

**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

Алексеева Надежда Алексеевна

**«NK-клетки с адаптивными свойствами
как основа для создания эффекторов
с повышенным тропизмом к солидным опухолям»**

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Коваленко Елена Ивановна

Москва, 2026 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Популяционное разнообразие НК-клеток.....	14
1.1.1. Основные рецепторы НК-клеток и их лиганды	15
1.1.2. Функциональные характеристики НК-клеток.....	25
1.1.3. Группы НК-клеток и их основные характеристики.....	29
1.2. Роль НК-клеток в микроокружении солидных опухолей	33
1.2.1. Опухоль-ассоциированные факторы, снижающие цитотоксическую активность НК-клеток.....	33
1.2.2. Субпопуляции НК-клеток в ТМЕ обладают различной чувствительностью к супрессии функций.....	35
1.3. Терапия опухолей с применением НК-клеток.....	36
1.3.1. Роль НК-клеток при таргетной терапии опухолей антителами, специфичными к опухоль-ассоциированному антигену	37
1.3.2. Блокирование молекул-чекпойнтов как подход к повышению НК-клеточного противоопухолевого ответа	38
1.3.3. Генетически модифицированные CAR-НК-клетки как агенты против HER2-экспрессирующих опухолей.....	38
1.4. Методы накопления НК-клеток <i>in vitro</i> для терапевтического применения.....	41
1.4.1. Стимуляция НК-клеток <i>in vitro</i> без фидерных клеток.....	41
1.4.2. Стимуляция НК-клеток посредством фидерных клеток <i>in vitro</i>	42
1.4.3. Презентация пептидов фидерными клетками <i>in vitro</i>	43
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Материалы.....	44
2.1.1. Растворы и культуральные среды	44
2.1.2. Антитела	44
2.1.3. Коммерческие наборы.....	47
2.1.4. Клеточные линии.....	47
2.2. Методы	48
2.2.1. НК-клетки: получение, фенотипирование, сортировка, культивирование и оценка функциональной активности	48
2.2.2. Сфероидные культуры опухолевых линий: получение и оценка жизнеспособности	54
2.2.3. Получение генетически модифицированных линий фидерных клеток и CAR-НК-клеток.....	55
2.2.4. Инкубация фидерных клеток с пептидами HCMV: синтез пептидов и подбор условий инкубации.....	57
2.2.5. Статистический анализ и обработка данных	58
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1 НК-клетки как агенты против опухолевых сфероидов	59
3.1.1. Получение сфероидов HER2-экспрессирующих опухолевых линий.....	59
3.1.2. НК-клетки периферической крови и клетки линии NK-92 обладают различной цитотоксической активностью в зависимости от типа опухолевых сфероидов	60
3.1.3. Периферические НК-клетки при коинкубации с опухолевыми сфероидами увеличивают продукцию IFN γ , TNF и GM-CSF.....	64
3.1.4. Периферические НК-клетки с различной интенсивностью дегранулируют при коинкубации со сфероидом SKOV-3, BT-474 и MCF7	65

3.1.5. Периферические НК-клетки задействуют в распознавании опухолевых мишеней различные оси «рецептор-лиганд»	67
3.2. Пролиферативная активность и стабильность фенотипа НК-клеток, коэкспрессирующих KIR2DL2/3 и NKG2C	74
3.2.1 Экспрессия KIR2DL2/3 и NKG2C в популяции НК-клеток ассоциирована с серологическим статусом индивидов к HCMV	74
3.2.2. CD57-негативные НК-клетки, коэкспрессирующие KIR2DL2/3 и NKG2C, характеризуются низкой частотой клонообразования, однако формируют крупные клоны	76
3.2.3. НК-клетки, коэкспрессирующие KIR2DL2/3 и NKG2C, отличаются повышенной стабильностью экспрессии NKG2C	78
3.2.4. В ходе экспансии <i>in vitro</i> CD57 ⁻ НК-клетки приобретают экспрессию CD57 <i>de novo</i>	80
3.3. Презентация пептида HCMV <i>in vitro</i> как инструмент накопления НК-клеток с адаптивным фенотипом, коэкспрессирующих KIR2DL2/3 и NKG2C	82
3.3.1. Получение HLA-E-экспрессирующих фидерных клеток и подбор условий инкубации с пептидами HCMV	82
3.3.2. Пролиферативный ответ bulk-культур и CD57-негативных культур НК-клеток на презентацию пептида HCMV <i>in vitro</i>	85
3.3.3. Интенсивность пролиферации НК-клеток в ответ на LFL ассоциирована с экспрессией маркеров <i>ex vivo</i>	87
3.3.4. Презентация пептида LFL индуцирует накопление НК-клеток с адаптивным фенотипом в bulk-культурах	89
3.3.5. Bulk-культуры, которым был презентируем пептид, отличаются сниженной цитокин-индуцированной функциональной активностью	91
3.4. Накопление клеток KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ при презентации пептида LFL ассоциировано с фенотипом <i>ex vivo</i>	92
3.4.1. Клетки CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ обладают наибольшей пролиферативной активностью среди NKG2C ⁺ популяций, однако различия нивелируются при презентации пептида LFL	93
3.4.2. Адаптивноподобные клетки CD57 ⁺ KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ отвечают на презентацию пептида LFL более выраженной экспансией	95
3.4.3. Пролиферативная активность KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ НК-клеток при презентации пептида LFL ассоциирована с экспрессией KIR2DL2/3, NKG2C и NKG2A <i>ex vivo</i>	97
3.4.4. Высокая экспрессия NKG2C <i>de novo</i> и высокая стабильность экспрессии NKG2C наблюдается в KIR2DL2/3-позитивных субпопуляциях НК-клеток	99
3.4.5. LFL-ассоциированная повышенная стабильность экспрессии NKG2C наблюдается в популяции низкодифференцированных клеток CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ⁻ NKG2C ⁺	100
3.4.6. Презентация LFL приводит к повышенной экспрессии KIR2DL2/3 <i>de novo</i> в популяции CD57 ⁻ NKG2C ⁺ НК-клеток	101
3.4.7. Экспрессия NKG2C <i>de novo</i> и стабильность экспрессии KIR2DL2/3 в популяции CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁻ ассоциированы с высокой долей клеток HLA-DR ⁺ <i>ex vivo</i>	103
3.4.8. Культуры CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ⁺ НК-клеток, полученные при презентации пептида LFL, отличаются повышенной продукцией IFN γ	104
3.4.9. Презентация пептида LFL не приводит к снижению дегрануляционного потенциала НК-клеток в NKG2C-позитивных культурах	105
3.4.10. LFL-ассоциированная высокая продукция IFN γ в культурах субпопуляции CD57 ⁻ KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁻ связана с высоким содержанием клеток NKG2C ⁺ <i>ex vivo</i>	106
3.4.11. С высокой долей клеток HLA-DR ⁺ <i>ex vivo</i> ассоциирована сниженная дегрануляционная активность в культурах субпопуляций KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺	107

3.4.12. Повышенная цитокин-зависимая функциональная активность KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ NK-клеток ассоциирована с повышенным содержанием NKG2A ⁺ клеток <i>ex vivo</i>	108
3.4.13. LFL-стимулированные NK-клетки KIR2DL2/3 ⁺ NKG2C ⁺ обладают повышенной цитотоксической активностью в отношении HLA-E ⁺ опухолевых сфероидов.....	109
3.5. NK-клетки, коэкспрессирующие NKG2C и NKG2A – особая субпопуляция, сочетающая адаптивные свойства и высокую пролиферативную активность.....	111
3.5.1. Размер субпопуляции NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ NK-клеток не ассоциирован с титром антител к HCMV в сыворотке крови	112
3.5.2. Профиль экспрессии генов NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ NK-клеток указывает на повышенную адгезию, выраженную миграцию и высокий потенциал к антигенпрезентации	113
3.5.3. NKG2C ⁺ NKG2C ⁺ NK-клетки не уступают адаптивным клеткам в интенсивности ответа на CD16-опосредованную стимуляцию	117
3.5.4. NKG2A-позитивные клетки обладают повышенным пролиферативным потенциалом.....	118
3.5.5. Интенсивная пролиферация NKG2A ⁺ NK-клеток сопровождается потерей экспрессии NKG2C и CD57	119
3.5.6. Презентация пептида LFL не приводит к подавлению пролиферации NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ NK-клеток и индуцирует активную пролиферацию в культурах, полученных от супердоноров.....	120
3.5.7. Проллиферативная активность LFL-культур NKG2C ⁺ NKG2A ^{+/−} ассоциирована с экспрессией NKG2A в этих культурах.....	122
3.5.8. Активация CD57 ⁺ NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ NK-клеток <i>in vitro</i> при презентации пептидов HCMV приводит к изменениям в транскрипционном профиле генов.....	123
3.5.9. NK-клетки CD57 ⁺ NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ , которым был презентируем пептид LFL, демонстрируют повышенную цитокин-зависимую продукцию IFN γ	124
3.5.10. Культуры CD57 ⁺ NKG2C ⁺ , которым был презентируем LFL, отличаются повышенной CD16-опосредованной дегрануляцией	125
3.5.11. CD57 ⁺ NKG2C ⁺ NKG2A ⁺ NK-клетки, стимулированных LFL или LLL, обладают различиями в профиле экспрессии генов.....	127
3.6. NK-клетки, модифицированные рецептором CAR, специфически распознающим опухоль-ассоциированную молекулу HER2.....	130
3.6.1. Получение HER2-CAR-NK-клеток с антиген-распознающими доменами, специфичными к домену I и IV HER2.....	130
3.6.2. HER2-CAR-NK-клетки обладают повышенной цитотоксичностью против 2D- и 3D-культур HER2 ⁺ опухолей.....	132
3.6.3. HER2-CAR-NK-клетки активно дегранулируют при коинкубации с HER2-экспрессирующими мишенями	134
3.6.4. HER2-CAR-NK-клетки с антигенраспознающим доменом G3 обладают более выраженной цитотоксичностью.....	135
3.6.5. NKG2C-позитивные NK-клетки обладают более высокой чувствительностью к ретровирусной трансдукции по сравнению с NKG2C-негативными.....	137
4. ОБСУЖДЕНИЕ	141
4.1. Оси «рецептор-лиганд», обуславливающие активацию и противоопухолевый цитотоксический ответ NK-клеток различных стадий цитотоксической зрелости, направленный на опухолевые сфероиды	141
4.2. NK-клетки, коэкспрессирующие ингибирующие рецепторы KIR2DL2/3 и NKG2C: пролиферативная активность, стабильность фенотипа, ответ на пептид LFL, HLA-E-направленная цитотоксическая активность	145

4.3. NK-клетки, коэкспрессирующие NKG2A и NKG2C: пролиферативная активность, сходство с адаптивными NK-клетками, ответ на пептид LFL	149
4.4. CAR-NK-клетки с повышенным тропизмом к HER2-экспрессирующим опухолям	152
ВЫВОДЫ	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	156
БЛАГОДАРНОСТИ	157
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	158
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	160

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные опухоли в настоящее время являются одной из наиболее часто встречающихся причин смертности, в том числе в зрелом и молодом возрасте. Консервативные подходы к лечению рака, такие как хирургическое вмешательство, химио- и радиотерапия, могут приводить к инвалидизации и неизбежному поражению здоровых функциональных тканей. Таргетная терапия опухолей позволяет сохранять здоровые ткани и, как следствие, способствует повышению качества жизни пациента. В настоящее время активно разрабатывается широкий спектр подходов к таргетной терапии опухолей, в частности, совершенствуется такой метод лечения как адоптивная терапия модифицированными иммунными клетками, несущими химерный антигенный рецептор CAR, специфичный к опухоль-ассоциированным антигенам[1–3]. В качестве противораковых агентов широко применяются Т-лимфоциты, однако аллогенные NK-клетки характеризуются большей степенью безопасности, поскольку не вызывают реакции «трансплантат против хозяина»[4,5]. Преимущество NK-клеток обусловлено экспрессией широкого разнообразия активирующих и ингибирующих рецепторов, помимо рецепторов CAR. Активирующие рецепторы натуральной цитотоксичности NCR и NKG2D способны распознавать стресс-ассоциированные паттерны на поверхности опухолевых клеток, что способствует повышению avidности связывания эффекторов с мишенями. Ряд ингибирующих рецепторов к молекулам HLA класса I (HLA-I) предотвращает цитотоксическую реакцию аллогенных NK-клеток против здоровых тканей реципиента, для которых может быть характерен низкий уровень экспрессии опухолевого антигена. Например, экспрессия опухоль-ассоциированного антигена HER2 характерна для легочных тканей, что при HER2-CAR-T-клеточной терапии может приводить к развитию реакции цитокинового шторма[6]. CAR-NK-клетки уже зарекомендовали себя как эффективные агенты против гематологических опухолей, в частности, CD19-CAR-NK-клетки способны были успешно элиминировать CD19-позитивные опухоли[7,8]. Однако солидные опухоли с трудом поддаются лечению по ряду причин. Трехмерные опухолевые структуры отличаются высокой плотностью клеточных контактов, гетерогенностью, экспрессией супрессирующих растворимых и мембран-связанных факторов в опухолевом микроокружении. Эти свойства негативно влияют на распознавание опухолевых клеток и жизнеспособность CAR-NK-клеточных эффекторов, в связи с чем важна разработка новых подходов к повышению эффективности адоптивной терапии NK-клетками. Популяция NK-клеток характеризуется высокой степенью гетерогенности, поэтому при создании эффекторов на их основе особенно важен выбор субпопуляции с выраженной жизнеспособностью, цитотоксичностью и высоким пролиферативным потенциалом *in vitro*.

Согласно новейшей классификации NK-клеток, основанной на транскриптомном анализе, NK-клетки подразделяются на три кластера: цитотоксические эффекторы NK1, регуляторные слабодифференцированные NK2 и более дифференцированные NK3, включающие пул адаптивных NK-клеток со свойствами клеток памяти[9]. Одни из наиболее изученных адаптивных NK-клеток формируются в ходе цитомегаловирусной инфекции (HCMV) и обладают фенотипом $CD57^+NKG2C^+$ [10]. Они характеризуются продолжительной циркуляцией в организме и способностью элиминировать клетки гематологических опухолей[11]. Персистенция таких клеток после пересадки костного мозга пациентам с лейкозом ассоциирована со сниженной вероятностью рецидива[12–14]. Благодаря этим свойствам адаптивные NK-клетки являются крайне привлекательной основой для создания CAR-модифицированных противоопухолевых эффекторов. Вместе с тем, клетки $CD57^+NKG2C^+$ характеризуются сниженной способностью отвечать пролиферацией на растворимые стимулы, что затрудняет их накопление *in vitro*. Чтобы преодолеть это значимое препятствие, актуально внедрять новые подходы к накоплению клеток-эффекторов с повышенной жизнеспособностью и цитотоксичностью.

При инфекции HCMV экспансия адаптивных NK-клеток *in vivo* опосредована активирующим рецептором NKG2C, который распознает на поверхности зараженных клеток комплекс молекулы HLA-E с представленным в ее составе пептидом HCMV, гомологичным лидерной последовательности HLA-I[15]. Ингибирующий рецептор NKG2A также распознает комплекс HLA-E+пептид, и оверэкспрессия HLA-E на поверхности некоторых опухолей приводит к подавлению NK-клеточного противоопухолевого ответа[16]. В связи с этим многообещающим подходом к элиминации HLA-E-экспрессирующих опухолей является применение в адоптивной терапии NK-клеток, способных переключать ингибирующий сигнал NKG2A на активирующий NKG2C[17]. В соответствии с этими наблюдениями, презентация NK-клеткам комплекса HLA-E+пептид *in vitro* может способствовать накоплению клеток $NKG2C^+$ с адаптивными свойствами и служить как метод усиления NK-клеточного иммунного ответа на HLA-E-экспрессирующие опухоли[15,18]. Ранее продемонстрировано, что фидерные клетки, экспрессирующие комплекс HLA-E+пептид, индуцируют выраженный пролиферативный ответ $NKG2C^+$ NK-клеток *in vitro*, а также способствуют повышению в них продукции IFN γ [19,20]. Также нами было показано, что NK-клетки в условиях активации фидерными клетками K562-mbIL21 демонстрируют пластичность фенотипа и функциональных свойств[21,22]. Кроме того, были детектированы NK-клетки, которые обладают фенотипическим и функциональным сходством с адаптивными NK-клетками, однако сохраняют высокий пролиферативный потенциал[23]. До сих пор не было известно, в

каких именно субпопуляциях NK-клеток наиболее выражена патоген-ассоциированная модуляция фенотипа и выраженная пролиферация при презентации им комплекса HLA-E+пептид. В рамках этой работы был выполнен поиск субпопуляций NK-клеток, отвечающих антигензависимой пролиферацией на презентацию комплекса HLA-E+пептид, и получение CAR-NK-клеток с повышенным тропизмом к HER2-позитивным солидным опухолям молочной железы и яичников. Настоящая работа позволила получить эффекторы на основе NK-клеток и охарактеризовать субпопуляции, которые могут обладать наиболее выраженным пролиферативным потенциалом и противоопухолевым эффектом. Полученные в работе результаты способствуют расширению знаний в области антиген-зависимого NK-клеточного ответа.

