко за помощь в проведении экспериментов с использованием конфокального микроскопа. Большое спасибо сотрудникам лаборатории клеточных взаимодействий за помощь в проведении экспериментов и готовность делиться реагентами и оборудованием.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Islam R, Pupovac A, Evtimov V, et al. Enhancing a natural killer: Modification of NK cells for cancer immunotherapy. *Cells* 2021;10(5). <https://doi.org/10.3390/cells10051058>.
2. Hematol J, Liu S, Galat V, et al. NK cell - based cancer immunotherapy : from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol* 2021;14(1):7. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01014-w>.
3. Heipertz EL, Zynda ER, Stav-noraas TE, et al. Current Perspectives on NK and CAR-NK Cell Therapies. *Front Immunol* 2021;12(December). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732135>.
4. Basar R, Daher M, Rezvani K. Next-generation cell therapies: The emerging role of CAR-NK cells. *Blood Adv* 2020;4(22):5868–5876. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002547>.
5. Weber EW, Maus M V, Mackall CL. The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell* 2022;181(1):46–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>.
6. Lanza F, Seghatchian J. Transfusion and Apheresis Science An Overview of Current Position on Cell Therapy in Transfusion Science and Medicine : From Fictional Promises to Factual and Perspectives from Red Cell Substitution to Stem Cell Therapy. *Transfusion and Apheresis Science* 2020;(September):102940. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2020.102940>.
7. Zhao Y, Bennett AD, Zheng Z, et al. High-Affinity TCRs Generated by Phage Display Provide CD4+ T Cells with the Ability to Recognize and Kill Tumor Cell Lines. *J Immunol* 2007;179(9):5845–5854. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.5845>.
8. Rossignoli F, Grisendi G, Spano C, et al. Inducible Caspase9-mediated suicide gene for MSC-based cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2019;26(1–2):11–16. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0034-1>.
9. Ramos CA, Asgari Z, Liu E, et al. An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells* 2010;28(6):1107–1115. <https://doi.org/10.1002/stem.433>.
10. Palamarchuk AI, Alekseeva NA, Streltsova MA, et al. Increased susceptibility of the CD57– 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):1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms222413326>.
11. Streltsova MA, Barsov EV, Erokhina SA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Current Approaches to Engineering of NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2018;24(24):2810–2824. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180829113013>.
12. Yu Cao, Dr., David T. Rodgers, Dr., Juanjuan Du, Dr., Insha Ahmad, Dr., Eric N. Hampton, Dr., Jennifer S. Y. Ma, Dr., Magdalena Mazagova, Dr., Sei-hyun Choi, Dr.,+ Hwa Young Yun, Dr., Han Xiao, Dr., Pengyu Yang, Dr., Xiaozhou Luo, Dr., Reyna K. V. Lim, Dr Dr corresponding author. Design of Switchable Chimeric Antigen Receptor T

- Cells Targeting Breast Cancer. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017;55(26):7520–7524.
<https://doi.org/10.1002/anie.201601902>.
13. Streltsova MA, Ustiuzhanina MO, Barsov E V., Kust SA, Velichinskii RA, Kovalenko EI. Telomerase reverse transcriptase increases proliferation and lifespan of human nk cells without immortalization. *Biomedicines* 2021;9(6).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9060662>.
 14. Fujisaki H, Kakuda H, Imai C, Mullighan CG, Campana D. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol* 2009;145(5):606–613.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07667.x>.
 15. Vivier E, Vivier E, Nune JA. Natural Killer Cell Signaling Pathways. 2014;1517(2004).
<https://doi.org/10.1126/science.1103478>.
 16. Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP. Innate Lymphoid Cell Development: A T Cell Perspective. *Immunity* 2018;48(6):1091–1103.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.010>.
 17. Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B, et al. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94(3):392–399.
<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21614>.
 18. Коваленко Е.И., Стрельцова М.А.. Адаптивные Свойства Натуральных Киллеров – Лимфоцитов Врожденного Иммуитета. *Биоорганическая Химия* 2016;42(6):649–667. <https://doi.org/10.7868/s0132342316060063>.
 19. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: “L’union fait la force.” *Blood* 2005;106(7):2252–2258.
<https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>.
 20. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (1979). 331:44–49
 21. Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-like receptors (KIRs): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Front Immunol*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01179>
 22. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Front Immunol* 2019;10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00909>.
 23. Lanier LL. NK CELL RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* 2005;23(1):225–274.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>.
 24. Kärre K. NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scand J Immunol* 2002;55(3):221–228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01053.x>.
 25. Ran G he, Lin Y qing, Tian L, et al. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Signal Transduct Target Ther*.
<https://doi.org/10.1038/s41392-022-01058-z>
 26. Boudreau JE, Hsu KC. Natural killer cell education and the response to infection and cancer therapy: stay tuned. *Trends Immunol* 2019;(3):222–239.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.12.0011>.

27. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008;27(45):5932–5943. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.267>.
28. Lupo KB, Matosevic S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2019;11(6):769. <https://doi.org/10.3390/cancers11060769>.
29. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Front. Immunol.* 10
30. Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, Pesce S, Marcenaro E, Mavilio D. NK cells to cure cancer. *Semin Immunol* 2019;(January):0–1. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.03.004>.
31. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol* 2014;(3):221–229. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.98>.
32. Contreras R, Palacios F. Rentabilidad financiera y liquidez corriente de las empresas del sector industrial que negocian en la Bolsa de Valores de Lima, 2011-2014. *Revista de Investigación Universitaria* 2016;4(42):83–87. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>.Innate.
33. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04>
34. Alvarez M, Simonetta F, Baker J, et al. Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. *JCI Insight* 2019;4(14):1–17. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127729>.
35. Jiacheng Bi ZT. NK Cell exhaustion. *Front Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>
36. Khan M, Arooj S, Wang H, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. *Front Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00167>
37. Wang JM, Cheng YQ, Shi L, et al. KLRG1 Negatively Regulates Natural Killer Cell Functions through the Akt Pathway in Individuals with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 2013;87(21):11626–11636. <https://doi.org/10.1128/JVI.01515-13>.
38. Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0132-0>
39. Ndhlovu LC, Lopez-verge S, Barbour JD, et al. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 2016;119(16):3734–3744. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392951>.
40. Deng J, Liu Y, Ma X, et al. NK cells in HPV-related tumorigenesis: mechanisms and clinical applications. *Front Cell Infect Microbiol* 2026;15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1723091>.
41. Lanier LL. NK CELL RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* 2005;23(1):225–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>.

42. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. 2005;42:501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>.
43. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2019;(6):1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>.
44. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 2001;97(10):3146–3151. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.10.3146>.
45. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. *Biomark Res* 2020;8(1):1–16. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>.
46. Xu D, Erickson S, Szeps M, et al. Interferon α down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 2000;96(13):4313–4318. <https://doi.org/c>.
47. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, et al. Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett* 2014;161(2):168–173. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.009>.
48. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol* 2019;10(August):1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>.
49. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9).
50. Chiesa M Della, Pesce S, Muccio L, et al. Features of memory-like and PD-1+ human NK cell subsets. *Front Immunol* 2016;(SEP):1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00351>.
51. Huntington N, Blood C. T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells. 2021;12(September):1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732511>.
52. Pende D, Falco M, Vitale M, et al. Killer Ig-like receptors (KIRs): Their role in NK cell modulation and developments leading to their clinical exploitation. *Front. Immunol.* 10
53. Lucar O, Reeves RK, Jost S. A Natural Impact: NK Cells at the Intersection of Cancer and HIV Disease. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01850>.
54. Huang C, Bi J. Expression Regulation and Function of T-Bet in NK Cells. *Front Immunol* 2021;12(October):1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761920>.
55. Huntington N, Blood C. T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells. *Front Immunol* 2021;12(September):1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732511>.
56. Simonetta F, Pradier A, Roosnek E. T-bet and eomesodermin in NK Cell Development , Maturation , and Function. *Front Immunol* 2016;7(June):1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00241>.

57. Zhang J, Le Gras S, Pouxvielh K, et al. Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells. *Nat Commun* 2021;12(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25758-2>.
58. Knox JJ, Cosma GL, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and Eomes in peripheral human immune cells. 2014;5(May):1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00217>.
59. Simonetta F, Pradier A, Roosnek E. T-bet and eomesodermin in nK Cell Development , Maturation , and Function. 2016;7(June):1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00241>.
60. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, et al. The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. 2013;36(1):55–67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.016>.
61. Zhang J, Le Gras S, Pouxvielh K, et al. Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells. *Nat Commun* 2021;12(1):1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25758-2>.
62. Fang F, Xie S, Chen M, et al. Advances in NK cell production. *Cell Mol Immunol*. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00808-3>
63. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol* 2019;10(August):1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>.
64. Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, Pesce S, Marcenaro E, Mavilio D. NK cells to cure cancer. *Semin. Immunol*.
65. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, et al. Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett* 2014;161(2):168–173. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.009>.
66. Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Front Immunol* 2019;10(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02590>.
67. Gill S, Vasey AE, De Souza A, et al. Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells. *Blood* 2012;119(24):5758–5768. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415364>.
68. Denman CJ, Senyukov V V., Somanchi SS, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 2012;7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030264>.
69. Piñeiro Fernández J, Luddy KA, Harmon C, O’Farrelly C. Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function. *Int J Mol Sci* 2019;20(17):4131. <https://doi.org/10.3390/ijms20174131>.
70. Lim WA, June CH. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. *Cell* 2017;168(4):724–740. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.016>.
71. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144(5):646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

72. Matosevic S. Viral and nonviral engineering of natural killer cells as emerging adoptive cancer immunotherapies. *J Immunol Res* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4054815>.
73. Streltsova MA, Barsov EV, Erokhina SA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Current Approaches to Engineering of NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2018;24(24):2810–2824. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180829113013>.
74. Littwitz E, Francois S, Dittmer U, Gibbert K. Distinct roles of NK cells in viral immunity during different phases of acute Friend retrovirus infection. *Retrovirology* 2013;10(1):1. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-127>.
75. Hu Y, Tian ZG, Zhang C. Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy. *Acta Pharmacol Sin* 2018;39(2):167–176. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.125>.
76. Tran J, Kung SKP. Lentiviral vectors mediate stable and efficient gene delivery into primary murine natural killer cells. *Molecular Therapy* 2007;15(7):1331–1339. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300184>.
77. Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R, Chen J. CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* 2020;59. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102975>.
78. O’Keefe EP. Nucleic Acid Delivery: Lentiviral and Retroviral Vectors. *Materials and Methods* 2013;3:1–17. <https://doi.org/10.13070/mm.en.3.174>.
79. Streltsova MA, Barsov E, Erokhina SA, Kovalenko EI. Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. *J Immunol Methods* 2017;450:90–94. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.08.003>.
80. Streltsova MA, Ustiuzhanina MO, Barsov E V., Kust SA, Velichinskii RA, Kovalenko EI. Telomerase reverse transcriptase increases proliferation and lifespan of human nk cells without immortalization. *Biomedicines* 2021;9(6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9060662>.
81. Childs RW, Berg M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2013;2013:234–246. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.234>.
82. Gotthardt D, Trifinopoulos J, Sexl V, Putz EM. JAK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Front Immunol* 2019;10(November). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02590>.
83. Nayyar G, Chu Y, Cairo MS. Overcoming resistance to natural killer cell based immunotherapies for solid tumors. *Front Oncol* 2019;9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00051>.
84. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol* 2018;9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>.

85. Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: Current progress and new opportunities. *Front Immunol* 2019;10(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01205>.
86. Sarkar S, Germeraad WTV, Rouschop KMA, et al. Hypoxia Induced Impairment of NK Cell Cytotoxicity against Multiple Myeloma Can Be Overcome by IL-2 Activation of the NK Cells. *PLoS One* 2013;8(5):1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064835>.
87. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22(11):633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9).
88. Gilmour KC, Fujii H, Cranston T, Graham Davies E, Kinnon C, Gaspar HB. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor β subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 2001;98(3):877–879. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.877>.
89. Sathe P, Delconte RB, Souza-Fonseca-Guimaraes F, et al. Innate immunodeficiency following genetic ablation of Mcl1 in natural killer cells. *Nat Commun* 2014;5:1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms5539>.
90. Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, Kotecki M, Cochran BH. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res* 2005;65(15):6516–6520. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0924>.
91. Watkinson F, Nayar SK, Rani A, et al. IL-15 Upregulates Telomerase Expression and Potently Increases Proliferative Capacity of NK, NKT-Like, and CD8 T Cells. *Front Immunol* 2020;11(January):594620. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594620>.
92. Li Y, Zhi W, Wareski P, Weng N. IL-15 Activates Telomerase and Minimizes Telomere Loss and May Preserve the Replicative Life Span of Memory CD8 + T Cells In Vitro . *The Journal of Immunology* 2005;174(7):4019–4024. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.7.4019>.
93. Lupo KB, Matosevic S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2019;11(6):769. <https://doi.org/10.3390/cancers11060769>.
94. Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front Immunol* 2017;8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00930>.
95. Lupo KB, Matosevic S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2019;11(6):769. <https://doi.org/10.3390/cancers11060769>.
96. Streltsova MA, Barsov E, Erokhina SA, Kovalenko EI. Retroviral gene transfer into primary human NK cells activated by IL-2 and K562 feeder cells expressing membrane-bound IL-21. *J Immunol Methods* 2017;450:90–94. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.08.003>.