Цель и задачи

Целью данной работы являлся поиск и характеристика NK-клеточных субпопуляций, способных отвечать на стимуляцию презентирующими пептид HCMV фидерными клетками выраженной пролиферацией *in vitro* и формированием пула адаптивноподобных клеток с возможностью последующей модификации CAR-рецептором.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить оси взаимодействия NK-клеток с опухолевыми сфероидными HER2-экспрессирующими клеточными линиями и оценить вклад различных субпопуляций, в том числе NKG2C⁺ клеток с адаптивным фенотипом, в противоопухолевый цитотоксический ответ.
2. Получить фидерные клетки, презентирующие пептид HCMV в составе HLA-E, и оценить их пептид-зависимое влияние на пролиферативную активность, фенотип и функциональные характеристики NK-клеток.
3. Оценить пролиферативную активность, фенотипические свойства и функциональные характеристики лицензированных KIR⁺ и NKG2A⁺ NK-клеток, экспрессирующих NKG2C, при презентации им пептида HCMV в составе HLA-E.
4. Выявить связь между экспрессией HCMV-модулируемых фенотипических маркеров NKG2C, KIR2DL2/3 и HLA-DR в NK-клетках *ex vivo* и эффективностью накопления NK-клеток *in vitro*, а также с их ответом на пептид HCMV в составе HLA-E.
5. Модифицировать NK-клетки конструкцией, несущей ген HER2-CAR, и оценить цитотоксическую активность полученных NK-клеток, в том числе с адаптивным фенотипом, против HER⁺ опухолевых мишеней.

Научная новизна

В рамках данной работы проведен поиск субпопуляций НК-клеток, способных отвечать на презентацию комплекса HLA-E+пептид HCMV выраженной пролиферацией и накоплением клеток с адаптивным фенотипом. Ранее была выявлена субпопуляция НК-клеток, обладающих меньшей степенью дифференцировки по сравнению с адаптивными клетками, однако демонстрирующими ряд свойств, характерных для адаптивного состояния. Для НК-клеток ранних стадий дифференцировки характерна экспрессия рецептора NKG2A, также известно, что популяция клеток, коэкспрессирующих NKG2C и NKG2A, наблюдается в крови индивидов, способных сохранять низкий титр вируса иммунодефицита (HIV) в отсутствие ретровирусной терапии (HIV elite controllers). Мы показали, что популяция НК-клеток, коэкспрессирующих NKG2C и NKG2A, представляет особый пул эффекторов с высоким пролиферативным потенциалом, сохраняющих ряд адаптивных свойств и демонстрирующих функциональный ответ, ассоциированный с презентацией пептида HCMV. Также выявлены ассоциации между накоплением *in vitro* НК-клеток, коэкспрессирующих ингибирующий рецептор KIR и NKG2C, и фенотипом НК-клеток *ex vivo*. В субпопуляции НК-клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ наблюдалась более выраженная пролиферация в ответ на презентацию пептида HCMV, ассоциированная с высокой экспрессией NKG2A *ex vivo*. Во фракции менее дифференцированных клеток CD57⁻KIR⁺ наблюдалась экспрессия NKG2C *de novo*, характерная для НК-клеток, полученных из крови доноров с высокой долей клеток HLA-DR⁺. Также показано, что клетки, коэкспрессирующие KIR и NKG2C, обладают повышенной цитотоксичностью в отношении HLA-E-экспрессирующих опухолевых мишеней, более выраженной в культурах, которым был презентируем пептид HCMV. Посредством ретровирусной трансдукции впервые получены HER2-направленные CAR-NK-эффекторы с антигенраспознающими доменами на основе молекул DARPIn G3 и 9-29, в том числе на основе НК-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в получении знаний о влиянии презентации пептида HCMV в составе HLA-E на экспансию, фенотип и функциональные характеристики НК-клеток различной степени дифференцировки. В перспективе систему стимуляции HLA-E-презентирующими фидерными клетками можно использовать для моделирования НК-клеточного ответа на вирус- и опухоль-ассоциированные пептиды и, как следствие, для изучения иммунного ответа НК-клеток на измененные клетки и оценки их эффекторных функций: цитотоксической активности, продукции цитокинов и пролиферативного

потенциала. Использование сфероидных культур в качестве мишеней позволяет смоделировать цитотоксическую реакцию НК-клеток в отношении солидных опухолей в системе, более приближенной к *in vivo*, по сравнению с 2D-мишенями.

Практическая значимость работы заключается в разработке подхода к накоплению НК-клеток при презентации им пептида HCMV *in vitro* в контексте HLA-E на поверхности фидерных клеток, что может быть использовано при разработке методов накопления НК-клеток с целью терапевтического применения. Исследование ответа различных НК-клеточных субпопуляций на презентацию комплекса HLA-E+пептид и связи ответа с фенотипом НК-клеток *ex vivo* позволит облегчить подбор как доноров, так и наиболее оптимальных субпопуляций НК-клеток для противоопухолевой терапии. Кроме того, практическая значимость работы заключается в получении знаний о чувствительности различных субпопуляций НК-клеток к ретровирусной трансдукции конструкциями, несущими рецептор CAR, а также цитотоксической активности полученных CAR-NK-эффекторов против 3D-опухолевых мишеней.

Личный вклад автора

Все результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично автором либо при его непосредственном участии. Автор внес определяющий вклад в дизайн экспериментов и их анализ, а также в подготовку материалов для публикации в журналах. В статье [Palamarchuk AI*, Alekseeva NA*, Streltsova MA, Ustiuzhanina MO, Kobzyeva PA, Kust SA, Grechikhina MV, Boyko AA, Shustova OA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. 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, 222, 3326; <https://doi.org/10.3390/ijms222413326>] автором получены данные о пролиферативной активности немодифицированных НК-клеток, о фенотипе клеток *ex vivo* и после пролиферации *in vitro*.

Апробация работы и публикации

По основным материалам диссертации сделан устный доклад на VII Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» а также ряд постерных докладов на VI Национальном конгресса по регенеративной медицине, на XXXIII, XXXIV и XXXVI Международной зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» По теме диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах и 8 тезисов.

Статьи

1. Palamarchuk AI*, **Alekseeva NA***, Streltsova MA, Ustiuzhanina MO, Kobyzeva PA, Kust SA, Grechikhina MV, Boyko AA, Shustova OA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. 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, 222, 3326. <https://doi.org/10.3390/ijms222413326>
2. **Алексеева Н.А.**, Устюжанина М.О., Стрельцова М.А., Гречихина М.В., Луценко Г.В., Коваленко Е.И. Экспансия НК-клеток *in vitro* сопровождается потерей экспрессии ингибирующих рецепторов KIR. *Медицинская иммунология.* 2023;25(3):441-446. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-NCE-2845>
3. **Alekseeva NA**, Streltsova MA, Vavilova JD, Ustiuzhanina MO, Palamarchuk AI, Boyko AA, Timofeev ND, Popodko AI, Kovalenko EI. Obtaining Gene-Modified HLA-E-Expressing Feeder Cells for Stimulation of Natural Killer Cells. *Pharmaceutics.* 2024 Jan 19;16(1):133. doi: 10.3390/pharmaceutics16010133.
4. **Алексеева Н.А.**, Вавилова Ю.Д., Коваленко Е.И. Повышенный пролиферативный ответ высокодифференцированных CD57⁺NKG2C⁺НК-клеток, экспрессирующих NKG2A. *Медицинская иммунология.* 2024;26(5):891-896. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IPR-16778>.
5. **Alekseeva NA**, Boyko AA, Shevchenko MA, Grechikhina MV, Streltsova MA, Alekseeva LG, Sapozhnikov AM, Deyev SM, Kovalenko EI. Three-Dimensional Model Analysis Revealed Differential Cytotoxic Effects of the NK-92 Cell Line and Primary NK Cells on Breast and Ovarian Carcinoma Cell Lines Mediated by Variations in Receptor-Ligand Interactions and Soluble Factor Profiles. *Biomedicines.* 2024 Oct 20;12(10):2398. doi: 10.3390/biomedicines12102398.
6. **Алексеева Н.А.**, Стрельцова М.А., Вавилова Ю.Д., Деев С.М., Коваленко Е.И. Трансдуцированные HER2-CAR-NK-клетки проявляют повышенную цитотоксическую активность против HER2-позитивных опухолей // *Российский иммунологический журнал.* - 2025. - Т. 28. - №4. - С. 901-906. doi: 10.46235/1028-7221-17243-HCN.
7. **Alekseeva NA**, Ustiuzhanina MO, Vavilova JD, Streltsova MA, Boyko AA, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. In Search of Adaptive-Like Features of NK Cells Co-Expressing NKG2C and NKG2A. *Immune Netw.* 2026 Jan 22;26(2):e1. doi: 10.4110/in.2026.26.e1. PMID: 42109611; PMCID: PMC13150429.

8. **Alekseeva, N.A.**; Ustiuzhanina, M.O.; Streltsova, M.A.; Vavilova, J.D.; Sapozhnikov, A.M.; Kovalenko, E.I. HLA-E-Directed Accumulation of KIR⁺NKG2C⁺ NK Cells upon HCMV Peptide Presentation In Vitro: Association with the Ex Vivo Phenotype. *Int. J. Mol. Sci.* 2026, 27, 6087. <https://doi.org/10.3390/ijms27136087>.

Тезисы докладов на конференциях (избранные)

1. **Алексеева Н.А.**, Бойко А.А., Коваленко Е.И. Повышенный цитотоксический потенциал CX3CR1⁺ NK-клеток в отношении опухолевых сфероидов реализуется даже при низком уровне экспрессии CX3CL1; Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине [электронный ресурс]; Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024 г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2024. с. 57-58 DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>.
2. **Алексеева Н.А.**, Бойко А.А., Алексеева Л.Г., Гречихина М.В., Коваленко, Е.И. Лицензированные NK-клетки NKG2C⁺ – перспективная основа для создания эффекторов против солидных опухолей, XXXVI международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 2024, с.89.
3. **Алексеева Н.А.**, Паламарчук А.И., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И. Пролиферативная активность потенциальных предшественников адаптивных NK-клеток CD57[–]. В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXXIV Международной зимней молодежной научной школы. Москва, 2022. С. 70.
4. **Alekseeva N.A.**, Kobyzeva P.A., Streltsova M.A., Erokhina S.A., Kovalenko E.I. (2021). KIR-expressing NK cells expand in vitro more intensively than KIR-negative NK cells. *FEBS Open Bio*, 11: P-08.1-33. doi:10.1002/2211-5463.13205.
5. **Алексеева Н.А.**, Кобызева П.А., Стрельцова М.А., Ерохина С.А., Коваленко Е.И. Пластичность NK-клеток in vitro: анализ экспрессии рецепторов KIR2DL2/DL3. В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXXIII Международной зимней молодежной научной школы. Москва, 2021. С. 99.
6. Коваленко Е.И., **Алексеева Н.А.**, Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Стрельцова М.А. Гетерогенность пролиферативного ответа NK-клеток в зависимости от стадии дифференцировки при накоплении in vitro; Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине [электронный ресурс]; Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024

- г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2024. 1157 с. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>.
7. Фоменко А.Н., **Алексеева Н.А.**, Вавилова Ю.Д., Алексеева Л.Г., Коваленко Е.И. Сравнение НК-клеточной цитотоксичности в гомотипических и гетеротипических 3D-культурах опухолевых клеток. В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXXVI Международной зимней молодежной научной школы. Москва, 2025. С. 79.
 8. Streltsova MA, Kobzyeva PA, **Alekseeva NA**, Kust SA, Kovalenko EI. CD56^{dim}CD57⁻ NKG2C⁻ human NK cells expressing inhibitory KIRs show high proliferative activity and share phenotypic and functional characteristics with adaptive-like NK cells. Eur. J. Immunol. 2021. 51, S1, 163, P-0145. DOI: 10.1002/eji.202170200.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Популяционное разнообразие НК-клеток

Популяция зрелых НК-клеток, или натуральных киллеров, отличается высокой степенью фенотипического и функционального разнообразия. Эти клетки экспрессируют на своей поверхности широкий спектр молекул, обеспечивающих проведение как стимулирующего, так и ингибирующего сигнала. Таким образом осуществляется реализация адекватного ответа на заданный молекулярный контекст, в том числе в условиях опухолевого микроокружения. Несмотря на то, что НК-клетки относятся к ветви врожденного иммунитета, они обладают функциональным и фенотипическим сходством с клетками адаптивной ветви иммунитета. В частности, подобно CD8⁺Т-лимфоцитам, они способны продуцировать IFN γ , TNF и другие цитокины в ответ на стимул. Тем не менее, НК-клетки отличаются от Т-клеток отсутствием экспрессии Т-клеточных рецепторов (TCR), и экспрессией CD56 в большей части популяции [24–26]. Согласно современной классификации, основанной на транскриптомном анализе, НК-клетки могут быть разделены на три когорты: NK1, NK2, NK3 [9]. Когорты различаются экспрессией транскрипционных факторов, поверхностных маркеров, секретируемых молекул и белков, регулирующих метаболические пути, а также степенью дифференцировки. В процессе созревания паттерн экспрессии рецепторов на поверхности НК-клеток подвергается изменениям, что определяет изменения в их функциональном профиле. Менее зрелые клетки с преимущественно регуляторными свойствами отличаются высоким уровнем экспрессии CD56 (CD56^{bright}), что соответствует когорте NK2 [27]. В ходе дифференцировки наблюдается снижение экспрессии CD56, повышается уровень экспрессии CD16, рецептора к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, который обуславливает участие НК-клеток в элиминации клеток-мишеней, опсонизированных антителами. Также повышается уровень экспрессии ингибирующих рецепторов KIR (KIR – Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor), которые необходимы для функционального лицензирования НК-клеток и накопления ими литических гранул [28–30]. Клетки с высоким уровнем экспрессии KIR и CD16 соответствуют когорте NK1. На поздних стадиях дифференцировки в популяции НК-клеток наблюдается появление экспрессии маркера CD57 и снижение уровня экспрессии ингибирующей молекулы NKG2A, известного чекпойнта в терапии раковых опухолей [31]. Такие клетки являются носителями адаптивно-подобного фенотипа и соответствуют когорте NK3. Однако указанные выше маркеры не являются уникальными для НК-клеток и могут быть обнаружены в популяциях NKT-подобных клеток и Т-клеток. Все описанные когорты участвуют в иммунном ответе в ходе опухолевых заболеваний. Однако опухоли обладают различными спектрами экспрессии

специфических маркеров, и условия в микроокружении этих опухолей могут различаться, что будет влиять на эффективность противоракового ответа той или иной когорты.

1.1.1. Основные рецепторы NK-клеток и их лиганды

Дифференцировка NK-клеток и приобретение ими функциональной активности протекают под воздействием как внутренних факторов организма, так и внешних факторов среды, в том числе вследствие встречи с патогенами. Репертуар NK-клеток в организме зависит от разнообразия патогенов и измененных клеток, с которыми NK-клетки взаимодействовали напрямую или опосредованно в ходе иммунных реакций. Адекватный иммунный ответ NK-клеток в сложившемся клеточном и гуморальном окружении обусловлен конкуренцией внутриклеточных сигналов от активирующих и ингибирующих рецепторов, распознающих зараженные, измененные и здоровые клетки организма. Рецепторы NK-клеток распознают как растворимые факторы – хемокины и цитокины, так и мембранные белки на поверхности других клеток. Суммарный сигнал от всех рецепторов определяют силу и тип функционального ответа, регулируют пролиферативную активность NK-клеток, модулируют поверхностную экспрессию рецепторов, влияют на жизнеспособность.

1.2.1.1 Рецепторы к растворимым молекулам

Один из путей межклеточного взаимодействия основан на обмене гуморальными сигналами. При контакте с патогенами и измененными клетками все клетки организма, включая иммунные, начинают продуцировать растворимые сигнальные молекулы – цитокины и хемокины, которые способствуют регуляции иммунного ответа и клеточного гомеостаза. Паттерн экспрессии рецепторов к хемокинам и цитокинам определяет функциональную активность NK-клеток и их локализацию в организме. Особенно важную роль играет репертуар хемокиновых рецепторов на поверхности тканерезидентных NK-клеток.