97. Denman CJ, Senyukov V V., Somanchi SS, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained Ex Vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One* 2012;7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030264>.
98. Erokhina SA, Streltsova MA, Kanevskiy LM, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. HLA-DR+ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity. *Immunol Cell Biol* 2018;96(2):212–228. <https://doi.org/10.1111/imcb.1032>.
99. Palamarchuk AI, Ustiuzhanina MO, Kovalenko EI, Streltsova MA. 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. <https://doi.org/10.1134/S1990747825700291>.
100. Palamarchuk AI, Alekseeva NA, Streltsova MA, et al. Increased susceptibility of the CD57– 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). <https://doi.org/10.3390/ijms222413326>.
101. Streltsova MA, Barsov EV, Erokhina SA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Current Approaches to Engineering of NK Cells for Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2018;24(24):2810–2824. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180829113013>.
102. Alvarez M, Simonetta F, Baker J, et al. Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. *JCI Insight* 2019;4(14):1–17. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127729>.
103. Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2013;8:49–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164030>.
104. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):699–706. <https://doi.org/10.1038/nri890>.
105. Fujisaki H, Kakuda H, Imai C, Mullighan CG, Campana D. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol* 2009;145(5):606–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07667.x>.
106. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009;69(9):4010–4017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>.
107. Palamarchuk, Anastasia I., Kovalenko EI, Streltsova MA. Multiple Actions of Telomerase Reverse Transcriptase in Cell Death Regulation. *Biomedicines* Review. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041091>
108. Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep* 2019;46(1):1401–1411. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4496-x>.
109. Lipinska N, Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, Kopczynski P, Rubis B. Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017;74(22):4121–4132. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2573-2>.

110. Jones BS, Lamb LS, Goldman F, Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00254>.
111. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T-cells. *Front Pharmacol* 2014;5(OCT). <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00235>.
112. Marin V, Cribioli E, Philip B, et al. Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells. *Hum Gene Ther Methods* 2012;23(6):376–386. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.050>.
113. Tey SK. Adoptive T-cell therapy: adverse events and safety switches. *Clin Transl Immunology* 2014;3(6):e17-7. <https://doi.org/10.1038/cti.2014.11>.
114. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005;105(11):4247–4254. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4564>.
115. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, et al. Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *New England Journal of Medicine* 2011;365(18):1673–1683. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1106152>.
116. Marin V, Cribioli E, Philip B, et al. Comparison of Different Suicide-Gene Strategies for the Safety Improvement of Genetically Manipulated T Cells. *Hum Gene Ther Methods*. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.050>
117. Li P, Zhou L, Zhao T, et al. Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget* 2017;8(14):23996–24008. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15098>.
118. Oelsner S, Waldmann A, Billmeier A, et al. Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32269>
119. Barese CN, Felizardo TC, Sellers SE, et al. Regulated Apoptosis of Genetically-Modified Hematopoietic Stem and Progenitor Cells via an Inducible Caspase-9 Suicide Gene in Rhesus Macaques. *Stem Cells* 2016;33(1):91–100. <https://doi.org/10.1002/stem.1869>.
120. Palamarchuk AI, Alekseeva NA, Streltsova MA, et al. Increased susceptibility of the CD57– 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). <https://doi.org/10.3390/ijms222413326>.
121. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
122. Brumatti G, Salmanidis M, Ekert PG. Crossing paths : interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell Mol Life Sci* 2010;1619–1630. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0288-8>.
123. Ding Y, Wang H, Niu J, Luo M, Gou Y, Miao L. Induction of ROS Overload by Alantolactone Prompts Oxidative DNA Damage and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 2016;1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17040558>.

124. Pihán P, Carreras-sureda A, Hetz C. BCL-2 family : integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Nature Publishing Group* 2017;24(9):1478–1487. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.82>.
125. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature Publishing Group* 2015;16(1):20–33. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.2>.
126. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2019;105(6):1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>.
127. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death : a phylogenetically conserved control. *Microb Cell* 2016;3(3):101–108. <https://doi.org/10.15698/mic2016.03.483>.
128. Moldoveanu T, Czabotar PE. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020;1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036319>.
129. Shamas-din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008714>.
130. Tait SWG, Green DR. Mitochondrial Regulation of Cell Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>.
131. Kavuri SM, Geserick P, Berg D, Dimitrova DP, Feoktistova M, Siegmund D, Gollnick H, Neumann M, Wajant H LM. Cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) isoforms block CD95- and TRAIL death receptor-induced gene induction irrespective of processing of caspase-8 or cFLIP in the death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2011;286(19):16631–16646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.148585>.
132. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 Type I / Type II model. *Semin Immunol* 2003;15:185–193. [https://doi.org/10.1016/S1044-5323\(03\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S1044-5323(03)00031-9).
133. Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 1998;94:491–501. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81590-1).
134. Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP acts as a switch between type I and type II FAS-induced apoptosis signalling. *Nature* 2009;460(7258):1035–1039. <https://doi.org/10.1038/nature08229>.
135. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006;6(December). <https://doi.org/10.1038/nri1983>.
136. Chowdhury D LJ. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed. *Annu Rev Immunol* 2008;389–420. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090404>.
137. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, Browne KA TJA. Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid , but Not Direct Granzyme B – mediated Caspase Activation. *J Exp Med* 2000;192(10). <https://doi.org/10.1084/jem.192.10.140>.

138. Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, et al. Granzyme B-mediated Apoptosis Proceeds Predominantly through a Bcl-2-inhibitable Mitochondrial Pathway. *J Biol Chem* 2001;276(15):12060–12067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009038200>.
139. Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A Loading Induces Rapid Cytolysis and a Novel Form of DNA Damage Independently of Caspase Activation. *Immunity* 1999;10:585–594. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80058-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80058-8).
140. Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J. Granzyme A Cleaves a Mitochondrial Complex I Protein to Initiate Caspase-Independent Cell Death. *Cell* 2010;133(4):681–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.032>.
141. Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):699–706. <https://doi.org/10.1038/nri890>.
142. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002;21(4 REV. ISS. 1):564–579. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205083>.
143. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science (1979)* 1994;261:1301–1306. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>.
144. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016;73(8):1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9>.
145. Ségal-Bendirdjian E, Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front Cell Dev Biol* 2019;7(December):1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00332>.
146. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 1985;43(2 PART 1):405–413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9).
147. Akincilar SC, Chan CHT, Ng QF, Fidan K, Tergaonkar V. Non-canonical roles of canonical telomere binding proteins in cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021;78(9):4235–4257. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03783-0>.
148. Lipinska N, Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, Kopczynski P, Rubis B. Telomerase and drug resistance in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2017;74(22):4121–4132. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2573-2>.
149. Yan J, Zhou Y, Chen DX, et al. Effects of mitochondrial translocation of telomerase on drug resistance in hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer* 2015;6(2):151–159. <https://doi.org/10.7150/jca.10419>.
150. Shin JS, Foo T, Hong A, et al. Telomerase expression as a predictive marker of radiotherapy response in rectal cancer: in vitro and in vivo study. *Pathology* 2012;44(3):209–215. <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e3283511cd5>.
151. Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, et al. hTERT: A novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006;25(33):4505–4514. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209487>.