Цитокины ветви адаптивного иммунитета

Одними из наиболее важных для жизнедеятельности и дифференцировки NK-клеток являются цитокины, рецепторы к которым обладают общей γ -цепью (γ c): IL-2 и IL-21. После активации Т-лимфоциты начинают продуцировать IL-2 и IL-21, что способствует передаче активирующего сигнала от ветви адаптивного иммунитета к NK-клеткам. IL-2 индуцирует пролиферацию NK-клеток, способствует повышению экспрессии гранзима В и перфорина, матриксных металлопротеаз, а также экспрессии рецепторов KIR *de novo*, что приводит к повышению цитотоксичности и миграционной активности NK-клеток [32,33]. Однако регуляторные Т-клетки (T_{reg}), в том числе в опухолевом микроокружении, могут негативно влиять на цитотоксическую функцию NK-клеток. Обладая высоким уровнем экспрессии высокоаффинного рецептора к IL-2 с цепью IL-2R α (CD25), T_{reg} снижают концентрацию

доступного IL-2 в среде [34]. Тем не менее, НК-клетки в контакте друг с другом способны транспрезентировать друг другу IL-2 и противостоять регуляторному давлению T_{reg} . При стимуляции даже малыми дозами IL-2 на поверхности клеток из НК-клеточного кластера повышается экспрессия CD25, а также наблюдается накопление литических гранул и поляризация микротрубочек [35]. Цитокин IL-21, как и IL-2, регулирует репертуар молекул KIR [36], а в комплексе с IL-2 способствует повышению экспрессии NKG2A, CD25, гранзима В и перфоринов [37]. Стимуляция IL-2+IL-21 в настоящее время широко применяется для индукции экспансии НК-клеток *in vitro*.

Цитокины ветви врожденного иммунитета

Регуляция активности НК-клеток также осуществляется клетками врожденного иммунитета и антиген-презентирующими клетками посредством цитокинов IL-12, и IL-18. Эти цитокины, связываясь с рецепторами на поверхности НК-клеток, стимулируют их пролиферацию и продукцию ими IFN γ . Более того, стимуляция цитокинами врожденного иммунитета способна приводить к формированию пула НК-клеток со свойствами клеток памяти [38,39]. В настоящее время ведется разработка подходов к применению таких НК-клеток в терапии опухолей. Показано, что CAR-НК-клетки, предварительно стимулированные IL-12, IL-15 и IL-18, обладают повышенной противоопухолевой активностью [40]. Однако стимуляция цитокинами врожденного иммунитета приводит к нарушению митофагии в НК-клетках и, как следствие, к накоплению поврежденных митохондрий и снижению выживаемости [41].

Цитокины-супрессоры иммунной реакции

Помимо рецепторов к активирующим цитокинам, НК-клетки также экспрессируют рецепторы к цитокинам-супрессорам иммунных реакций – IL-10 и TGF β . Известно, что делеция рецептора к TGF β приводит к увеличению активности mTOR у НК-клеток. TGF β блокирует активацию киназы mTORC1, центрального регулятора метаболизма и цитотоксической активности НК-клеток. Подавление активности mTORC1 также приводит к снижению экспрессии рецепторов натуральной цитотоксичности NKp30 и NKG2D и рецептора CD16 [42].

IL-10, в свою очередь, подавляет активность Т-хэлперов, дендритных клеток и моноцитов, однако способствует повышению цитотоксической активности НК-клеток. Связывание IL-10 с рецептором на поверхности НК-клеток приводит к активации mTORC1 и, как следствие, приводит к увеличению цитотоксической активности и продукции IFN γ [43].

Рецепторы к хемокинам

Растворимые факторы способны инициировать запуск не только пролиферации и цитотоксической реакции НК-клеток, но также способствовать миграции этих клеток в

лимфоидные ткани, опухоли и сайты воспаления. Миграция NK-клеток происходит по градиенту концентрации хемокинов, восприятие которых обусловлено экспрессией специфических хемокиновых рецепторов. Эти рецепторы играют ключевую роль в регуляции перемещений NK-клеток. В частности, рецепторы CXCR4 и CCR7 регулируют миграцию NK-клеток в лимфоидные органы. Созревание NK-клеток на ранних стадиях дифференцировки проходит в костном мозге, и для менее зрелых NK-клеток характерна экспрессия рецептора CXCR4, лигандом которого является CXCL12 (SDF-1 –Stromal cell-derived factor-1) – хемокин, который продуцируют клетки стромы костного мозга. Таким образом предотвращается выход незрелых NK-клеток в кровоток. В ходе дифференцировки уровень экспрессии CXCR4 на поверхности NK-клеток снижается, что позволяет им мигрировать из ниш костного мозга в другие ткани [44,45]. Также известно, что CAR-NK-клетки с оверэкспрессией CXCR4 при переносе в организм мышей NOD-SCID IL2R γ null (NGS) локализуются в ткани костного мозга, что позволяет им элиминировать опухолевые клетки, сохраняющиеся в нишах костного мозга [46,47]. NK-клетки, экспрессирующие CCR7 на более поздних стадиях созревания, способны мигрировать во вторичные лимфоидные органы [48,49].

Миграция зрелых NK-клеток в сайты воспаления и повреждения тканей осуществляется благодаря экспрессии ряда рецепторов, воспринимающих хемокины, которые продуцируют клетки врожденного иммунитета, эндотелиальные клетки и поврежденные ткани эпителия. Одним из таких хемокинов является IL-8 [50], который NK-клетки распознают посредством рецепторов CXCR1 и CXCR2. Показано, что при ингибировании этих рецепторов в ходе воспалительной реакции нарушается миграция Т- и NK-клеток. Экспрессия CXCR3 позволяет NK-клеткам мигрировать в сайты с высокой экспрессией хемокинов CXCL9/10/11 – места воспаления и опухолевой трансформации. Известно, что экспрессия этих хемокинов индуцируется IFN γ , таким образом, происходит амплификация иммунного сигнала и привлечение новых клеток в сайт иммунной реакции [51–53]. При воспалении также наблюдается повышенная экспрессия CX3CL1 клетками эндотелия, что позволяет высокотоксичным CX3CR1⁺ NK-клеткам выходить из кровотока в ткани. Распознавание мембран-связанного CX3CL1 стимулирует последующую миграцию NK-клеток по градиенту других факторов воспаления, в частности, продуцируемых макрофагами IL-8 и CCL4 [54]. Высокий уровень экспрессии CX3CL1, как мембран-связанной, так и растворимой формы, также наблюдается при опухолевой трансформации, что обуславливает участие CX3CR1⁺ NK-клеток в противоопухолевой реакции.

Функциональный потенциал NK-клеток определяется как набором рецепторов, так и их окружением, сигналы от которого могут способствовать активации или подавлению клеток, а

также их миграции в первичные и вторичные органы, сайты воспаления и опухолевой трансформации. Однако киллерная функция в определенном клеточном окружении осуществляется при непосредственном контакте с измененными клетками и распознавании ряда стресс- и патоген-ассоциированных факторов на их поверхности.

1.2.1.2. Рецепторы к поверхностным молекулам

Помимо растворимых факторов, НК-клетки способны распознавать лиганды на поверхности окружающих клеток – как здоровых клеток организма, так и подвергшихся раковой или вирусной трансформации. Формирование адекватного окружению иммунного ответа осуществляется целым оркестром активирующих и ингибирующих рецепторов из нескольких семейств.

Одним из основных методов распознавания НК-клетками “свой-чужой” является детекция на поверхности окружающих клеток уровня экспрессии молекул HLA класса I. Измененные клетки могут избегать Т-клеточного иммунного надзора, снижая уровень экспрессии HLA-I и избегая презентации Т-клеткам опухоль- или вирус-ассоциированных иммуногенных пептидов. НК-клетки, в свою очередь, экспрессируют на своей поверхности ряд ингибирующих рецепторов, способных распознавать молекулы классические и неклассические HLA-I [55]. Таким образом предотвращается их реактивность в микроокружении здоровых клеток организма. К числу таких рецепторов относятся, например, ингибирующие рецепторы семейства KIR и лектин-подобный рецептор NKG2A. Передача внутриклеточного сигнала осуществляется посредством последовательности ITIM или аналогичной последовательности в составе внутриклеточного домена рецептора [56]. При недостаточном уровне экспрессии HLA-I в микроокружении суммарный ингибирующий внутриклеточный сигнал в НК-клетках снижается. Однако низкого уровня лигандов ингибирующих рецепторов для развития цитотоксической реакции недостаточно.

Для эффективного иммунного ответа и элиминации измененных клеток натуральные киллеры экспрессируют ряд активирующих рецепторов. Внутриклеточные домены этих рецепторов часто не содержат мотивов для передачи сигналов. Для проведения активирующего сигнала необходимы адаптерные молекулы с ITAM-последовательностью. Активирующие рецепторы НК-клеток также относятся к нескольким семействам и могут иметь парный ингибирующий рецептор, обладающий более высокой аффинностью к тому же лиганду. К числу активирующих рецепторов НК-клеток относятся рецепторы натуральной цитотоксичности (NCR – natural cytotoxicity receptors), лектин-подобные рецепторы NKG2D и гетеродимер CD94:NKG2C, активирующие рецепторы семейства KIR, рецептор антителозависимой цитотоксичности CD16. Эти и многие другие рецепторы способны распознавать на

поверхности окружающих клеток лиганды, являющиеся маркерами стресса, повреждения, опухолевой или вирусной трансформации. В кооперации с ингибирующими рецепторами активирующие рецепторы обеспечивают направленную защиту организма от измененных клеток в условиях раковой трансформации или вирусной инфекции [57].

Рецепторы натуральной цитотоксичности (NCR)

Одно из основных семейств активирующих рецепторов NK-клеток - молекулы семейства иммуноглобулинов, рецепторы натуральной цитотоксичности NCR. К числу этих рецепторов относятся молекулы NKp30, NKp44 и NKp46. Экспрессия NKp44 специфична для NK-клеток и индуцируется активацией клеток. В то же время экспрессия NKp30 и NKp46 свойственна как покоящимся, так и активированным NK-клеткам. Кроме того, Т-клетки и другие клетки врожденного иммунитета, помимо NK-клеток, также могут экспрессировать NKp30 и NKp46 на своей поверхности [58]. Активация NK-клеток при связывании этих рецепторов с лигандами приводит к повышению продукции TNF и IFN γ . Активирующие рецепторы семейства NCR способны распознавать лиганды измененных клеток: как растворимые молекулы, так и поверхностные белки, гликопротеины вирусного происхождения, презентируемые на поверхности ядерные белки [59].

В частности, лигандами рецептора NKp30 являются ассоциированные с опухолевой трансформацией молекулы B7-H6, а также BAG-6, регулятор экспрессии генов при повреждении целостности ДНК [60,61]. Благодаря альтернативному сплайсингу может формироваться ингибирующая изоформа рецептора NKp30, лигандом которого является белок тегумента HCMV, pp65 [62,63]. Еще одним ингибирующим лигандом NKp30 является галектин-3, экспрессия которого свойственна опухолевым клеткам [64]. Таким образом клетки, подвергшиеся вирусной или раковой трансформации, способны избегать иммунного надзора NK-клеток.

Рецептор NKp44 способен распознавать гликопротеины оболочек флавивирусов, молекулярные паттерны бактерий туберкулеза и родственных им бактерий *Nocardia farcinica* и *Pseudomonas aeruginosa* [65,66]. Посредством NKp44 NK-клетки также детектируют клетки опухолей простаты, кишечника, молочных желез, шейки матки и других типов [67]. Распознавание частично осуществляется за счет связывания NKp44 с протеогликанами гепарансульфата, который, вероятно, является ко-лигандом [68]. Кроме того, NKp44 распознает усеченную изоформу метилтрансферазы MLL5 (mixed-lineage leukemia-5), которая в здоровых тканях экспрессируется в ядре, однако при опухолевой трансформации может экспонироваться на клеточной мембране [69].

Помимо распознавания патоген-ассоциированных факторов, экспрессирующие NCR NK-клетки также участвуют в модулировании иммунного ответа. В частности, NKp30⁺ NK-клетки способствуют сокращению пула дендритных клеток и, как следствие, смещению баланса иммунного ответа в сторону Т-хэлперов первого типа (Th1) [70]. В свою очередь, NKp46⁺ NK-клетки способствуют сокращению пула нейтрофилов и таким образом предотвращают избыточное повреждение тканей на поздних стадиях воспалительной реакции [71].

Рецепторы натуральной цитотоксичности участвуют в распознавании широкого спектра вирусных, бактериальных и опухолевых лигандов, способны как интенсифицировать, так и подавлять иммунологическую реакцию. Одним из важных свойств NCR является участие в регуляции работы клеток адаптивного и врожденного иммунитета.

Лектин-подобные рецепторы

Семейство лектин-подобных рецепторов NKG2X включает как активирующие, так и ингибирующие рецепторы. Преимущественно эти рецепторы распознают лиганды со структурой, подобной молекулам гистосовместимости. Это свойство позволяет NK-клеткам детектировать трансформированные клетки с нарушенной экспрессией молекул HLA-I и повышенной экспрессией стресс-индуцированных факторов. Часть этих рецепторов представлена гомодимерами (NKG2D), тогда как остальные рецепторы формируют гетеродимеры с молекулой CD94 (NKG2A, NKG2C, NKG2E, NKG2H).

Уровень экспрессии лектин-подобных рецепторов изменяется в ходе дифференцировки и функционального созревания. В частности, экспрессия NKG2A и NKG2D характерна для менее дифференцированных клеток, тогда как NKG2C-экспрессирующие клетки представлены в основном в популяциях более зрелых NK-клеток. Ингибирующий рецептор NKG2A также является маркером лицензирования, цитотоксической зрелости NK-клеток. Активирующий рецептор NKG2C, в свою очередь, принимает участие в формировании популяции HCMV-специфичных адаптивных NK-клеток. Наряду с NKG2A, этот рецептор способен распознавать молекулу HLA-E, экспонированную на окружающих клетках, в том числе трансформированных, и принимает участие в активации иммунного ответа.

NKG2D

NKG2D - активирующий рецептор, представленный в форме гомодимера. Проведение внутриклеточного сигнала от рецептора осуществляется посредством адаптерной молекулы DAP10 [72]. Спектр лигандов, которые способен распознавать NKG2D, широк и включает факторы, экспрессия которых индуцируется в ходе стресса или вирус- и опухолев-индуцированной трансформации. В частности, к лигандам NKG2D относятся молекулы

семейства MIC (major histocompatibility complex class I chain-related protein) и ULBP (UL binding protein), повышенная экспрессия которых характерна для ряда опухолей [73]. Недавно было показано, что NKG2D также способен распознавать молекулярные паттерны грибов и участвовать иммунной реакции в случае грибковых инфекций слизистых [74].

NKG2A

В отличие от NKG2D, рецептор NKG2A опосредует проведение ингибирующего сигнала и представлен в виде гетеродимера CD94:NKG2A. Основным лигандом этого рецептора - HLA-E, неканоническая молекула HLA класса I [75]. HLA-E является индикатором уровня экспрессии классических HLA-I, поскольку родство к антиген-презентирующей щели HLA-E имеют лидерные последовательности HLA-A, B и C, а также неканонической молекулы HLA-G [76,77]. В ходе NK-клеточной дифференцировки NKG2A начинает экспрессироваться одним из первых среди HLA-I-распознающих молекул. Высокий уровень экспрессии NKG2A свойственен менее дифференцированным клеткам, и по мере созревания уровень его экспрессии снижается [29].

Экспрессия NKG2A, наряду с экспрессией ингибирующих рецепторов KIR, необходима для функционального созревания NK-клеток, так называемого лицензирования или обучения. Экспрессирующие NKG2A NK-клетки, находящиеся в окружении здоровых клеток организма с неизменным уровнем экспрессии HLA-I и HLA-E, получают ингибирующий сигнал и не могут реализовать цитотоксический потенциал. Вместе с тем они получают возможность накапливать литические гранулы, в них наблюдается более высокий уровень метаболической активности [78]. Таким образом, обученные NKG2A⁺ NK-клетки получают повышенный цитотоксический потенциал против трансформированных клеток, который, тем не менее, не реализуется в окружении здоровых клеток организма.

Трансформированные клетки обладают широким рядом методов избегания иммунного надзора, одним из которых является снижение уровня экспрессии HLA-I на поверхности клеточной мембраны, что позволяет им скрыться от детекции CD8⁺ Т-лимфоцитами. Вместе с HLA-I снижается экспрессия HLA-E, а вместе с ней - NKG2A-опосредованный ингибирующий сигнал NK-клеток. NKG2A⁺ NK-клетки получают возможность реализовать свой цитотоксический потенциал в отношении измененных клеток. Многие пептиды вирусного и опухолевого происхождения способствуют стабилизации HLA-E на поверхности клетки. Например, неструктурный белок SARS-CoV-2, Nsp13 (Non-structural protein 13) кодирует пептид, который способен укладываться в антиген-презентирующую щель HLA-E и препятствовать связыванию NKG2A со своим лигандом. Этот механизм лежит в основе активации клеток NKG2A⁺ и приводит к элиминации зараженных клеток и подавлению

репликации SARS-CoV-2 [79]. Клетки множественной миеломы, напротив, используют экспрессию HLA-E как защиту. Было показано, что высокий уровень экспрессии HLA-E на клетках этой опухоли ассоциирован с тяжелым течением болезни и летальным исходом. Одной из причин манифестации множественной миеломы являлось NKG2A-опосредованное подавление цитотоксической активности NK-клеток [80]. Широкий ряд солидных опухолей также характеризуются повышенной экспрессией HLA-E, что позволяет подавлять NK-клеточную цитотоксичность в микроокружении этих опухолей [16,81,82].