152. Bermudez Y, Erasso D, Johnson NC, Alfonso MY, Lowell NE, Kruk PA. Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis. *Clin Interv Aging* 2006;1(2):155–167. <https://doi.org/10.2147/ciia.2006.1.2.155>.
153. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002;21(20):3130–3138. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205419>.
154. Indran IR, Hande MP, Pervaiz S. hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Res* 2011;71(1):266–276. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1588>.
155. Del Bufalo D, Rizzo A, Trisciuglio D, et al. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death Differ* 2005;12(11):1429–1438. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401670>.
156. Rahman R, Latonen L, Wiman KG. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 2005;24(8):1320–1327. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208232>.
157. De Lange T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu Rev Genet* 2018;52(September):223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>.
158. Wynford-Thomas D, Kipling D. Cancer and the knockout mouse. *Nature* 1997;389(6651):551–552. <https://doi.org/10.1038/39207>.
159. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965;37(3):614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9).
160. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (1979)* 1998;279(5349):349–352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>.
161. Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2013;8:49–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164030>.
162. De Lange T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu Rev Genet* 2018;52(September):223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>.
163. Awasthi P, Foiani M, Kumar A. ATM and ATR signaling at a glance. *J Cell Sci* 2015;128(23):4255–4262. <https://doi.org/10.1242/jcs.169730>.
164. Callegari AJ, Kelly TJ. Shedding light on the DNA damage checkpoint. *Cell Cycle* 2007;6(6):660–666. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3984>.
165. Celli GB, de Lange T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 2005;7(7):712–718. <https://doi.org/10.1038/ncb1275>.
166. De Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005;19(18):2100–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>.

167. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem* 2006;75:493–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412>.
168. Zhang JM, Zou L. Alternative lengthening of telomeres : from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell Biosci* 2020;1–9. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00391-6>.
169. Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 2003;22(1):131–146. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206063>.
170. Masutomi K, Possemato R, Wong JMY, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8222–8227. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503095102>.
171. Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 2005;37(2):193–197. <https://doi.org/10.1038/ng1506>.
172. D’Adda Di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 2004;18(15):1781–1799. <https://doi.org/10.1101/gad.1214504>.
173. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 2008;4(1):0124–0138. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040010>.
174. Park J, Venteicher AS, Hong JY, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009;460(7251):66–72. <https://doi.org/10.1038/nature08137>.
175. Eitan E, Braverman C, Tichon A, Gitler D, Hutchison ER, Mattson MP PE. Excitotoxic and Radiation Stress Increase TERT Levels in the Mitochondria and Cytosol of Cerebellar Purkinje Neurons. *Cerebellum* 2017;176(5):139–148. <https://doi.org/10.1007/s12311-015-0720-6>.
176. Muzza M, Colombo C, Cirello V, Perrino M, Vicentini L, Fugazzola L. Oxidative stress and the subcellular localization of the telomerase reverse transcriptase (TERT) in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2016;431:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.05.005>.
177. Sharma NK, Reyes A, Green P, et al. Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2012;40(2):712–725. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr758>.
178. Rosen J, Jakobs P, Ale-gha N, Altschmied J, Haendeler J. Redox Biology Non-canonical functions of Telomerase Reverse Transcriptase – Impact on redox homeostasis. *Redox Biol* 2020;34(February):101543. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101543>.
179. Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* 2012;2 SEP(September):1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00133>.

180. Ghosh A, Saginc G, Leow SC, et al. Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nat Cell Biol* 2012;14(12):1270–1281. <https://doi.org/10.1038/ncb2621>.
181. Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, et al. hTERT: A novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006;25(33):4505–4514. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209487>.
182. Park J, Venteicher AS, Hong JY, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 2009;460(7251):66–72. <https://doi.org/10.1038/nature08137>.
183. Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell* 2004;3(6):399–411. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00124.x>.
184. Zhou J, Mao B, Zhou Q, et al. Endoplasmic reticulum stress activates telomerase. *Aging Cell* 2014;13(1):197–200. <https://doi.org/10.1111/acel.12161>.
185. Jin Y, You L, Kim HJ, Lee HW. Telomerase reverse transcriptase contains a BH3-like motif and interacts with BCL-2 family members. *Mol Cells* 2018;41(7):684–694. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0206>.
186. Li H, Cao Y, Berndt MC, Funder JW, Liu JP. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 1999;18(48):6785–6794. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203061>.
187. Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Totoń E, et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep* 2019;46(1):1401–1411. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4496-x>.
188. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol* 2020;11(November):1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589929>.
189. Shliapina V, Koriagina M, Vasilkova D, Govorun V, Dontsova O, Rubtsova M. Human Telomerase RNA Protein Encoded by Telomerase RNA is Involved in Metabolic Responses. *Front Cell Dev Biol* 2021;9(December):1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.754611>.
190. Blasiak J, Szczepanska J, Fila M, Pawlowska E, Kaarniranta K. Potential of telomerase in age-related macular degeneration—involvement of senescence, DNA damage response and autophagy and a key role of PGC-1 α . *Int J Mol Sci* 2021;22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137194>.
191. Zhang Z, Yu L, Dai G, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes chemoresistance by suppressing cisplatin-dependent apoptosis in osteosarcoma cells. *Sci Rep* 2017;7(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07204-w>.
192. Del Bufalo D, Rizzo A, Trisciuglio D, et al. Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death Differ* 2005;12(11):1429–1438. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401670>.
193. Kondo S, Tanaka Y, Kondo Y, Hitomi M, Barnett GH, Ishizaka Y, Liu J, Haqqi T, Nishiyama A, Villeponteau B, Cowell JK BBP. Antisense telomerase treatment :

- induction of two distinct pathways , apoptosis and differentiation. *FASEB J* 1998;801–811. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.10.801>.
194. Folini M, Brambilla C, Villa R, et al. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT , but not hTERC , induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer* 2005;41:624–634. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.12.002>.
 195. Pestana A, Vinagre J, Sobrinho-Simões M SP. TERT biology and function in cancer: beyond immortalization. *J Mol Endocrinol* 2017;44(January):1–15. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0195>.
 196. Behrooz AB, Syahir A. Could We Address the Interplay Between CD133, Wnt/ β -Catenin, and TERT Signaling Pathways as a Potential Target for Glioblastoma Therapy? *Front Oncol* 2021;11(April):1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642719>.
 197. Vafaiyan Z, Gharaei R, Asadi J. The correlation between telomerase activity and BaX/BcL-2 ratio in valproic acid-treated MCF-7 breast cancer cell line. *Iran J Basic Med Sci* 2015;18(7):700–704
 198. Yamada O, Kawauchi K. The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies. *JAKSTAT* 2013;2(4):e25256. <https://doi.org/10.4161/jkst.25256>.
 199. Konnikova L, Simeone MC, Kruger MM, Kotecki M, Cochran BH. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res* 2005;65(15):6516–6520. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0924>.
 200. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT—Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol* 2020;11(November):1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.589929>.
 201. Rahman R, Latonen L, Wiman KG. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 2005;24(8):1320–1327. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208232>.
 202. Mai Z, Sun H, Yang F, et al. Bad is essential for Bcl-xL-enhanced Bax shuttling between mitochondria and cytosol. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2023;155. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106359>.
 203. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 2009;69(9):4010–4017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>.
 204. Rufer N, Migliaccio M, Antonchuk J, Humphries RK, Roosnek E, Lansdorp PM. Transfer of the human telomerase reverse transcriptase (TERT) gene into T lymphocytes results in extension of replicative potential. *Blood* 2001;98(3):597–603. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.597>.
 205. Ségal-Bendirdjian E, Geli V. Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Front Cell Dev Biol* 2019;7(December):1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00332>.

206. Benslimane Y, Sánchez-Osuna M, Coulombe-Huntington J, et al. A novel p53 regulator, C16ORF72/TAPR1, buffers against telomerase inhibition. *Aging Cell* 2021;20(4). <https://doi.org/10.1111/ACEL.13331>.
207. Bermudez Y, Erasso D, Johnson NC, Alfonso MY, Lowell NE, Kruk PA. Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis. *Clin Interv Aging* 2006;1(2):155–167. <https://doi.org/10.2147/ciia.2006.1.2.155>.
208. Jin Y, You L, Kim HJ, Lee HW. Telomerase reverse transcriptase contains a BH3-like motif and interacts with BCL-2 family members. *Mol Cells* 2018;41(7):684–694. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0206>.
209. Straathof KC, Pulè MA, Yotnda P, et al. An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood* 2005;105(11):4247–4254. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4564>.
210. Barese CN, Felizardo TC, Sellers SE, et al. Regulated Apoptosis of Genetically-Modified Hematopoietic Stem and Progenitor Cells via an Inducible Caspase-9 Suicide Gene in Rhesus Macaques. *Stem Cells* 2016;33(1):91–100. <https://doi.org/10.1002/stem.1869>.
211. Ekert PG, Silke J, Vaux DL. Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999;6(11):1081–1086. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400594>.
212. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 2015;22(1):58–73. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>.
213. Hamacher-Brady A, Brady NR. Bax/Bak-dependent, Drp1-independent targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) into inner mitochondrial compartments counteracts Smac/DIABLO-dependent effector caspase activation. *Journal of Biological Chemistry* 2015;290(36):22005–22018. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643064>.
214. Felices M, Lenvik TR, Ankarlo DEM, et al. Functional NK Cell Repertoires Are Maintained through IL-2R α and Fas Ligand. *The Journal of Immunology* 2014;192(8):3889–3897. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302601>.
215. Herbert B, Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW. Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nat Protoc* 2006;1(3):1583–1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.239>.
216. The Galaxy Community. The Galaxy platform for accessible , reproducible, and collaborative data analyses : 2024 update. *Nucleic Acids Res* 2024;(52):W83–W94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>.
217. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012;16(5):284–287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
218. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG : new perspectives on genomes , pathways , diseases and drugs. 2017;45(November 2016):353–361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>.
219. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

220. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *NATURE GENETICS VOLUME* 2003;34(3). <https://doi.org/10.1038/ng1180>.
221. Wahlers A, Schwieger M, Li Z, et al. Influence of multiplicity of infection and protein stability on retroviral vector-mediated gene expression in hematopoietic cells. *Gene Ther* 2001;8:477–486. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301426>.
222. Bari R, Granzin M, Tsang KS, et al. A distinct subset of highly proliferative and lentiviral vector (LV)-transducible NK cells define a readily engineered subset for adoptive cellular therapy. *Front Immunol* 2019;10(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02001>.
223. Colamartino ABL, Lemieux W, Bifsha P, et al. Efficient and Robust NK-Cell Transduction With Baboon Envelope Pseudotyped Lentivector. *Front Immunol* 2019;10(December):1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02873>.
224. Müller S, Bexte T, Gebel V, Kalensee F, Olive D, Barrett D. High Cytotoxic Efficiency of Lentivirally and Alpharetrovirally Engineered CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor Natural Killer Cells Against Acute Lymphoblastic Leukemia. 2020;10(January):1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03123>.
225. Suerth JD, Morgan MA, Kloess S, et al. Efficient generation of gene-modified human natural killer cells via alpharetroviral vectors. *J Mol Med* 2016;94(1):83–93. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1327-6>.
226. Beziat VB', Liu LL, Malmberg J-A, et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 2013;121(14):2678–2688. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459545>.
227. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* 2010;116(19):3865–3874. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-282301>.
228. Kovalenko EI, Streltsova MA, Kanevskiy LM, Erokhina SA, Telford WG. Identification of human memory-like NK cells. *Curr Protoc Cytom* 2017;2017:9.50.1-9.50.11. <https://doi.org/10.1002/cpcy.13>.
229. Kobyzeva PA, Streltsova MA, Erokhina SA, et al. CD56dimCD57–NKG2C+ NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57+NKG2C+ memory-like NK cells. *J Leukoc Biol* 2020;108(4):1379–1395. <https://doi.org/10.1002/JLB.1MA0720-654RR>.
230. Lange C, Blankenstein T. Loss of retroviral gene expression in bone marrow reconstituted mice correlates with down-regulation of gene expression in long-term culture initiating cells. *Gene Ther* 1997;4(4):303–308. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300395>.
231. Engeland K. Cell cycle regulation : p53-p21-RB signaling. CDDpress. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
232. Sansam CL, Cruz NM, Danielian PS, et al. A vertebrate gene , ticrr , is an essential checkpoint and replication regulator. *Genes Dev* 2010;24:183–194. <https://doi.org/10.1101/gad.1860310>.

233. Ahmed A, Shamsi A, Mohammad T, Mustafa G, Asimul H, Imtaiyaz I. Aurora B kinase : a potential drug target for cancer therapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03669-5>
234. Cheeseman IM. The Kinetochore. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 2014;1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015826>.
235. Golov AK, Gavrilov AA. Cohesin Complex : Structure and Principles of Interaction with DNA. *Biochemistry (Moscow)* 2024;89(4):585–600. <https://doi.org/10.1134/S0006297924040011>.
236. Aguilera P, López-contreras AJ. Trends in Genetics ATRX , a guardian of chromatin. *Trends in Genetics* 2023;39(6):505–519. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.009>.
237. Manuscript A. Negative regulation of CHK2 activity by protein phosphatase 2A is modulated by DNA damage. *Cell Cycle* 2011;9(4):736–747. <https://doi.org/10.4161/cc.9.4.10613>.
238. Zhang L, Meng Y, Feng X, Han Z. CAR-NK cells for cancer immunotherapy : from bench to bedside. *Biomark Res* 2022;1–19. <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00364-6>.
239. Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 2002;21(20):3130–3138. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205419>.
240. Saretzki G. Extra-telomeric Functions of Human Telomerase: Cancer, Mitochondria and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des* 2014;20(41):6386–6403. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140630095606>.
241. Hou C, Wang F, Liu X, Chang G, Wang F, Geng X. Comprehensive Analysis of Interaction Networks of Telomerase Reverse Transcriptase with Multiple Bioinformatic Approaches: Deep Mining the Potential Functions of Telomere and Telomerase. *Rejuvenation Res* 2017;20(4):320–333. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1909>.
242. Mishima M, Takai A, Takeda H, et al. TERT upregulation promotes cell proliferation via degradation of p21 and increases carcinogenic potential. *Journal of Pathology* 2024;264(3):318–331. <https://doi.org/10.1002/path.6351>.
243. Wang Z, Qin J, Zhao J, et al. Inflammatory IFIT3 renders chemotherapy resistance by regulating post-translational modification of VDAC2 in pancreatic cancer. *Theranostics* 2020;10(16):7178–7192. <https://doi.org/10.7150/thno.43093>.
244. Lux CT, Scharenberg AM. Therapeutic Gene Editing Safety and Specificity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2017;31(5):787–795. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.05.002>.
245. Zhang P, Raju J, Ullah A, et al. Phase I Trial of Inducible Caspase 9 T Cells in Adult Stem Cell Transplant Demonstrates Massive Clonotypic Proliferative Potential and Long-term Persistence of Transgenic T Cells. *Clinical Trials: Immunotherapy* 2019;1–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3069>.
246. Enli Liu, Yijiu Tong, Gianpietro Dotti, Hila Shaim, Barbara Savoldo MM, Jordan Orange, Xinhai Wan, Xinyan Lu, Alexandra Reynolds, Mihai Gagea P, Banerjee, Rong Cai, Mustafa H Bdaiwi, Rafet Basar, Muharrem Muftuoglu, Li Li D, Marin, William Wierda, Michael Keating, Richard Champlin, Elizabeth Shpall1 A, Rezvani K. Cord blood NK