NKG2C

Активирующий рецептор NKG2C, как и NKG2A, представлен гетеродимером с молекулой CD94 и способен распознавать неканоническую HLA-I - HLA-E [76]. Внутриклеточный активирующий сигнал от рецептора проводится посредством адаптерной молекулы DAP12. Аффинность связывания NKG2C с лигандом сильно зависит от пептида, презентируемого в составе HLA-E.

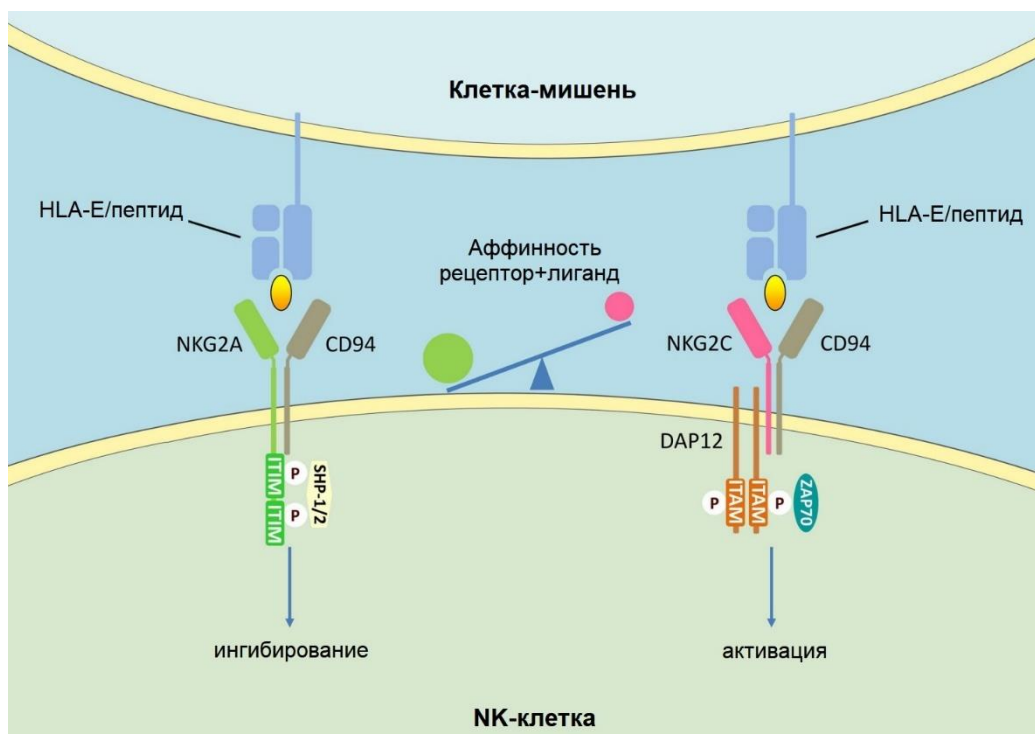


Рисунок 1. Взаимодействие ингибирующего рецептора NKG2A и активирующего рецептора NKG2C с лигандом HLA-E на поверхности клеток-мишеней (по Wang и др., 2022 [83]).

CD94:NKG2C принимает участие в противовирусных и противоопухолевых реакциях NK-клеток, а также в формировании специфических адаптивных субпопуляций NK-клеток при взаимодействии NKG2C с пептидом патогена в составе HLA-E. В частности, HCMV, HIV, вирус Эпштейна-Барр (EBV) и вирус гепатита С (HCV) способны продуцировать пептиды, которые могут быть презентированы в HLA-E [84,85]. Примечательно, что при

взаимодействии с клетками, презентующими пептиды некоторых вирусов, в частности, HCV и SARS-CoV-2, не наблюдается снижение цитотоксической активности клеток NKG2A⁺. Также в крови ВИЧ-инфицированных индивидов, способных без антиретровирусной терапии сохранять низкий уровень вирусной нагрузки, наблюдается высокое содержание НК-клеток, ко-экспрессирующих NKG2C и NKG2A [86].

Среди вирусов наиболее высокой степенью гомологии к лидерным последовательностям HLA-I обладают пептиды HCMV. Известно, что инфекция HCMV ассоциирована с накоплением так называемых адаптивных клеток, которых характеризуются высоким уровнем экспрессии NKG2C. Показано, что структура пептида HCMV влияет на аффинность связывания между рецептором NKG2C и его лигандом HLA-E. Некоторые штаммы HCMV способны кодировать в составе белка UL40 пептид с высоким потенциалом стабилизации HLA-E – VMAPRTLFL, последовательность которого идентична лидерной последовательности неканонической молекулы HLA-I – HLA-G [19]. Адаптивные NKG2C⁺ НК-клетки не только участвуют в контроле инфекции HCMV, но также обладают выраженным противоопухолевым потенциалом. В частности, экспансия клеток NKG2C⁺ у пациентов с лейкозом после трансплантации гематопозитических клеток ассоциирована со сниженной вероятностью рецидива и лучшим исходом заболевания [12–14].

NKG2E и NKG2H

Семейство рецепторов NKG2 также включает рецептор NKG2E, который, как и NKG2C, образует гетеродимер с CD94 и проводит активирующий сигнал посредством адаптерной молекулы DAP12. Кроме того, NKG2E способен связываться с молекулой HLA-E с большей аффинностью по сравнению с NKG2C [87]. Однако комплекс CD94:NKG2E+DAP12 не выходит на поверхность клеточной мембраны и удерживается в эндоплазматическом ретикулуме, поскольку структура внеклеточной части рецептора включает ряд гидрофобных аминокислот [88]. Одна из возможных функций этого рецептора – связывание молекул HLA-E, DAP12 и CD94 для регуляции иммунного ответа, предотвращения избыточной активации НК-клеток. Экспрессия NKG2E характерна также для других клеток организма, помимо НК-клеток, в том числе в патологических состояниях. В частности, с повышенной экспрессией NKG2E в клетках глиобластомы ассоциирована повышенная агрессивность опухоли и устойчивость к лучевой терапии [89].

При альтернативном сплайсинге гена, кодирующего NKG2E, образуется рецептор NKG2H, в котором отсутствует домен, ответственный за удержание белка в эндоплазматическом ретикулуме [90]. Экспрессия этого рецептора характерна для Т-клеток и НКТ-клеток, реже встречается на поверхности НК-клеток. NKG2H также образует гетеродимер с CD94 и

способен ассоциироваться с DAP12, однако активация NKG2H⁺ Т-лимфоцитов ассоциирована со сниженной активацией и пролиферацией, индукцией клеточной гибели остальных лимфоцитов в окружении [91]. Таким образом, рецепторы NKG2E и NKG2H, распознающие HLA-E, преимущественно играют регуляторную роль.

Лектин-подобные рецепторы NK-клеток распознают маркеры трансформированных клеток, что позволяет им принимать участие в противовирусном и противораковом иммунном ответе. Однако одним из уникальных свойств этих рецепторов является способность вносить вклад в формирование пула адаптивных NK-клеток, которые при вторичной встрече с патогеном демонстрируют повышенную функциональную и пролиферативную активность.

Иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток (KIR)

Семейство иммуноглобулин-подобных рецепторов киллерных клеток включает широкий спектр активирующих и ингибирующих молекул, распознающих различные HLA-I в связи с презентированными в них пептидами. Существует множество различных генов KIR, на уровне популяций наблюдается значительная частота полиморфизмов. Большое разнообразие рецепторов KIR отчасти объясняется их коэволюцией с их основным лигандом – молекулами HLA-I, которым также свойственна высокая степень полиморфности [92]. Аффинность связывания KIR с молекулами HLA-I зависит от самого рецептора KIR, от полиморфизмов HLA-I и от презентуемого HLA-I пептида. Также от разнообразия аллелей HLA-I зависит накопление гранзима В в обученных NK-клетках. Таким образом, на уровне индивида важную роль в формировании KIR-опосредованного иммунного ответа играют вероятностные механизмы, лежащие в основе разнообразия наборов генов KIR и HLA-I [93–95].

Экспрессия рецепторов KIR характерна для NK-клеток с высоким уровнем дифференцировки, которые отличаются повышенным цитотоксическим потенциалом. Эти рецепторы необходимы для контроля бактериальных и вирусных инфекций, опухолей, предотвращения аутоиммунных заболеваний. Например, один из пептидов HCMV способен встраиваться в HLA-C аллотипа C2, вследствие чего повышается аффинность связывания HLA-C2 с активирующим рецептором KIR2DS1. При связывании KIR2DS1 с лигандом внутрь клетки через адаптерную молекулу DAP12 осуществляется передача активирующего сигнала и запуск NK-клеточного противовирусного ответа [96]. Схожим образом NK-клетки способны также контролировать инфекции гепатита С и ВИЧ [97]. Рецептор KIR2DS4, в свою очередь, принимает участие в распознавании пептидов SARS-CoV-2 [98] и ряда бактериальных пептидов [99]. Одним из лигандов KIR2DS4 является неклассическая молекула HLA класса I – HLA-G, высокая экспрессия которой характерна для клеток трофобласта, а также

наблюдается при опухолевых трансформациях в условиях супрессивного микроокружения [100,101]. При этом НК-клетки способны захватывать HLA-G посредством трофоцитоза, что приводит к снижению их пролиферативной и цитотоксической активности [102].

Каждому активирующему рецептору KIR соответствует ингибирующий рецептор KIR, обладающий сродством к тем же лигандам, но с большей аффинностью. Как и рецептор NKG2A, ингибирующие рецепторы KIR участвуют в предотвращении иммунной реакции против здоровых клеток организма, экспрессирующих HLA-I, а также в реализации обучения НК-клеток [28]. В отсутствие лигандов ингибирующих рецепторов баланс сигналов сдвигается в сторону активации, вследствие чего измененная клетка подвергается цитолизу [103]. Обученные НК-клетки экспрессируют NKG2A или хотя бы один ингибирующий рецептор KIR, при условии, что в организме присутствует его лиганд HLA-I. В недавних исследованиях было показано, что итогом обучения становится перестройка лизосомального компартмента, накопление Ca^{2+} , перфоринов и гранзимов, а также метаболические изменения [30]. Несмотря на то, что KIR и NKG2A принимают участие в обучении НК-клеток, эти рецепторы обладают различными функциями. NKG2A более чувствителен к изменению уровня экспрессии HLA-E, тогда как ингибирующие рецепторы KIR обладают повышенной чувствительностью к изменению репертуара пептидов в составе HLA-I [104]. Клетки, не экспрессирующие ни KIR, ни NKG2A, лишены способности детектировать недостаток HLA-I в микроокружении. Они не накапливают литических гранул, отличаются низким уровнем экспрессии белков, отвечающих за реализацию цитотоксической реакции, и, как следствие, обладают высокой толерантностью к здоровым тканям [105]. В то же время эти клетки сохраняют инертность даже при наличии активирующих стимулов.

Как активирующие, так и ингибирующие рецепторы KIR участвуют в формировании адекватного иммунного ответа в заданном микроокружении. Активирующие рецепторы способны распознавать чужеродные пептиды в составе HLA-I и играть роль в контроле заболеваний вирусной и бактериальной природы, а также участвовать в распознавании опухоль-ассоциированных лигандов. Ингибирующие рецепторы предотвращают иммунный ответ в отношении здоровых клеток организма и способствуют формированию пула цитотоксически зрелых НК-клеточных эффекторов, восприимчивых к активирующему сигналу.

1.1.2. Функциональные характеристики НК-клеток

1.1.2.1. Продукция цитокинов

Противоопухолевые цитокины

В ответ на стимуляцию NK-клетки также играют роль гуморальных регуляторов иммунного процесса посредством секреции про- и противовоспалительных цитокинов. Наиболее важными провоспалительными цитокинами являются $\text{IFN}\gamma$, TNF и GM-CSF, которые способствуют активации клеток врожденного иммунитета и антиген-презентирующих клеток, обеспечивая поддержание воспалительной реакции [106,107]. Посредством продукции GM-CSF NK-клетки обеспечивают долгосрочную поддержку иммунной реакции, индуцируя миелопоэз в красном костном мозге [108]. Цитокины $\text{IFN}\gamma$ и TNF, в свою очередь, преимущественно обладают местным действием в сайте иммунной реакции. В частности, продукция $\text{IFN}\gamma$ обуславливает противовирусную активность $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{NKG2A}^+$ NK-клеток при ответе на EBV [109]. Известно, что при совместном действии с TNF, $\text{IFN}\gamma$ индуцирует продукцию CXCL10 в опухолевой ткани, что приводит к привлечению в микроокружение опухоли CXCR3^+ эффекторных лимфоцитов. Таким образом повышается чувствительность трансформированных тканей к цитотоксическому воздействию NK-клеток, что подтверждено на примерах опухолей яичников и молочной железы [110–112]. Продуцируемый NK-клетками $\text{IFN}\gamma$ способен влиять не только на опухолевые клетки. Стимуляция $\text{IFN}\gamma$ приводит к накоплению и активации NK-клеток, повышает их цитотоксический потенциал в ходе иммунных реакций [113].

NK-клетки способны продуцировать цитокины также в мембран-связанной форме. В отличие от моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, на поверхности мембраны NK-клеток детектируется мембран-связанный TNF, принимающий участие в контактной элиминации измененных клеток организма [114].

Проопухолевые цитокины

Сдерживание воспаления NK-клетки осуществляют посредством секреции IL-10 и $\text{TGF}\beta$. Эти цитокины подавляют активность дендритных клеток и Т-лимфоцитов [115]. Также IL-10 способствует активации NK-клеток, которые обеспечивают элиминацию стрессированных и поврежденных клеток в очаге воспаления, что повышает шансы на выживание при сепсисе [116,117]. Кроме того, наличие злокачественных опухолей сопровождается приобретением NK-клетками так называемого регуляторного фенотипа. Например, показано, что при раке поджелудочной железы и раке молочной железы (РМЖ) наблюдается повышенное содержание NK-клеток, продуцирующих IL-10 и $\text{TGF}\beta$ [118,119].

1.1.2.2. Цитотоксическая элиминация мишеней

Одним из ответов NK-клеток на активацию является запуск цитотоксической реакции. Как лимфоциты врожденного иммунитета NK-клетки не требуют предварительной сенситизации или презентации антигена для цитотоксического ответа, однако их ответ регулируется рядом рецепторов. В частности, это могут быть активирующие рецепторы NKG2D, NKG2C, NCR, активирующие рецепторы KIR. На более поздних стадиях дифференцировки NK-клетки начинают экспрессировать рецептор CD16, распознающий Fc-фрагменты антител, что позволяет им элиминировать мишени, опсонизированные антителами [120].

Элиминация мишеней NK-клетками осуществляется посредством экзоцитоза литических гранул либо путем рецептор-опосредованного апоптоза мишени с помощью экспонированных на клеточной мембране молекул Fas-L и TRAIL.

Элиминация мишеней путем экзоцитоза

Для реализации программы экзоцитоза необходима активация NK-клеток и последующая перестройка лизосомального компартмента и цитоскелета, в результате которых формируется иммунологический синапс с клеткой-мишенью. В область синапса по системе микротрубочек транспортируются литические гранулы, содержащие гранзимы и перфорин. Присутствие в гранулах серглицина и кальретикулина, а также низкий pH подавляют активность этих веществ. После экзоцитоза в синапс, где наблюдаются нейтральный pH и физиологические концентрации Ca^{2+} , перфорин получает возможность встроиться в мембрану клетки-мишени и сформировать поры. Образование пор приводит к осмотическому лизису, также через них внутрь клетки проникают гранзимы – индукторы апоптоза по каспаза-зависимому и независимому механизму [121]. Примечательно, что репертуар гранзимов в литических гранулах меняется в ходе дифференцировки NK-клеток. Экспрессия гранзима К характерна для клеток со слабой степенью дифференцировки NK2, более дифференцированные клетки NK1 обладают повышенной экспрессией гранзимов А и В, тогда как клетки с адаптивными свойствами NK3 отличаются средним уровнем экспрессии гранзимов А и В, но повышенной экспрессией гранзима Н [9]. Также известно, что более дифференцированные клетки KIR⁺ отличаются не только большим числом литических гранул, но и более высоким уровнем синтеза перфоринов по сравнению с менее дифференцированными клетками [9]. Благодаря этим свойствам более дифференцированные клетки составляют основу пула NK-клеточных литических эффекторов.

Рецептор-опосредованная элиминация мишеней

Fas-L и TRAIL являются лигандами рецепторов смерти, расположенных на поверхности клеток-мишеней, связывание с которыми индуцирует запуск апоптоза в мишенях [122]. Известно, что многие опухолевые клетки экспрессируют на клеточных мембранах рецепторы смерти, что приводит к их успешной элиминации по Fas-L или TRAIL-зависимому пути [123]. Однако конечный выбор пути элиминации зависит от ткани локализации NK-клеток и их статуса активации. В частности, свежеизолированные NK-клетки не экспрессируют TRAIL, тогда как NK-клетки печени отличаются сниженным содержанием гранзима К в литических гранулах и предпочитают TRAIL-опосредованный апоптоз [124].