- cells engineered to express IL-15 and a CD19- targeted CAR show long-term persistence and potent anti-tumor activity. *Catalysis from A to Z* 2020;32(2):520–531. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.226>.
247. Morgan MA, Büning H, Sauer M, Schambach A. Use of Cell and Genome Modification Technologies to Generate Improved “Off-the-Shelf” CAR T and CAR NK Cells. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01965>.
 248. Velichinskii RA, Streltsova MA, Kust SA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. The biological role and therapeutic potential of nk cells in hematological and solid tumors. *Int J Mol Sci* 2021;22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms222111385>.
 249. Holic N, Fenard D. Production of retrovirus-based vectors in mildly acidic pH conditions. *Methods in Molecular Biology* 2016;1448:41–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3753-0_3.
 250. Du S, Xu W, Wang Y, et al. The “LLQY” Motif on SARS-CoV-2 Spike Protein Affects S Incorporation into Virus Particles VIRUS-CELL INTERACTIONS. *J Virol* 2022;96:1897–1918. <https://doi.org/10.1128/jvi.01897-21>.
 251. Streltsova MA, Palamarchuk AI, Vavilova JD, et al. Methodological Approaches for Increasing the Retroviral Transduction Efficiency of Primary NK Cells. *Curr Pharm Des* 2024;30(37):2947–2958. <https://doi.org/10.2174/0113816128314633240724060916>.
 252. Marin M, Lavillette D, Kelly SM, Kabat D. N-Linked Glycosylation and Sequence Changes in a Critical Negative Control Region of the ASCT1 and ASCT2 Neutral Amino Acid Transporters Determine Their Retroviral Receptor Functions. *J Virol* 2003;77(5):2936–2945. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2936-2945.2003>.
 253. Jensen H, Potempa M, Gotthardt D, Lanier LL. Cutting Edge: IL-2–Induced Expression of the Amino Acid Transporters SLC1A5 and CD98 Is a Prerequisite for NKG2D-Mediated Activation of Human NK Cells. *The Journal of Immunology* 2017;199(6):1967–1972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700497>.
 254. Dong H, Ham JD, Hu G, et al. Memory-like NK cells armed with a neoepitope-specific CAR exhibit potent activity against NPM1 mutated acute myeloid leukemia. *PNAS*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122379119>
 255. Almutairi SM, Ali AK, He W, et al. Interleukin-18 up-regulates amino acid transporters and facilitates amino acid–induced mTORC1 activation in natural killer cells. *Journal of Biological Chemistry* 2019;294(12):4644–4655. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005892>.
 256. Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, Alici E. Inhibition of Intracellular Antiviral Defense Mechanisms Augments Lentiviral Transduction of Human Natural Killer Cells : Implications for Gene Therapy. 2012;1100(October):1090–1100. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.080>.
 257. Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv* 2013;31(2):208–223. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.001>.

258. Cacciari M. Transient blockade of TBK1/IKK ϵ allows efficient transduction of primary human natural killer cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped lentiviral vectors. *Cytotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.04.010>
259. Allan DSJ, Chakraborty M, Waller GC, et al. Systematic improvements in lentiviral transduction of primary human natural killer cells undergoing ex vivo expansion. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2021;20:559–571. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.01.008>.
260. Kordelas L, Steckel NK, Horn PA, Beelen DW, Rebmann V. The activating NKG2C receptor is significantly reduced in NK cells after allogeneic stem cell transplantation in patients with severe graft-versus-host disease. *Int J Mol Sci* 2016;17(11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111797>.
261. Béziat V, Dalgard O, Asselah T, et al. CMV drives clonal expansion of NKG2C + NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol* 2012;42(2):447–457. <https://doi.org/10.1002/eji.201141826>.
262. Bigley AB, Baker FL, Simpson RJ. Cytomegalovirus: an unlikely ally in the fight against blood cancers? *Clin Exp Immunol* 2018;193(3):265–274. <https://doi.org/10.1111/cei.13152>.
263. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D. On the Way to Become a Natural Killer Cell. *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>.
264. Thomas LM, Peterson ME, Long EO. Cutting Edge: NK Cell Licensing Modulates Adhesion to Target Cells. *The Journal of Immunology* 2013;191(8):3981–3985. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301159>.
265. Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Stamatoyannopoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(16):9150–9155. <https://doi.org/10.1073/pnas.160159597>.
266. Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L, et al. Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Current Biology* 1996;6(7):839–847. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00607-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00607-3).
267. MacCorkle RA, Freeman KW, Spencer DM. Synthetic activation of caspases: Artificial death switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3655–3660. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3655>.
268. Yan J, Zhou Y, Chen DX, et al. Effects of mitochondrial translocation of telomerase on drug resistance in hepatocellular carcinoma cells. *J Cancer* 2015;6(2):151–159. <https://doi.org/10.7150/jca.10419>.
269. Julia A. Wagner, Pamela Wong, Timothy Schappe, ..., Nermina Saucier, Megan A. Cooper TAF. Stage-Specific Requirement for Eomes in Mature NK Cell Homeostasis and Cytotoxicity. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107720>
270. Sundin T, Peffley DM, Hentosh P. Disruption of an hTERT – mTOR – RAPTOR protein complex by a phytochemical perillyl alcohol and rapamycin. *Mol Cell Biochem* 2013;97–104. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1532-3>.
271. Dogan F, Avci CB. Correlation between telomerase and mTOR pathway in cancer stem cells. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.09.072>