Множественный киллинг

Одна активированная NK-клетка способна уничтожить последовательно несколько мишеней. Первые несколько мишеней элиминируются посредством цитотоксических гранул до тех пор, пока не истощатся запасы перфорина и гранзимов. Показано, что на элиминацию каждой клетки-мишени расходуется примерно 10% от запасов цитотоксических гранул [125]. После NK-клетки могут задействовать Fas-L- и TRAIL-опосредованные пути элиминации [121].

Одним из механизмов регуляции, способствующих последовательному уничтожению нескольких мишеней, является снижение экспрессии активирующих рецепторов NK-клеток в области иммунологического синапса при связывании этих рецепторов с лигандами. В случае антитело-зависимой цитотоксичности (ADCC – antibody-dependent cytotoxicity) при связывании с антителами чаще всего наблюдается сращивание CD16 металлопротеазой ADAM17 с поверхности NK-клеток [126,127]. Большая часть других активирующих рецепторов уходит с поверхности посредством различных механизмов обратного захвата рецептора с поверхности. В частности, NKG2D, NKG2C и ряд рецепторов натуральной цитотоксичности рециклируют и подвергаются деградации в лизосомах после связывания с лигандом [128,129]. Этот процесс предотвращает избыточную активацию NK-клеток и ограничивает их взаимодействие с отдельной мишенью, что позволяет эффекторам дозированно расходовать запас цитотоксических гранул.

Однако ингибирующие рецепторы, такие, как NKG2A и KIR, интернализуются вне зависимости от встречи с лигандом, вероятно, потому, что основной функцией таких рецепторов является продолжительное поддержание гомеостаза [130].

1.1.2.3. Презентация антигенов в составе HLA класса II

NK-клетки не являются классическими антиген-презентирующими клетками, однако при активации они способны экспрессировать HLA класса II, HLA-DR [131]. В ходе иммунного

ответа NK-клетки могут обладать высокой экспрессией HLA-DR, которая, в частности, регулируется фактором СИТА в ответ на стимуляцию IFN γ [132]. Высокий уровень экспрессии HLA-DR наблюдается при аутоиммунных заболеваниях, вирусных и бактериальных инфекциях. HLA-DR⁺ клетки отличаются повышенным пролиферативным потенциалом, высоким уровнем дегрануляции и продукции IFN γ [133]. NK-клетки субпопуляции HLA-DR⁺ способствуют активации Т-лимфоцитов путем слабой антиген-презентации [134,135]. Стимулированные IL-21 HLA-DR⁺ NK-клетки могут также инициировать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток центральной памяти и предотвращать их дифференцировку в эффекторные клетки памяти [136].

1.1.3. Группы NK-клеток и их основные характеристики

Популяция NK-клеток отличается высоким уровнем функционального и фенотипического разнообразия. Традиционный метод классификации NK-клеток основан на экспрессии различных поверхностных маркеров. В частности, одним из основополагающих маркеров классификации NK-клеток является CD56 (NCAM1, neural cell adhesion molecule-1) - молекула гомофильной адгезии, уровень экспрессии которой меняется в ходе созревания и в зависимости от функционального потенциала клеток [25]. CD56 участвует не только в адгезии, но и в распознавании патоген-ассоциированных паттернов (PAMPs – pathogen associated molecular patterns) на гифах *Aspergillus fumigatus* [137,138]. При делеции CD56 в NK-клетках нарушается формирование иммунологического синапса и снижается секреция литических гранул. Это обусловлено тем, что молекула CD56 способна активировать внутриклеточную тирозиновую киназу Pyk2, инициировать передачу активирующего сигнала, а также перестройку актиновых филаментов [139–141]. В популяции зрелых NK-клеток выделяют две популяции с разным уровнем экспрессии CD56: менее дифференцированные CD56^{bright} и более зрелые CD56^{dim}. Эти клетки различаются степенью дифференцировки, основными местами локализации в организме, уровнями пролиферативной активности и основными функциональными паттернами [142].

Субпопуляция CD56^{dim}, в свою очередь, подразделяется на когорты, обладающие различными уровнями экспрессии маркера CD57 [31]. Это сульфатированный углеводный эпитоп, который принимает участие в адгезии, и появление которого долгое время считалось маркером репликативного старения и терминальной дифференцировки. Однако недавно было показано, что клетки CD57⁺ в определенных условиях способны снова приобретать фенотип CD57⁻ [143]. Содержание клеток CD57⁺ в крови увеличивается с возрастом, высокое их содержание также ассоциировано с вирусными инфекциями, в частности, HCMV и EBV. Для CD57⁺ NK-

клеток характерен сниженный цитокин-зависимый пролиферативный и функциональный ответ, поскольку они характеризуются сниженной экспрессией рецепторов к цитокинам IL-2, IL-12, IL-18 [9]. В то же время, при CD16-опосредованной стимуляции клетки CD57⁺ отличаются более выраженной секрецией IFN γ по сравнению с CD57-негативными клетками [31]. Также именно в популяции CD57⁺ наблюдается формирование пула несущих рецептор NKG2C HCMV-специфичных NK-клеток с адаптивными свойствами [144].

В недавнем исследовании посредством транскриптомного анализа единичных клеток популяции NK-клеток были выявлены три основные когорты: NK1, NK2 и NK3 [9]. Эти когорты различаются основными функциями и фенотипическими характеристиками. Когорта NK2 по своим характеристикам наиболее близка к клеткам CD56^{bright}, когорты NK1 и NK3 преимущественно характеризуются низким уровнем экспрессии CD56 и отличаются высоким цитотоксическим потенциалом. При этом когорта NK3 обладает высоким уровнем экспрессии CD57 и NKG2C и, как следствие, представляет пул адаптивноподобных NK-клеток.

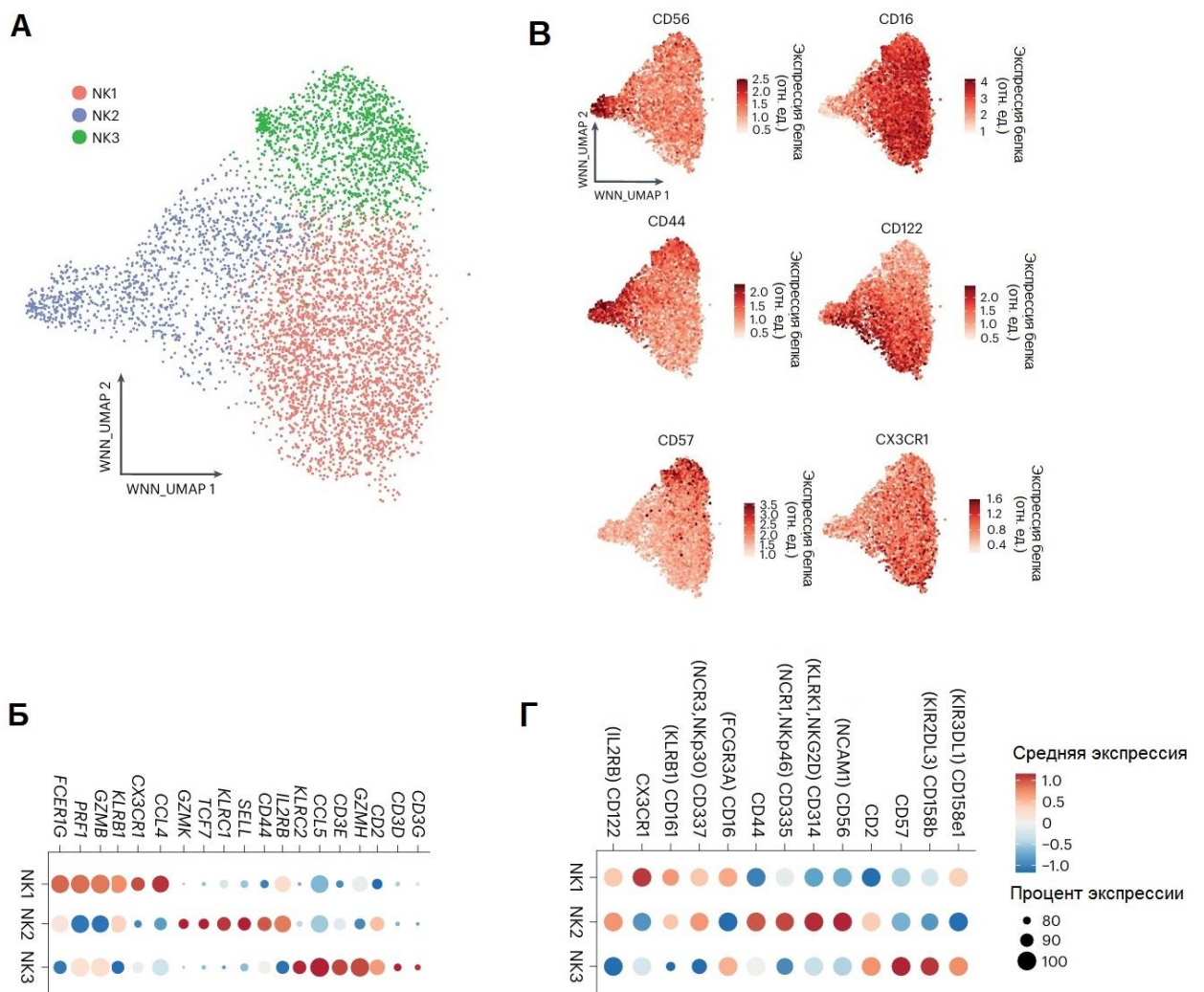


Рисунок 2. Субпопуляции NK-клеток NK1, NK2, NK3 в периферической крови: визуализация распределения кластеров (А), экспрессия генов (Б) и белков (В,Г) в различных кластерах (по Rebuffet и др. 2024 [9]).

1.1.3.1. NK2

NK-клетки когорты NK2 обладают высоким сходством с субпопуляцией CD56^{bright}, поскольку для них характерна высокая экспрессия CD56, отсутствие экспрессии маркера высокодифференцированных клеток CD57 и ряд других общих фенотипических и функциональных свойств. Эта популяция преобладает в лимфоидных тканях, печени и матке, однако составляет всего 5-15% от общего числа NK-клеток в периферической крови [27]. Тропизм CD56^{bright} NK-клеток к определенному типу тканей обусловлена набором хемокиновых рецепторов на их поверхности. CD56^{bright} клетки печени характеризуются высоким уровнем экспрессии CXCR6 и CCR5 и высокой экспрессией транскрипционного фактора Eomes [145,146]. В децидуальной ткани CD56^{bright} клетки отличаются высокой экспрессией CXCR3 и CXCR4 [147], тогда как высокий уровень экспрессии CCR7 – свойство CD56^{bright} периферической крови [148]. Высокая склонность клеток NK2 к тканерезидентности обусловлена не только уникальным набором хемокиновых рецепторов, но также выраженной экспрессией молекул CD44, CD62L и XCL1, которые обеспечивают межклеточную адгезию и хоминг лимфоцитов в ткани. Благодаря высокому уровню экспрессии цитокиновых рецепторов IL-2R β , IL-18R, IL-10R, NK-клетки когорты NK2 обладают высокой чувствительностью к цитокиновой стимуляции [9]. Эти клетки также отличаются высоким уровнем экспрессии NKG2A и, как следствие, способны обучаться в микроокружении HLA-E-экспрессирующих клеток организма и накапливать цитотоксические гранулы [29]. Кроме того, они характеризуются высоким уровнем экспрессии рецепторов NKG2D, NKp46 и способны активироваться в ответ на контакт с измененными клетками организма [149]. Однако они обладают низкой экспрессией перфорины, гранзимов А и В, что характеризует их как популяцию со слабым цитотоксическим потенциалом. Клетки NK2 отличаются низкой экспрессией CD16, в связи с чем принимают ограниченное участие в ADCC [142,150]. В отличие от более зрелых цитотоксических эффекторов, NK2 продуцируют больше гранзима К, который способствует запуску каскада комплемента, внеклеточно расщепляя факторы комплемента C2 и C4 [151]. Известно, что этот механизм лежит в основе поддержания хронического воспаления при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит. Отличительной чертой клеток NK2 является низкая цитотоксическая активность, высокий тропизм к тканям, в том числе к лимфоидным органам, значительный цитокин-зависимый

пролиферативный потенциал и выраженная регуляторная активность. В ряде публикаций низкодифференцированные NK-клетки с фенотипом CD56^{bright} также называют регуляторными NK-клетками (NK_{reg}).

1.1.3.2. NK1

Зрелые NK-клетки с фенотипом CD57⁻CD56^{dim}, в свою очередь, обладают наибольшим сходством с когортой цитотоксических эффекторов NK1. Клетки с фенотипом CD56^{dim} составляют большую долю NK-клеток периферической крови. Они обладают более высоким уровнем экспрессии рецепторов KIR и более низким – рецепторов NKG2A. Для клеток CD56^{dim} характерна повышенная экспрессия внутриклеточной адаптерной молекулы FcεRIγ, что характеризует их как когорту более зрелых клеток с выраженным цитотоксическим потенциалом [29]. Одним из важнейших отличий этой когорты является высокий уровень продукции гранзимов А и В, а также перфорины. Благодаря высокому цитотоксическому потенциалу, клетки этой субпопуляции являются линией первичной защиты от клеток, подвергшихся вирусной и раковой трансформации. Распознавание мишеней клетки NK1 осуществляют посредством активирующих рецепторов KIR, NKp30, NKp46, NKG2D, CX3CR1. Кроме того, они характеризуются высоким уровнем экспрессии CD16, который позволяет им реализовать реакцию ADCC в отношении опсонизированных антителами мишеней [142]. Экспрессия CXCR2 позволяет NK1 мигрировать по градиенту концентрации одного из основных факторов воспаления – IL-8 – в сайты иммунной реакции [148]. Также они способны привлекать в сайт воспаления макрофаги и нейтрофилы посредством секреции факторов воспаления CCL3 и CCL4. Как и NK2, NK1 обладают чувствительностью к цитокиновой стимуляции IL-2 и TGFβ [9].

Когорта NK-клеток NK1 составляет основу пула цитотоксических NK-клеточных эффекторов с высоким потенциалом накопления литических гранул и широким арсеналом рецепторов к маркерам измененных клеток. Локализуются эти клетки преимущественно в кровотоке, однако способны мигрировать в сайты воспаления и привлекать в сайт развития иммунной реакции другие клетки иммунной системы.

1.1.3.3. NK3

Хотя NK-клетки традиционно относят к ветви врожденного иммунитета, при инфекционных заболеваниях в организме возможно формирование пула так называемых адаптивных NK-клеток. Эти клетки характеризуются высокой продолжительностью жизни и выраженным ответом на повторную встречу с патогеном, а также высоким уровнем ADCC.

Клетки когорты NK3 обладают фенотипическим сходством с HCMV-специфическими адаптивными NK-клетками $CD57^+NKG2C^+$. Содержание NK3 значительно повышено у HCMV-серопозитивных индивидов [10,144]. Инфекция HCMV индуцирует эпигенетические изменения в NK-клетках, которые приводят к повышению уровня транскрипции генов $KLRC2$ ($NKG2C$), $CD2$, $CD85j$, а также снижению транскрипции генов $NKG2A$ и рецепторов к цитокинам $IL-2R$, $IL-12R$, $IL-18R$ [152]. Одной из характерных особенностей адаптивных NK-клеток является сниженная экспрессия адаптерной молекулы $Fc\epsilon R1\gamma$ и повышенная экспрессия молекул $CD3\epsilon$, $CD3\delta$, $CD3\gamma$. Формирование пула адаптивных NK-клеток также наблюдается при заражении вирусами гриппа, герпеса и ВИЧ, однако экспансия клеток $NKG2C^+$ – только при коинфекции с HCMV [153]. Для NK3 характерна низкая экспрессия рецепторов натуральной цитотоксичности $NKp30$ и $NKp46$, но высокий уровень экспрессии рецепторов $NKG2C$, KIR и $CD16$. Они не только обладают высоким цитотоксическим потенциалом благодаря экспрессии перфорина и гранзимов А, В и Н, но также отличаются выраженной секрецией $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию. Секреция провоспалительного хемокина $CCL5$ позволяет клеткам NK3 привлекать в сайт воспаления Т-клетки, макрофаги и нейтрофилы, тем самым усиливая противовирусный и противораковый иммунный ответ. Клетки $CD57^+NKG2C^+$ характеризуются продолжительной циркуляцией в организме и способностью элиминировать клетки гематологических опухолей [11], персистенция таких клеток после пересадки костного мозга пациентам с лейкозом ассоциирована со сниженной вероятностью рецидива [11–13].

Популяция адаптивных NK-клеток NK3 обладает уникальными свойствами. Эти высокодифференцированные клетки сочетают в себе выраженный цитотоксический потенциал и способность секретировать $IFN\gamma$. Помимо этого, несмотря на высокую степень дифференцировки, они сохраняют способность интенсивно пролиферировать при повторной встрече с патогеном, что делает эту когорту NK-клеток перспективной основой для терапии опухолевых заболеваний.