272. Durovic BM, Grählert J, Devine OP, Akbar AN, Hess C. CD56 - negative NK cells with impaired effector function expand in CMV and EBV co - infected healthy donors with age. *Aging* 2019;11(2):724–740. <https://doi.org/10.18632/aging.101774>.
273. Ma Y, Li X, Kuang E. Viral evasion of natural killer cell activation. *Viruses* 2016;8(4). <https://doi.org/10.3390/v8040095>.
274. Hennessy RJ, Hodgkin PD, Pham K, Delconte R, Rautela J, Huntington ND. Quantifying NK cell growth and survival changes in response to cytokines and regulatory checkpoint blockade helps identify optimal culture and expansion conditions. *JBL* 2019;(January):1341–1354. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA0718-296R>.
275. Akincilar SC, Chan CHT, Ng QF, Fidan K, Tergaonkar V. Non-canonical roles of canonical telomere binding proteins in cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021;78(9):4235–4257. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03783-0>.
276. Huaping Chen, Yuanyuan Li and TOT. Strategies Targeting Telomerase Inhibition. *Mol Biotechnol* 2009;41(2):194–199. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9117-9>.
277. Haendeler J, Dröse S, Büchner N, et al. Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(6):929–935. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.185546>.
278. Palamarchuk AI, Kovalenko EI, Streltsova MA. 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). <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030650>.
279. Gabellini C, Antonelli A, Petrinelli P, et al. Telomerase activity, apoptosis and cell cycle progression in ataxia telangiectasia lymphocytes expressing TCL1. *Br J Cancer* 2003;89(6):1091–1095. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601213>.
280. Drobyshev A, Modestov A, Suntsova M, et al. Pan-cancer experimental characteristic of human transcriptional patterns connected with telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression status. *Front Genet* 2024;(May):1–22. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1401100>.
281. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes : unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* 2004;29(8):409–417. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.06.006>.
282. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, Mcdermott MG. The harmonizome : a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database* 2016;1–16. <https://doi.org/10.1093/database/baw100>.
283. Masutomi K, Possemato R, Wong JMY, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(23):8222–8227. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503095102>.
284. Aravinthan A. Cellular senescence : a hitchhiker ’ s guide. *Hum Cell*. <https://doi.org/10.1007/s13577-015-0110-x>

285. Wang J, Xia C, Pu M, et al. Silencing of CDCA5 inhibits cancer progression and serves as a prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2018;1875–1884. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6579>.
286. Mao Z, Liu C, Lin X, Sun B, Su C. PPP2R5A: A multirole protein phosphatase subunit in regulating cancer development. *Cancer Lett*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.024>
287. Shani Ben-Ari Fuchs, Iris Lieder, Gil Stelzer, Yaron Mazor, Ella Buzhor SK, Yoel Bogoch, Inbar Plaschkes, Alina Shitrit, 2 Noa Rappaport, Asher Kohn, Ron Edgar, Liraz Shenhav, Marilyn Safran, Doron Lancet, Yaron Guan-Golan, David Warshawsky and RS. An Integrative Gene Set Analysis Tool for Next Generation Sequencing, RNAseq and Microarray Data. 2016;20(3):139–151. <https://doi.org/10.1089/omi.2015.0168>.
288. Kovatcheva M, Liao W, Klein ME, et al. ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00540-5>
289. Tvardovskiy A, Schw V, Kempf SJ, Rogowska-wrzesinska A, Jensen ON. Accumulation of histone variant H3 . 3 with age is associated with profound changes in the histone methylation landscape. *Nucleic Acids Res* 2017;45(16):9272–9289. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx696>.
290. Liu J, Zhang X, Yan X, Sun MEI, Fan Y, Huang Y. Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncol Lett* 2019;(17):95–102. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9634>.
291. Sun X, Kaufman PD. Ki-67 : more than a proliferation marker. *Chromosoma*. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
292. Lim SNJ. Essential role of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in immune cell development. *Arch Pharm Res* 2016;4. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0854-1>.
293. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008;26:535–584. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>.
294. Zhang X, Yin Z, Wu J, Xiang X, Zou D, Wang G, Fu J, Lan P, Minze LJ, Li XC CW. IRF4 expression by NK precursors predetermines exhaustion of NK cells during tumor metastasis. *Nat Immunol* 2025;26(7):40524016. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-36667-4>.
295. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 2001;97(10):3146–3151. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.10.3146>.
296. Alshelaiel R, Alkushi A. In silico analysis of CSF2RB from cancer genomic databases reveals a heterogeneous role in different breast cancer subtypes. *Front Bioinform* 2025;(August):1–19. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2025.1606828>.
297. Cuturi MC, Aneg6n I, Sherman F, et al. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* 1989;569–583. <https://doi.org/10.1084/jem.169.2.569>.
298. Carnevalli LS, Ghadially H, Barry ST. Therapeutic Approaches Targeting the Natural Killer-Myeloid Cell Axis in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2021;12(April):1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.633685>.

299. Li K, Ma L, Sun Y, et al. The immunotherapy candidate TNFSF4 may help the induction of a promising immunological response in breast carcinomas. *Sci Rep* 2021;1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98131-4>.
300. Cella M, Otero K, Colonna M. Expansion of human NK-22 cells with IL-7, IL-2, and IL-1 β reveals intrinsic functional plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(24):10961–10966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005641107>.
301. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA. CSF1 / CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T Cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models . <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3723>
302. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014;(6):1582–1592. <https://doi.org/10.1002/eji.201344272>.
303. Regis S, Caliendo F, Dondero A, et al. TGF- β 1 downregulates the expression of CX3CR1 by inducing miR-27a-5p in primary human NK cells. *Front Immunol* 2017;8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00868>.
304. Helden MJG Van, Zaiss DMW, Sijts AJAM. CCR2 Defines a Distinct Population of NK Cells and Mediates Their Migration during Influenza Virus Infection in Mice. *PLoS One* 2012;7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052027>.
305. He J, He Y, Biao R, Wei Y, Dong Z, Du J. STYK1 mediates NK cell anti-tumor response through regulating CCR2 and trafficking. *J Transl Med* 2024;943. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05718-2>.
306. Jamali A, Hadjati J, Madjd Z, et al. Highly Efficient Generation of Transgenically Augmented CAR NK Cells Overexpressing CXCR4. *Front Immunol* 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02028>.
307. Ullah TR. The role of CXCR4 in multiple myeloma : Cells ' journey from bone marrow to beyond. *J Bone Oncol* 2019;17(June):100253. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2019.100253>.
308. Angelo LS, Hogg GD, Abeynaike S, Bimler L, Vargas-herandez A, Paust S. Phenotypic and Functional Plasticity of CXCR6 + Peripheral Blood NK Cells. *Front Immunol* 2022;12(January):1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.810080>.
309. Chen W, Zou F, Song T, et al. Comprehensive analysis reveals XCL2 as a cancer prognosis and immune infiltration-related biomarker. *Aging (Albany NY)* 2023;15(21):11891–11917. <https://doi.org/10.18632/aging.205156>.
310. Hematol A, Gutiérrez-aguirre CH, Flores-jiménez JA, et al. The prognostic significance of serum XCL1 concentration in patients with acute lymphoblastic leukemia: a pilot study. *Ann Hematol* 2017;2015–2024. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3142-3>.
311. Mukaida N, Sasaki SI BT. CCL4 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 2020;32060843. https://doi.org/10.1007/978-3-030-36667-4_3.
312. Sang Y, Kong P, Zhang S, et al. SGK1 in Human Cancer: Emerging Roles and Mechanisms. *Front Oncol* 2021;608722. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.608722>.