1.2. Роль NK-клеток в микроокружении солидных опухолей

1.2.1. Опухоль-ассоциированные факторы, снижающие цитотоксическую активность NK-клеток

Натуральные киллеры участвуют в противоопухолевых иммунных реакциях и способны элиминировать клетки опухоли. Однако трансформированные клетки, в свою очередь, тоже способны влиять как на состав популяции иммунных клеток в своем микроокружении, так и

на функциональную активность NK-клеточной популяции в организме индивида посредством контактных взаимодействий либо при выделении иммуносупрессирующих растворимых факторов. Например, у пациентов с РМЖ наблюдается ряд фенотипических и функциональных изменений в пуле NK-клеток вне зависимости от стадии заболевания и инвазивности опухоли. В числе таких изменений - снижение экспрессии факторов, связанных с противоопухолевой активностью – маркера дегрануляции CD107a, гранзима В, перфорины, IFN γ , лигандов рецепторов смерти Fas-L и TRAIL. Повышается экспрессия ингибирующих рецепторов NKG2A, KIR, ILT2, а также молекул, ассоциированных с цитотоксичностью (CD57, гранзима В, перфорины и TRAIL), тогда как экспрессия активирующих рецепторов NKG2D, DNAM-1, NKp30, CD16 снижается [154]. В итоге NK-клетки пациентов отличаются подавленной функциональной и пролиферативной активностью по сравнению с NK-клетками здоровых индивидов. Однако в контексте элиминации клеток опухоли наиболее важны функции NK-клеток, инфильтрирующих непосредственно опухоль. В микроокружении опухоли (TME – tumor microenvironment) состав метаболитов, сигнальных молекул и факторов роста отличается от микроокружения здоровых тканей. Для TME свойственны состояние гипоксии, низкий pH, дефицит питательных веществ, наличие иммуносупрессивных цитокинов. В частности, строма солидных опухолей продуцирует IL-10 и TGF β , которые подавляют функции не только NK-клеток, но и других инфильтрирующих опухоль клеток иммунной системы [155]. В основе TGF β -опосредованного подавления NK-клеточной функции лежит ингибирование активности mTOR, который важен в контексте повышения метаболической активности и регуляции лизосомального компартмента [156]. Контактное взаимодействие с мембрано-экспрессированными белками опухоли также способствует изменению фенотипа NK-клеток в TME. Например, экспрессированный на клетках РМЖ подокаликсин-подобный белок 1 (PCLP1 - Podocalyxin-like protein 1) при контакте с NK-клетками способствует снижению экспрессии рецепторов натуральной цитотоксичности DNAM-1, NKG2D и CD16. Экспрессия PCLP1 ассоциирована с негативным исходом заболевания [157,158]. Не менее действенным иммуносупрессорным фактором является высокая концентрация молочной кислоты в TME, которой обусловлены низкие значения pH. Опухоли с высоким уровнем экспрессии лактатдегидрогеназы способны трансформировать пируват и NADH в лактат и NAD $^{+}$, что приводит к закислению микроокружения. При pH ниже 6,5 наблюдается выраженное снижение цитотоксической функции NK-клеток. Показано, что высокий потенциал к продукции лактата в TME связан с негативным прогнозом [159,160].

1.2.2. Субпопуляции NK-клеток в ТМЕ обладают различной чувствительностью к супрессии функций

Высокое содержание CD56^{bright} NK-клеток в микроокружении ассоциировано с негативным прогнозом

Субпопуляции NK-клеток обладают различной чувствительностью к супрессорным механизмам в микроокружении опухоли. Популяционный состав NK-клеток в ТМЕ является прогностическим фактором, и, в зависимости от преобладающего типа клеток, опухоль может развиваться и метастазировать либо успешно элиминироваться. По сравнению со здоровыми тканями, в тканях опухоли наблюдается повышенное содержание NK-клеток с фенотипом CD56^{bright}. В нескольких исследованиях показано, что большая доля инфильтрирующих NK-клеток CD56^{bright} ассоциирована с большим размером опухолей и негативным прогнозом при глиомах, меланомах и трижды негативном РМЖ [161–163]. По транскрипционному профилю клетки CD56^{bright} могут быть разделены на типичные и стрессированные, при этом последним свойственна повышенная экспрессия генов TGFβ-сигнального пути и генов, ассоциированных с гипоксией. Кроме того, оба типа клеток CD56^{bright}, по сравнению с CD56^{dim}, обладают более высокой экспрессией NKG2A, CD44 и CXCR4, что делает их восприимчивей к ингибирующим сигналам в ТМЕ. Что примечательно, эти клетки активно участвуют в привлечении других лимфоцитов в опухолевое микроокружение. CD56^{bright} в опухолевых тканях продуцируют больше лимфотактина, который является аттрактантом дендритных клеток, а также отличаются выраженной продукцией IFNγ по сравнению с NK-клетками здоровых тканей [164]. Повышенные концентрации IFNγ в ТМЕ способствуют повышению экспрессии HLA-E на опухолевых клетках и продукции IFNγ-индуцируемых цитокинов CXCL-9, -10 и -11. Хемокины CXCL9/10/11 способствуют привлечению преимущественно NK-клеток CD56^{bright}, обладающих высоким уровнем экспрессии CXCR3. Повышенная экспрессия лиганда NKG2A, HLA-E, на опухолевых клетках, в свою очередь, способствует подавлению функциональной активности привлеченных в опухоль клеток CD56^{bright}. При этом в случае, когда экспрессия HLA-E в ткани опухоли снижена, а NK-клетки обладают повышенной экспрессией NKG2C, исход заболевания с большей вероятностью будет успешным [165]. Позитивная обратная связь между продукцией IFNγ CD56^{bright} NK-клетками и привлечением клеток со схожим фенотипом может лежать в основе увеличения опухоли в объеме и негативного исхода заболевания.

Зрелые NK-клетки CD56^{dim}, в свою очередь, более устойчивы к ингибирующему микроокружению опухоли. Эта популяция характеризуется меньшей экспрессией NKG2A и

CD44, а также большим содержанием гранзимов А и В. Также для них характерна высокая экспрессия генов, обеспечивающих поддержку высокого цитотоксического потенциала, пролиферации, жизнеспособности, а также миграции в тканях и кровотоке. Таким образом, для ряда опухолей показано, что с высоким соотношением долей клеток CD56^{dim} к CD56^{bright} в ТМЕ ассоциирован позитивный прогноз. Тем не менее, при исследовании лимфоцитов, инфильтрирующих опухоли мочевого пузыря, показано, что при повышенном содержании транскриптов NKG2D, NKp44 и CD2 не наблюдается ассоциации между негативным прогнозом и высоким содержанием NK-клеток CD56^{bright} в ТМЕ [166].

Прогностическое значение инфильтрации NK-клеток в опухоль и присутствия NK-клеток в дренирующих лимфоузлах

Интенсивность инфильтрации NK-клеток в ТМЕ является одним из прогностических признаков. У опухолей молочной железы с более выраженной инфильтрацией NK-клеток и с большей долей NKG2D-экспрессирующих NK-клеток ниже потенциал метастазирования в дренирующие лимфоузлы (TDLN – tumor draining lymph node) [164]. Однако клетки РМЖ могут регулировать экспрессию маркеров стресса, в частности, слущивать лиганды рецептора NKG2D, переводя их в растворимую форму, или снижать уровень их экспрессии посредством эпигенетической регуляции микроРНК [167–169]. Дренирующие лимфоузлы – первый сайт потенциального метастазирования РМЖ, и наличие опухоли влияет на популяционное разнообразие NK-клеток в дренирующих лимфоузлах. Показано, что по сравнению с NK-клетками в лимфоузлах здорового индивида, NK-клетки-резиденты TDLN отличаются повышенной экспрессией NKG2A, NKG2C, DNAM-1 и CXCR3. Особенно выражено содержание NK-клеток NKG2A^{high} в лимфоузлах, дренирующих метастатические опухоли [170].

Размер злокачественной опухоли и результативность противоопухолевой терапии зависят от цитотоксической активности NK-клеток и от популяционного состава NK-клеток, инфильтрирующих в опухоль и дренирующий лимфоузел. Регуляторные CD56^{bright} NK-клетки преимущественно восприимчивы к супрессорным факторам опухоли, тогда как повышенная активность CD56^{dim} вносит вклад в элиминацию солидных опухолей и приводит к позитивному исходу заболевания.

1.3.Терапия опухолей с применением NK-клеток

В настоящее время клеточная терапия – один из активно развивающихся подходов к излечению как гематологических, так и солидных опухолей. В качестве основы для создания противоопухолевых эффекторов используются Т- и В-лимфоциты, макрофаги, а также NK-

клетки. Широко на практике применяются Т-лимфоциты, противоопухолевый ответ которых наиболее подробно изучен. Однако вместе с тем активно ведется разработка подходов к применению в терапии других типов иммунных клеток, поскольку Т-лимфоциты в терапии обладают рядом существенных недостатков. Общим недостатком для Т-клеток, несущих рецепторы TCR (T cell cytotoxicity receptor) или химерные рецепторы CAR различной специфичности является высокая вероятность развития реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Помимо этого, как и препараты на основе опухоль-специфичных антител, Т-клетки способны проявлять цитотоксичность в отношении здоровых тканей. В частности, показано, что HER2-направленные CAR-Т-лимфоциты способны поражать здоровый легочный эпителий, для которого характерна экспрессия HER2 в физиологических условиях, что в некоторых случаях приводит к полиорганной недостаточности [6,171].

НК-клетки в качестве противоопухолевых цитотоксических агентов представляют особый интерес, поскольку, в отличие от Т-лимфоцитов, не вызывают выраженной РТПХ. Это свойство обусловлено тонким балансом сигналов от активирующих и ингибирующих рецепторов на поверхности НК-клеток и позволяет использовать в терапии не только аутологичные активированные *in vitro* НК-клетки, но и аллогенные ранее накопленные НК-клетки «off-the-shelf». Также существует ряд препаратов, позволяющих вовлекать собственные иммунные клетки пациента в иммунный ответ – терапия иммуностимулирующими интерлейкинами, активирующими лимфоциты, или широко применяемая терапия опухоль-направленными антителами.

1.3.1. Роль НК-клеток при таргетной терапии опухолей антителами, специфичными к опухоль-ассоциированному антигену

Благодаря экспрессии рецептора антитело-зависимой цитотоксичности CD16, НК-клетки играют ведущую роль в элиминации опухоли при таргетной терапии опухоль-специфичными антителами. Опсонизированные терапевтическими антителами клетки-мишени распознаются CD16-экспрессирующими НК-клетками, что обуславливает цитотоксический ответ. Существует широкое разнообразие антител к антигенам, экспрессия которых характерна для различных гематологических и солидных злокачественных гиперплазий. Показано, что НК-клетки активно вовлекаются в элиминацию опухолевых клеток при терапии, направленной против клеток лимфомы Ходжкина, экспрессирующих CD30 [172], B7-H3⁺ немелкоклеточного рака легких и рака яичников [173,174], PD-L1- и HER2-экспрессирующих солидных опухолей [175,176]. За счет применения мультифункциональных антител возможна активация не только CD16⁺ НК-клеток, но также клеток, экспрессирующих рецепторы натуральной цитотоксичности NKp46, NKp30 и NKG2D [177–180]. Силу иммунного ответа

возможно увеличить за счет антитело-опосредованного предотвращения слипания лигандов NKG2D или рецептора CD16, а также за счет удаления остатков фукозы с поверхности антител, что приводит к повышению аффинности связывания CD16 с антителом [181].

1.3.2. Блокирование молекул-чекпойнтов как подход к повышению NK-клеточного противоопухолевого ответа

Наряду с опухоль-специфичными антигенами опухолевые клетки экспрессируют лиганды ингибирующих рецепторов NK-клеток, таким образом осуществляется одна из тактик подавления NK-клеточного иммунного ответа. С помощью антител к таким молекулам-чекпойнтам возможно блокировать это взаимодействие и восстанавливать цитотоксический потенциал эффекторов. В частности, показано, что терапия блокирующими антителами к молекуле PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), экспрессированной на поверхности клеток трижды негативного РМЖ, предотвращает распознавание PCNA рецептором NKp44 и ингибирование иммунной реакции по оси PCNA-NKp44 [182].

Одним из наиболее известных NK-клеточных чекпойнтов и осей, задействованных в прогрессировании опухолей, является ось NKG2A-HLA-E. Привлеченные в опухолевое микроокружение NK-клетки, помимо лизиса мишеней, начинают продуцировать IFN γ . В свою очередь, IFN γ индуцирует экспрессию HLA-E на поверхности клеток РМЖ, что приводит к NKG2A-опосредованному ингибированию иммунной реакции при контакте NKG2A-экспрессирующих эффекторов с HLA-E-позитивными опухолевыми клетками. Подавление иммунной реакции предотвращают как с помощью HLA-E-специфичных или NKG2A-специфичных блокирующих антител [183], так и посредством генетического редактирования NK-клеток посредством метода CRISPR/Cas9 [184]. Показано, что нокаут гена NKG2A по сравнению с блокирующими антителами к NKG2A приводит к более выраженному повышению цитотоксической активности [185].

1.3.3. Генетически модифицированные CAR-NK-клетки как агенты против HER2-экспрессирующих опухолей

Значительные терапевтические успехи в лечении опухолевых заболеваний наблюдаются при применении CAR-лимфоцитов с опухоль-специфичным химерным рецептором CAR. CAR-лимфоциты обладают высокой специфичностью к мишеням, но также характеризуются рядом преимуществ перед другими видами таргетной терапии. В отличие от опухоль-направленных антител, CAR-лимфоциты способны длительно персистировать в организме пациента, а также осуществлять направленную миграцию в опухолевые сайты по градиенту хемокинов [186]. В

результате активации при встрече с клетками-мишенями CAR-T-клетки начинают пролиферировать, продуцировать IL-2 и стимулировать иммунные клетки в микроокружении опухоли. Примечательно, что CAR-T-клетки с рецепторами CAR, созданными на основе трастузумаба, способны элиминировать опухоли, устойчивые к трастузумабу, что подтверждает преимущество клеточной противораковой терапии перед терапией моноклональными антителами [187].

Рецепторы CAR включают внеклеточный домен с антигенраспознающим модулем, трансмембранный домен и внутриклеточный домен с сигнальными последовательностями, набор которых варьирует в зависимости от поколения рецептора. В качестве сигнальных внутриклеточных доменов в состав CAR включают CD3 ζ -цепь, а также костимуляторные молекулы OX-40, 4-1BB, CD28 или CD27, которые значительно повышают эффективность CAR-лимфоцитов, согласно доклиническим и клиническим исследованиям [188,189]. Наиболее часто в качестве основы для создания CAR-эффекторов используются Т-клетки и NK-клетки, также достигнуты некоторые успехи в получении CAR-макрофагов. Терапия CAR-T- и NK-клетками обладает доказанной эффективностью в отношении гематологических опухолей и успешно применяется в клинике [190]. Солидные опухоли, в свою очередь, представляют собой плотные клеточные образования и могут быть недоступны для клеточных эффекторов.

Среди солидных раков вторым по распространенности является рак молочной железы. С гиперэкспрессией молекулы HER2 на поверхности клеток РМЖ, опухолей яичника, кишечника и других типов рака ассоциирован высокий риск рецидива и негативный исход заболевания [191]. В связи с этим разработка подходов к лечению HER2-экспрессирующих опухолей является социально значимой задачей. К настоящему моменту в области разработки HER2-специфичных CAR-лимфоцитов достигнуты определенные успехи. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что HER2-специфичные CAR-T-клетки способны успешно распознавать и элиминировать клетки РМЖ [192]. При введении HER2-CAR-T-клеток в желудочки мозга достигается элиминация метастаз РМЖ в головном мозге [193]. На стадии клинических испытаний находятся препараты на основе HER2-специфичных CAR-T-клеток, нацеленных на клетки глиобластомы [1].

В качестве антиген-распознающих доменов CAR могут быть использованы как single-chain-фрагменты антител, так и антителоподобные молекулы. Хорошо изучен потенциал молекул DARPin в качестве антиген-распознающих агентов, в частности, молекул 9-29 и G3, обладающих различной аффинностью к разным доменам HER2. В экспериментах на мышах *in vivo* показано, что CAR-T-клетки с антиген-распознающими доменами CAR на основе

DARPin, по сравнению с CAR на основе sc-фрагментов антител, с большей эффективностью элиминируют HER2-позитивные опухоли молочной железы и яичников. При этом дарпины 9-29 и G3 обладают различной эффективностью в зависимости от опухолевой линии, подсаженной мыши в ходе эксперимента [194,195], что говорит о важности индивидуального подбора антиген-распознающего агента.

Несмотря на то, что HER2-направленные CAR-T-клетки демонстрируют высокую эффективность, они сохраняют описанные выше недостатки: высокий риск индукции РТПХ, цитотоксичности, направленной на здоровые ткани и развития цитокинового шторма. На настоящий момент рядом научных коллективов уже получены CAR-NK-клетки, специфически распознающие HER2-позитивные клетки-мишени [3,196]. В качестве источника CAR-NK-клеток используются NK-клетки периферической крови, NK-клетки пуповинной крови или клеточные линии NK-клеточных лимфом, например, NK-92. Натуральные киллеры из различных источников обладают характеристиками, которые могут влиять на их эффективность в качестве противоопухолевых эффекторов. Также имеет значение трудоемкость получения NK-клеток и их накопления *in vitro* перед введением в организм пациента. Клетки NK-клеточных лимфом отличаются практически неограниченным потенциалом накопления *in vitro*, однако ввиду своей опухолевой природы требуют предварительного облучения перед терапией. Кроме того, клетки NK-92 обладают фенотипом низкодифференцированных NK-клеток, близким к CD56^{bright}, с низкой экспрессией KIR, CD16 и NKG2C и высоким уровнем экспрессии NKG2A, NKp30, NKp46 и NKG2D [197]. Клетки, полученные из пуповинной крови, также характеризуются менее дифференцированным фенотипом, близким к фенотипу когорты NK2 [198]. Низкодифференцированные клетки NK2 (CD56^{bright}) отличаются высокой чувствительностью к иммуносупрессивному окружению РМЖ, и их накопление в ТМЕ ассоциировано с ростом опухоли и негативным прогнозом. В связи с этим, наиболее перспективной основой для создания HER2-направленных CAR-NK-эффекторов против РМЖ являются NK-клетки периферической крови. Наибольший интерес представляют более дифференцированные NK-клетки из когорт NK1 и NK3, зрелые цитотоксические эффекторы и адаптивные NK-клетки, соответственно. В частности, NK-клетки когорты NK3 могут стать перспективной основой для получения NK-клеточных эффекторов, в том числе CAR-NK-клеток, направленных на элиминацию HLA-E-экспрессирующих солидных опухолей. Клетки NK3 характеризуются низким уровнем либо отсутствием экспрессии NKG2A, высоким уровнем экспрессии активирующего рецептора NKG2C, распознающего HLA-E, а также повышенной продолжительностью жизни. Таким образом, из петли обратной положительной связи исключается рецептор NKG2A, и

ингибирующий сигнал сменяется активирующим сигналом от NKG2C. Однако супрессорное воздействие цитокинов и лигандов в ТМЕ, подавленная активность и состояние истощения NK-клеток приводит к сниженной эффективности терапии аутологичными клетками. Клетки NK3, в свою очередь, обладают существенным недостатком: их накопление *in vitro* затруднено вследствие низкого уровня экспрессии цитокиновых рецепторов. В связи с этим особенно актуальна разработка подходов к активации и накоплению эффекторов *in vitro*.

1.4. Методы накопления NK-клеток *in vitro* для терапевтического применения

В настоящее время в качестве стимулов для накопления NK-клеток *in vitro* используются растворимые молекулы – цитокины и иммобилизованные на культуральном пластике антитела к NK-клеточным активирующим рецепторам. Также применяются облученные фидерные клетки опухолевой природы, экспрессирующие на своей поверхности молекулы, стимулирующие деление и активацию NK-клеток. Оба метода могут применяться в комбинации в зависимости от цели накопления и источника NK-клеток.

1.4.1. Стимуляция NK-клеток *in vitro* без фидерных клеток

Основные цитокины, индуцирующие пролиферацию NK-клеток, – IL-2, IL-15 и IL-21. В организме эти цитокины продуцируются активированными Т-клетками и клетками ветви врожденного иммунитета и способствуют увеличению цитотоксического потенциала и продукции IFN γ натуральных киллеров. Показано, что активация посредством IL-2 или IL-21 приводит к повышению ADCC NK-клеток против клеток РМЖ, опсонизированных HER2-специфичными антителами [199]. Однако наиболее перспективной когортой в контексте элиминации РМЖ являются клетки NK3, обладающие низким уровнем экспрессии рецепторов IL-2R и IL-21R [9]. Для накопления высокодифференцированных клеток NK3, помимо цитокинов, требуются дополнительные контактные стимулы, к которым высокодифференцированные клетки более чувствительны.

В настоящее время активно разрабатываются подходы к бесфидерному накоплению NK-клеток, основанному на сочетании интерлейкиновой стимуляции со стимуляцией иммобилизованными на культуральном пластике антителами. Наиболее часто используются антитела к рецептору натуральной цитотоксичности NKP46 и рецептору антитело-зависимой цитотоксичности CD16 [200,201]. Используются и антитела к более экзотическим мишеням, например, к CD2 [202]. Таким образом стимулируется накопление NK-клеток, несущих соответствующие активирующие рецепторы.

Исследователи ищут и другие подходы к бесфидерному накоплению NK-клеток, не требующие использования дорогостоящих антител. В частности, для накопления NK-клеток используют форболовый эфир в сочетании с иономицином, которые стимулируют пролиферацию и активацию лимфоцитов [203]. Применяются частицы клеточных мембран, полученные от фидерных клеток, а также создаются инновационные материалы, например, растворимые полимерные микросферы, способных стимулировать NK-клетки *in vitro* [204,205].

В контексте накопления NK-клеток с адаптивным фенотипом особый интерес представляет недавнее исследование, посвященное бесфидерному накоплению NKG2C⁺ NK-клеток с помощью иммобилизованных антител к молекуле CD94, которая образует димер с NKG2C [206]. Однако системы, основанные на стимуляции иммобилизованными антителами, подразумевают многократное использование дорогостоящего субстрата, тогда как накопление и облучение фидерных клеток требует значительно меньших затрат.

1.4.2. Стимуляция NK-клеток посредством фидерных клеток *in vitro*

В качестве фидерных клеток для культивирования и экспансии NK-клеток *in vitro* широко используются предварительно облученные опухолевые клеточные линии со сниженной экспрессией HLA-I, а также аутологичные PBMC. Наиболее часто роль фидерных клеток играют опухолевые линии K562, EBV-LCL и другие - они могут использоваться как самостоятельный стимул или в сочетании с цитокинами IL-2, IL-15 и IL-21. Также для повышения активирующего эффекта фидерные клетки дополнительно модифицируют генами мембран-связанных молекул. В литературе известно несколько таких линий, в частности, K562 с мембрано-связанными интерлейкинами IL-15, IL-18, IL-21, а также лигандами активирующих рецепторов NK-клеток 4-1BB, OX40 [207–209]. Одной из наиболее хорошо изученных фидерных линий, использующихся для стимуляции NK-клеток *in vitro*, является линия K562 с мембрано-связанным IL-21. Эти клетки зарекомендовали себя как эффективные индукторы экспансии и функциональной активности NK-клеток, в том числе в контексте клеточной иммунотерапии опухолей [22,210]. В частности, показано, что при стимуляции фидерными клетками K562 с мембраносвязанным IL-21 (K562-mbIL21) NK-клетки демонстрируют большую эффективность клонирования, чем при стимуляции цитокинами. Также NK-клеточные культуры, полученные при стимуляции K562-mbIL21, отличаются повышенной экспрессией маркера активации HLA-DR, способны терять экспрессию маркера зрелости CD57 и приобретать экспрессию NKG2A *de novo* [21,143].

1.4.3. Презентация пептидов фидерными клетками *in vitro*

Фидерные клетки способны индуцировать пролиферацию и функциональную активацию НК-клеток. Кроме того, фенотип фидерных клеток способен влиять на накопление НК-клеток с необходимым фенотипом. В частности, для накопления НК-клеток, экспрессирующих определенные ингибирующие рецепторы KIR, используют фидерные клетки, экспонирующие лиганды этих рецепторов, HLA класса I [211,212]. Подобные стимулы применяют и для накопления иммунных клеток с заданной специфичностью к патогенам. Например, Т-клетки, несущие TCR, специфически распознающий пептид HCMV, презентируемый в составе HLA-A, возможно накопить *in vitro* с помощью активации фидерными клетками, экспрессирующими на своей поверхности комплекс HLA-A+пептид HCMV [213].

От последовательности пептида зависит стабильность презентации молекулы HLA-I на поверхности клеток, а также аффинность связывания этого комплекса с соответствующим рецептором на иммунных клетках [15]. В частности, поверхностная экспрессия HLA-E стабилизируется при связывании HLA-E с пептидами, состоящими из девяти аминокислот, наиболее распространенные из них - лидерные пептиды HLA-A,B,C и G, представленные последовательностями VM(A/P)PRT(L/V)(V/L/I/F)L [214]. Среди изученных пептидов наибольшим потенциалом к стабилизации комплекса на поверхности для последующего высокоаффинного связывания с NKG2C обладает пептид VMAPRTLFL [215]. Этот пептид является лидерной последовательностью молекулы HLA-G, а также закодирован в составе белка UL40 некоторых штаммов цитомегаловируса. Возможно, именно этот механизм стимуляции лежит в основе накопления NKG2C-позитивных адаптивных НК-клеток при цитомегаловирусной инфекции. За последнее время появилось несколько исследований, в которых было оценено влияние фидерных клеток K562, модифицированных геном HLA-E, на фенотип и пролиферативную активность НК-клеток [19,216]. При длительном культивировании НК-клеток с презентирующими пептид HCMV фидерными клетками K562 было выявлено накопление фракции клеток NKG2C⁺, в особенности, KIR⁺NKG2C⁺, а также повышенная экспрессия IFN γ [217]. Известно, что полученные клетки обладают высоким цитотоксическим потенциалом против гематологических опухолей. Этот же механизм может быть использован при накоплении *in vitro* высокодифференцированных НК-клеток когорты NK3, обладающих высоким противоопухолевым потенциалом в отношении клеток рака молочной железы.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Растворы и культуральные среды

2.1.1.1. Растворы

Буфер PBS (ПанЭко)

Буфер РВА/ Буфер для сепарации клеток, содержащий 0.5% BSA и 2 mM EDTA (ПанЭко)

Раствор полилизина – на 250 мл раствора – 20 мл 1% желатина (Sigma, США), 50 мл 0.01% poly-L-lysine (Sigma, США)

Среда LB – Водный раствор, содержащий 0,5% бактериального дрожжевого экстракта (Хеликон, Россия), 1% бактериального триптона (Хеликон, Россия), 0,5%NaCl и 0,001% NaOH.

Раствор фикола с плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия)

Раствор Версена (ПанЭко, Россия)

Раствор трипсина (ПанЭко, Россия)

Раствор Accutase (Sigma-Aldrich, США)

Раствор монензина (Sigma-Aldrich, США)

Диметилсульфоксид, DMSO (Sigma–Aldrich, США)

2.1.1.2. Культуральные среды и компоненты сред

Среда RPMI-1640 (ПанЭко, Россия)

Среда DMEM (ПанЭко, Россия)

Среда для культивирования НК-клеток, NK MACS (Miltenyi Biotec, Германия)

Среда X-vivo (Lonza, США)

Среда Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США)

Фетальная телячья сыворотка FBS (Fetal bovine serum) (HyClone Laboratories, США)

Азид натрия (Amresco, США)

hIL-2 (человеческий рекомбинантный IL-2) (Hoffmann La-Roche, Базель, Швейцария)

hIL-15 (Sigma–Aldrich, США).

L-аланил-глутамин (ПанЭко, Россия)

Пируват натрия (ПанЭко, Россия)

Антибиотик-антимикотик (Sigma-Aldrich, США).

2.1.2. Антитела

Таблица 1. Моноклональные антитела, использованные для фенотипирования и сортировки клеток.

<i>Мишень</i>	<i>Флуорофор</i>	<i>Клон</i>	<i>Производитель</i>	<i>Город, страна</i>
<i>CD3</i>	APC-Vio 770	REA613	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD3</i>	PerCP	HIT3a	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD16</i>	-	3G8	BioLegend	San Diego, CA, USA
<i>CD44</i>	FITC	BJ18	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD56</i>	BV421	5.1H11	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD56</i>	FITC	REA196	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD56</i>	PE-Vio 615	REA196	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD56</i>	PE-Vio 770	REA196	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD56</i>	APC	5.1H11	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD56</i>	APC-Vio770	REA196	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD57</i>	VioBlue	TB03	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD57</i>	PE	HNK-1	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD57</i>	PE-Vio770	REA769	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD57</i>	APC-Vio 770	TB03	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>CD62L</i>	FITC	DREG-56	eBioscience	San Diego, CA, USA
<i>CD107a</i>	PE-Cy5	H4A3	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>CD107a</i>	APC	H4A3	Sony	San Jose, CA, USA
<i>CEACAM</i>	FITC	117	SinoBiological	Beijing, China

<i>CX3CR1</i>	APC	2A9-1	BioLegend	San Diego, CA, USA
<i>EpCAM</i>	FITC	028	SinoBiological	Beijing, China
<i>FcεRIγ</i>	FITC	-	MilliMark	Saint Louis, MO, USA
<i>Galectin-9</i>	PE	9M1-3	BioLegend	San Diego, CA, USA
<i>GrB</i>	AF647	GB11	BioLegend	San Diego, CA, USA
<i>HER-2</i>	PE	24D2	BioLegend	San Diego, CA, USA
<i>HLA-DR</i>	BV421	L243	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>HLA-DR</i>	PE-Vio 770	REA805	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>HLA-E</i>	PE	REA1031	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>IFNγ</i>	FITC	B27	Sony Biotechnology	San Jose, CA, USA
<i>IFNγ</i>	PE	45-15	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>KIR2DL2/3</i>	FITC	REA1006	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>KIR2DL2/3</i>	PE	DX27	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>KIR2DL2/3</i>	PE-Vio615	REA1006	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>KIR2DL2/3</i>	APC	DX27	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>MICA/B</i>	-	159207	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
<i>NKG2A</i>	PE	REA110	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>NKG2A</i>	PE-Vio 770	REA110	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>NKG2C</i>	AF488	108724	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
<i>NKG2C</i>	FITC	REA205	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany

<i>NKG2C</i>	PE	REA205	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>NKG2C</i>	APC	REA205	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Germany
<i>Tim-3</i>	BV421	F38-2E2	BioLegend	BioLegend
<i>ULBP1</i>	-	170818	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
<i>ULBP2/5/6</i>	-	165903	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
<i>ULBP3</i>	-	166510	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Вторичные антитела				
<i>IgG козы к Fc-фрагменту IgG мыши</i>	AF647	A21235	Molecular Probes	Eugene, OR, USA

2.1.3. Коммерческие наборы

Кальций-фосфатный набор для трансфекции эукариотических клеток (Invitrogen, США)

Набор для выделения НК-клеток из периферических мононуклеаров (Miltenyi Biotec, Германия)

Набор для внутриклеточного окрашивания (intracellular staining kit, Miltenyi Biotec, Германия)

Набор ELISA для определения титра антител к HCMV (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия)

Набор для детекции лизиса клеток-мишеней, Calcein-AM (Biozol, Германия)

Набор для определения концентрации цитокинов MACSPlex Cytotoxic T/NK Cell Kit (Miltenyi Biotec, Германия)

Набор для выделения плазмидной ДНК, Plasmid Miniprep 2.0 (Евроген, Россия)

2.1.4. Клеточные линии

В качестве клеток-мишеней были использованы клетки эритробластоидной лейкемии K562, клетки опухоли яичника SKOV-3, клетки опухоли молочной железы BT-474 и MCF7, полученные из ATCC. В качестве фидерных клеток были использованы клетки линии K562 с мембраносвязанным интерлейкином IL-21 (K562-mbIL21), любезно предоставленные доктором Дином Ли (MD Anderson Cancer Center, США). Клетки Phoenix Ampho, конститутивно экспрессирующие гены Gag-Pol/Tat/Env/Rev, использованные для накопления ретровирусных частиц, были любезно предоставлены доктором А.В. Филатовым. Клетки-эффекторы NK-92 были получены из ATCC.

Клетки K562 и K562-mbIL21, а также их производные культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 2 mM L-аланил-глутамин, 2mM пирувата натрия и 1% антибиотика-антимикотика.

Для получения фидерных клеток линии K562-mbIL21 и их производных клетки были облучены дозой 100 Грей и заморожены для последующих экспериментов.

Клеточные линии Phoenix-Ampho, SKOV-3, BT-474 и MCF7 культивировались в полной среде DMEM, дополненной 10% FBS, 2 mM L-глутамин, 1% пирувата натрия и 1% антибиотика-антимикотика.

Клеточную линию NK-92 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% FBS, 2 mM L-глутамин и 2 mM пирувата натрия, а также дополнительно обогащенной 200 ед./мл IL-2 и 5 γ/мл IL-15.

Заморозку всех указанных выше клеток, в том числе облученных, проводили в среде, состоящей из FBS (90%) и DMSO (10%) при температуре –135 или –150 °C.

2.2. Методы

2.2.1. NK-клетки: получение, фенотипирование, сортировка, культивирование и оценка функциональной активности

2.2.1.1. Сбор образцов

Образцы периферической крови здоровых добровольцев собирали в вакуумные пробирки с ЭДТА. В общей сложности в исследовании принял участие 91 донор со средним возрастом 28 лет, соотношение мужчин и женщин составило 41/50. Перед сдачей крови доноры давали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Исследования проводились в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и были одобрены Этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Пирогова. Содержание специфических IgG к HCMV человека измеряли в образцах плазмы с помощью набора для иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Новосибирск, Россия).