313. Thomis DC, Markt S, Bonini C, et al. A Fas-based suicide switch in human T cells for the treatment of graft-versus-host disease. *Blood* 2001;97(5):1249–1257. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1249>.
314. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ* 2018;25(3):486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
315. Viant C, Guia S, Hennessy RJ, et al. Cell cycle progression dictates the requirement for BCL2 in natural killer cell survival. *Journal of Experimental Medicine* 2017;214(2):491–510. <https://doi.org/10.1084/jem.20160869>.
316. Yuan Y, Ren H, Li Y, Qin S, Yang X, Tang C. Cell-to-cell variability in inducible Caspase9-mediated cell death. *Cell Death Dis* 2022;13(1). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04468-z>.
317. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol* 2022;14. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac074>.
318. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* 2017;36(28):3943–3956. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.502>.
319. Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 2008;7(8):1036–1046. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5783>.
320. Chu Z-L, Mckinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc Nucl Acad Sci* 1997;94:10057–10062. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10057>.
321. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 2008;4(1):0124–0138. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040010>.
322. Katoh M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). *Int J Mol Med* 2018;42(2):713–725. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3689>.
323. Cui LX, Tian YQ, Hao HS, et al. Knockdown of ASH1L methyltransferase induced apoptosis inhibiting proliferation and H3K36 methylation in bovine cumulus cells. *Theriogenology* 2021;161:65–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.11.007>.
324. Kim HM, Kang B, Park S, et al. Forkhead box protein D2 suppresses colorectal cancer by reprogramming enhancer interactions. *Nucleic Acids Res* 2023;51(12):6143–6155. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad361>.
325. Yu S, Yang Y, Yang H, et al. Pancancer analysis of oncogenic BARX2 identifying its prognostic value and immunological function in liver hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2023;13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34519-8>.
326. Stevens TA, Iacovoni JS, Edelman DB, Meech R. Identification of Novel Binding Elements and Gene Targets for the Homeodomain Protein BARX2. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279(15):14520–14530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310259200>.

327. Chen Y, Gao L, Lin T, et al. C/EBPZ modulates the differentiation and proliferation of preadipocytes. *Int J Obes* 2022;46(3):523–534. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-01020-z>.
328. Imbriano C, Bolognese F, Gurtner A, Piaggio G, Mantovani R. HSP-CBF is an NF-Y-dependent coactivator of the heat shock promoters CCAAT boxes. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(28):26332–26339. <https://doi.org/10.1074/jbc.m101553200>.
329. Zheng L, Pan H, Li S, et al. Sequence-Specific Transcriptional Corepressor Function for BRCA1 through a Novel Zinc Finger Protein, ZBRK1. *Mol Cell* 2000;6:757–768. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00075-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00075-7).
330. Koedoot E, van Steijn E, Vermeer M, et al. Splicing factors control triple-negative breast cancer cell mitosis through SUN2 interaction and sororin intron retention. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2021;40(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01863-4>.
331. Liu M, Yang L, Liu X, et al. HNRNPH1 Is a Novel Regulator Of Cellular Proliferation and Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 2021;11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.682859>.
332. Hofmann JC, Husedzinovic A, Gruss OJ. The function of spliceosome components in open mitosis. *Nucleus* 2010;1(6):447–459. <https://doi.org/10.4161/nucl.1.6.13328>.
333. Salib A, Jayatilleke N, Seneviratne JA, et al. MYCN and SNRPD3 cooperate to maintain a balance of alternative splicing events that drives neuroblastoma progression. *Oncogene* 2024;43(5):363–377. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02897-y>.
334. Song X, Wan X, Huang T, et al. SRSF3-regulated RNA alternative splicing promotes glioblastoma tumorigenicity by affecting multiple cellular processes. *Cancer Res* 2019;79(20):5288–5301. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1504>.
335. Xiong J, Chen Y, Wang W, Sun J. Biological function and molecular mechanism of SRSF3 in cancer and beyond (Review). *Oncol Lett* 2022;23(1). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13139>.
336. He X, Zhang P. Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) regulates homologous recombination-mediated DNA repair. *Mol Cancer* 2015;14(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0422-1>.
337. Naguib A, Sandmann T, Yi F, Watts RJ, Lewcock JW, Dowdle WE. SUPT4H1 Depletion Leads to a Global Reduction in RNA. *Cell Rep* 2019;26(1):45-53.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.004>.
338. Yao Z, Hu K, Huang H, et al. shRNA-mediated silencing of the RFC3 gene suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Int J Mol Med* 2015;36(5):1393–1399. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2350>.
339. Yuan TM, Liang RY, Chueh PJ, Chuang SM. Role of ribophorin II in the response to anticancer drugs in gastric cancer cell lines. *Oncol Lett* 2015;9(4):1861–1868. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2900>.
340. Sari G, Rock KL. Tumor immune evasion through loss of MHC class-I antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2023;83. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102329>.

341. Alfaidi M, Scott ML, Orr AW. Sinner or Saint?: Nck Adaptor Proteins in Vascular Biology. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.688388>.
342. Song T, Zhang H. RBM8A Depletion Decreases the Cisplatin Resistance and Represses the Proliferation and Metastasis of Breast Cancer Cells via AKT/mTOR Pathway. *Breast Journal* 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4576789>.
343. Lu CC, Lee CC, Tseng CT, Tarn WY. Y14 governs p53 expression and modulates DNA damage sensitivity. *Sci Rep* 2017;7. <https://doi.org/10.1038/srep45558>.
344. Perrino C, Feliciello A, Schiattarella GG, et al. AKAP121 downregulation impairs protective cAMP signals, promotes mitochondrial dysfunction, and increases oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2010;88(1):101–110. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq155>.
345. Merrill RA, Dagda RK, Dickey AS, et al. Mechanism of neuroprotective mitochondrial remodeling by pka/akap1. *PLoS Biol* 2011;9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000612>.
346. Sidramagowda Patil S, Soundararajan R, Fukumoto J, et al. Mitochondrial Protein Akap1 Deletion Exacerbates Endoplasmic Reticulum Stress in Mice Exposed to Hyperoxia. *Front Pharmacol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.762840>.
347. Zhang X, Yin M, Hu J. Nucleotide excision repair: a versatile and smart toolkit. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2022;54(6):807–819. <https://doi.org/10.3724/abbs.2022054>.
348. Zhao JY, Yuan XK, Luo RZ, et al. Phospholipase A and acyltransferase 4/retinoic acid receptor responder 3 at the intersection of tumor suppression and pathogen restriction. *Front Immunol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1107239>.
349. Matherne MG, Phillips ES, Embrey SJ, Burke CM, Machado HL. Emerging functions of C/EBP β in breast cancer. *Front Oncol* 2023;13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1111522>.
350. Minis A, Rodriguez JA, Levin A, et al. The proteasome regulator PI31 is required for protein homeostasis, synapse maintenance, and neuronal survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911921116/-/DCSupplemental>
351. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia* 200AD;2:291–299. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900101>.