2.2.1.2. Выделение NK-клеток

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) осуществляли методом центрифугирования в градиенте плотности с использованием раствора фиколла. Последующее выделение фракции NK-клеток проводили с помощью набора для негативной магнитной сепарации; чистота целевой популяции после выделения превышала 96%. Изолированные NK-клетки использовали для фенотипирования *ex vivo*, культивирования *in*

vitro в планшетах либо подвергали сортировке на субпопуляции для последующей стимуляции.

2.2.1.3. Фенотипирование NK-клеток посредством проточной цитометрии

Цитометрический анализ образцов выполняли на проточных цитофлуориметрах MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec, Германия) и LongCyte (ChallenBio, Китай), оснащенных тремя лазерами с длинами волн 405, 488 и 635 нм. PBMC или NK-клетки инкубировали в буфере PBA (PBS, содержащий 0,5% BSA и 0,01% азида натрия) с моноклональными антителами (Таблица 1) на льду в течение 30 мин, по окончании инкубации промывали в буфере PBS. Компенсацию перекрытия спектров испускания настраивали индивидуально для каждой панели окрашивания. При гейтировании сначала выделяли популяцию по морфологическим параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния, после чего исключали дуплеты в координатах FSC-A/FSC-H. Фракцию нативных *ex vivo* NK-клеток в составе PBMC идентифицировали по фенотипу $CD3^{-}CD56^{+}$, NK-клетки в чистой культуре детектировали по экспрессии CD56. Для статистической достоверности регистрировали не менее 50 000 событий для общей популяции NK-клеток и не менее 10 000 событий для отдельных субпопуляций. Значения геометрического среднего интенсивности флуоресценции (gMFI) нормировали относительно контролей FMO (Fluorescence Minus One).

2.2.1.3. Получение bulk-культур NK-клеток

Bulk-NK-клетки культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Среда для культивирования состояла из смеси сред: 45% NK MACS и 45% DMEM с добавлением 10% FBS 2 mM L-глутамина, 1% пирувата натрия и 1% раствора антибиотика-антимикотика. В среду также добавляли IL-2 в рабочей концентрации 100 ед./мл.

В качестве фидерных клеток использовали облученные клетки линий K562-mbIL21(K562-21) или K562-21E. Фидерные клетки добавлялись в соотношении фидер:NK-клетки = 1:1. Клетки K562-21E предварительно инкубировали с пептидами LFL или LLL, либо без пептидов в бессывороточной среде Opti-MEM. В ходе культивирования NK-клеток поддерживалась оптимальная плотность культуры в диапазоне $4-9 \times 10^5$ клеток/мл.

Подсчет числа клеток проводили на 7-е и 14-е сутки культивирования. Анализ проводился с помощью автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad Laboratories, США) с окрашиванием трипановым синим для исключения погибших клеток из анализа. Коэффициент экспансии рассчитывали по формуле: $K = N(t)/N(0)$, где $N(t)$ – число клеток в момент времени t .

2.2.1.4. Получение культур из 100 NK-клеток, сортировка субпопуляций

Субпопуляции NK-клеток выделяли непосредственно после процедуры отрицательной магнитной сепарации с помощью клеточного сортера FACSVantage/DiVa (BD Biosciences, США), оснащенного лазерами с длинами волн 405, 488 и 643 нм, а также соответствующим набором детекторов и фильтров. Перед каждым раундом сепарации прибор калибровали с использованием стандартных калибровочных микросфер. Настройку задержки капли (drop delay) осуществляли при помощи микросфер BD FACS Accudrop. В качестве дополнительного этапа валидации проводили тестовый сортинг на планшет для контроля точности позиционирования капель в лунках. Сортировку выполняли в режиме повышенной чистоты (Purity), что позволяло получать целевые фракции с чистотой более 95%, либо в режиме Single cell для клональных культур.

Перед сортировкой свежевыделенные NK-клетки инкубировали в буфере для сепарации со следующими панелями моноклональных антител:

- CD56-Brilliant Violet 421 (клон 5.1H11), CD57-PE-Vio 770 (клон TB03), KIR2DL2/3-FITC (клон REA1006) и NKG2C-PE (клон REA205) для получения культур субпопуляций $CD57^{-}KIR^{-}NKG2C^{-}$, $CD57^{-}KIR^{-}NKG2C^{+}$, $CD57^{-}KIR^{+}NKG2C^{-}$, $CD57^{+}KIR^{+}NKG2C^{-}$, и $CD57^{+}KIR^{+}NKG2C^{+}$.
- либо антителами к маркерам CD56-Brilliant Violet 421 (клон 5.1H11), CD57-PE, NKG2C-FITC и NKG2A-PE-Vio 770 (клон REA110) для получения культур субпопуляций $CD56^{dim}CD57^{-}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$, $CD56^{dim}CD57^{-}NKG2C^{+}NKG2A^{-}$, $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ и $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}NKG2A^{-}$.

Клетки были отсортированы в лунки 96-луночного планшета по 100 или по 1 клетке (клональные культуры). Ростовая среда состояла из 20% среды X-vivo и 80% DMEM, содержала 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 1% пирувата натрия, 1% раствора антибиотика-антимикотика и IL-2 в концентрации 100 ед/мл. Культивирование проводили при 37 °C, 5% CO₂. В качестве фидерных клеток использовали облученные клетки линий K562-mbIL21 (K562-21) или K562-21E 10^4 клеток/мл, предварительно инкубированные в присутствии пептидов LLL или LFL, либо без них в бессывороточной среде Opti-MEM. Полученные из 100 клеток культуры инкубировали в течение 3 недель, подсчет клеток осуществляли на 12-е и 17-е сутки. Клональные культуры велись в течение 6 недель с подсчетом жизнеспособных клонов на 2-й и 4-й неделе. Количество клеток в полученных культурах подсчитывали с использованием проточного цитометра, клетки окрашивали красителем жизнеспособности SytoxBlue для исключения мертвых клеток из анализа.

2.2.1.5. Оценка натуральной цитотоксичности NK-клеток

Натуральную цитотоксичность NK-клеток оценивали по уровню их дегрануляции при коинкубации с клетками-мишенями K562. Тестирование проводили на 14-е сутки для bulk-культур, на 17-е сутки для культур, полученных из 100 клеток и через 6 недель культивирования для одиночных клонов NK-клеток.

Предварительно NK-клетки инкубировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, без добавления IL-2 в течение 24 часов (для истощения пула цитокинов), после чего стимулировали IL-2 в концентрации 500 ед./мл в течение 16-18 ч. Затем к NK-клеткам добавляли клетки-мишени линии K562 в соотношении Е:Т = 1:1. Со-культивирование осуществляли в течение 2,5 часов в присутствии 2 мкМ монензина и моноклональных антител к маркеру CD107a (CD107a-APC, клон H4A3). Интенсивность дегрануляции определяли методом проточной цитометрии по доле CD107a⁺ NK-клеток. В качестве контроля базового уровня дегрануляции использовали образцы NK-клеток, прошедшие аналогичные этапы пробоподготовки и инкубации без добавления клеток-мишеней K562.

2.2.1.6. Оценка цитокин-зависимой продукции IFN γ

Продукцию IFN γ в ответ на сочетанную цитокиновую стимуляцию оценивали в bulk-культурах, а также в культурах субпопуляций NK-клеток. Предварительно клетки инкубировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS без добавления цитокинов в течение 24 ч. Затем NK-клетки стимулировали рекомбинантными интерлейкинами IL-12 (20 нг/мл) и IL-18 (20 нг/мл) в течение 20 ч. Для блокирования внутриклеточного транспорта белка за 4 ч до окончания инкубации в среду вносили 2 мкМ монензина или 10 мкг/мл брефелдина А. По окончании инкубации клетки окрашивали моноклональными антителами к CD56. Фиксацию и пермеабелизацию мембраны осуществляли с использованием коммерческого набора для внутриклеточного окрашивания. Внутриклеточное содержание цитокина определяли с помощью антител IFN γ -PE, (клон 45-15) методом проточной цитометрии.

2.2.1.7. Оценка CD16-опосредованной цитотоксичности и продукции IFN γ

Оценку антителозависимой дегрануляции и продукции IFN γ проводили путем активации сигнального пути рецептора CD16 согласно ранее описанной методике [218]. Для этого NK-клетки, полученные *ex vivo* или *in vitro*, стимулировали в лунках 96-луночных плоскодонных ИФА-планшетов, на поверхности которых предварительно были сорбированы моноклональные антитела к CD16 (клон 3G8). Антитела к CD16, растворенные в PBS, предварительно добавлялись на 1,5 ч в концентрации 2 мкг/мл и инкубировались при 37 °C и 5% CO₂. После двукратной отмывки от антител в лунки вносили суспензию NK-клеток в ростовой среде DMEM, содержащей 2 мкМ монензина (для блокады внутриклеточного

везикулярного транспорта) и моноклональные антитела к маркеру дегрануляции CD107a-APC. Инкубацию проводили в течение 6 часов при 37 °C и 5% CO₂.

По окончании инкубации NK-клетки фенотипировали. NK-клетки *ex vivo* окрашивали панелью антител (CD56-PE-Vio615, CD57-APC-Vio770, NKG2A-PE, NKG2C-FITC), тогда как для культивируемых *in vitro* клеток использовали антитела CD56-PE-Vio615, чтобы детектировать фракцию жизнеспособных клеток. Затем образцы фиксировали, пермеабелизировали и проводили внутриклеточное окрашивание антителами IFN γ -PE. Образцы анализировали посредством проточной цитометрии.

2.2.1.8. Оценка лизиса мишеней NK-клетками

Цитолитическую активность модифицированных HER-CAR-NK- и контрольных GFP⁻ NK-клеток определяли флуориметрическим методом по выходу кальцеина в супернатант. Клетки-мишени линии BT-474, MCF7 и SKOV-3 предварительно нагружали флуоресцентным красителем Calcein-AM в концентрации 2,5 мкМ. Эффекторы и клетки-мишени со-культивировали в соотношении Е:Т = 1:1 в течение 4 ч при температуре 37 °C 5% CO₂. Регистрацию интенсивности флуоресценции супернатанта проводили на спектрофлуориметре Glomax Multi (Promega, США) при длине волны возбуждения λ = 490 нм и эмиссии λ = 510–570 нм. В качестве отрицательного контроля (neg) использовали интактные клетки-мишени, в качестве положительного (pos) — клетки-мишени, обработанные 1% раствором Triton X-100 (Am-O694-0.1, США). Уровень специфического лизиса клеток-мишеней определяли по формуле: $\% = 100 \times (MFI - MFI_{neg}) / (MFI_{pos} - MFI)$.

2.2.1.9. Мультиплексный анализ продукции цитокинов

Оценку секреторного профиля культур проводили при совместном и раздельном культивировании эффекторов (периферические NK-клетки, NK-92) и опухолевых мишеней в виде сфероидов (линии MCF7, BT-474, SKOV-3). Сфероиды на 5–6 день помещали из агаровых форм в 96-луночные планшеты (по 9 единиц на лунку) и добавляли эффекторные клетки в соотношении эффектор:мишень = 3:1 в объеме 200 мкл. Через 24 часа инкубации при 37 °C, 5% CO₂ клетки ресуспендировали, центрифугировали, а очищенный супернатант замораживали. Секрецию факторов GM-CSF, гранзима B, IFN γ , и TNF регистрировали методом проточной цитометрии с помощью тест-системы MACSplex Cytotoxic T/NK Cell Kit.

2.2.1.10. Сбор образцов для РНК-секвенирования

На первом этапе свежевыделенные NK-клетки, полученные от 4 доноров, окрашивали моноклональными антителами против поверхностных маркеров CD57-VioBlue, CD56-FITC, NKG2C-PE и NKG2A-PE-Vio770. Клетки сортировали в буфер RLT на 2 или 4 целевые

субпопуляции методом высокоскоростного клеточного сортирования на приборе FACS Vantage DiVa (Becton Dickinson, США). Сбор клеток для каждой изолированной субпопуляции осуществляли в трех независимых повторениях.

Для последующего анализа образцов *in vitro* использовали клетки фенотипа CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺, полученные из 100 клеток при стимуляции фидерными клетками, презентирующими пептиды LFL или LLL. Клетки после экспансии собирали в трех повторностях в количестве 100 000 клеток на точку.

2.2.1.11. Подготовка библиотек кДНК и секвенирование

Экстракцию тотальной РНК из криоконсервированных образцов выполняли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) по стандартной методике. Последующий синтез комплементарной ДНК (кДНК) на матрице выделенной РНК проводили с помощью коммерческого набора mRNA-seq Lib Prep Module для платформы Illumina (ABclonal, Китай) в строгом соответствии с протоколом производителя. Лигирование адаптеров и введение уникальных индексирующих последовательностей осуществляли с использованием набора реагентов RNA Adapter Module 96 Index для Illumina (ABclonal, Китай). Средний размер фрагментов в финальных библиотеках составлял 300 п.н. Полученные библиотеки подвергали полнотранскриптомному парно-концевому секвенированию на платформе Illumina NovaSeq 6000.

2.2.1.12. Анализ транскрипции генов

Первичный контроль качества исходных данных секвенирования осуществляли с помощью программы FastQC. Выравнивание парно-концевых чтений на референсный геном человека (сборка GRCh38/Ensembl) и последующий расчет профилей экспрессии выполняли с использованием алгоритма Salmon.

Поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в транскриптомах НК-клеток отдельных доноров проводили с помощью пакета DESeq2 со стандартными параметрами. При анализе объединенных данных от нескольких доноров для минимизации пакетного эффекта совместно использовали инструменты пакетов DESeq2 и limma. Расчет нормированных показателей изменения уровня экспрессии ($\log_2$ Fold Change, LFC) осуществляли с помощью R-библиотеки areglm. Статистически значимыми ДЭГ для каждого сравнения считали гены, удовлетворяющие следующим пороговым критериям: абсолютное значение $|LFC| > 0,58$ при скорректированном уровне значимости $P_{adj} < 0,05$.

2.2.2. Сфероидные культуры опухолевых линий: получение и оценка жизнеспособности

2.2.2.1. Получение сфероидных культур

Трёхмерные опухолевые сфероиды (3D-культуры) формировали в 9-луночных агарозных формах, изготовленных с использованием 3D-матриц по ранее описанной методике [219]. Для этого суспензии клеток линий BT-474, MCF-7, SKOV-Kat или SKOV-3 в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, вносили в лунки агарозного геля (ПанЭко) из расчета 20 000 клеток на лунку. Агарозные формы предварительно размещали в 12-луночных планшетах для культивирования. Засеянные клетки инкубировали в течение 6 суток при 37 °C и 5% CO₂, половину среды заменяли на 3-й день культивирования. Контроль формирования и визуализацию сформированных сфероидов перед последующими этапами анализа проводили с помощью стереомикроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием объектива с увеличением 4×.

2.2.2.2. Оценка жизнеспособности сфероидных культур посредством конфокальной микроскопии

Для оценки восприимчивости сфероидных культур к цитотоксическому воздействию НК-клеточных эффекторов, сфероиды SKOV-kat, экспрессирующие флуоресцентный белок Katushka (TurboFP635), инкубировались с НК-клетками или клетками линии NK-92 в течение 24 ч при 37 °C и 5% CO₂ в соотношении Е:Т = 3:1.

Трёхмерные изображения опухолевых сфероидов SKOV-kat регистрировали с помощью инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM980 (Carl Zeiss, Германия) с использованием объектива с увеличением 10× (NA = 0,3). Для визуализации ядер погибших клеток, окрашенных SytoxBlue, и живых опухолевых клеток линии SKOV-kat применяли лазеры с длинами волн 445 и 594 нм, соответственно. Сбор сигнала эмиссии флуоресценции осуществляли в спектральном λ -режиме с помощью 34-канального детектора QUASAR (Carl Zeiss) в диапазоне 405–695 нм. Последующее спектральное разделение сигналов выполняли в программном обеспечении ZEN 2012 SP5 (Carl Zeiss).

Изображения регистрировали в формате Z-стеков с последующей трёхмерной реконструкцией и обработкой в программе Imaris версии 9.8 (Oxford Instruments, Великобритания). Для проведения количественного анализа из объемной модели каждого сфероида виртуально выделяли секции толщиной 200 мкм. Идентификацию индивидуальных клеток и ядер осуществляли путем их трансформации в точечные объекты (точки) на основе проекций максимальной интенсивности сигнала. Диаметр единичного объекта был задан как 7 мкм для ядер клеток линии NK-92-GFP, 10 мкм для ядер клеток SKOV-Kat и 25 мкм для цельных клеток

SKOV-Kat. Число объектов в объеме рассчитывали с помощью статистического модуля программы Imaris.

2.2.2.3. Оценка жизнеспособности сфероидных культур посредством проточной цитометрии
Перед проведением цитофлуориметрического анализа сфероиды, со-культивированные с NK-клеточными эффекторами, отмывали в PBS и дезинтегрировали в растворе Accutase в течение 15 минут. Для получения гомогенной суспензии единичных клеток образцы интенсивно пипетировали, после чего повторно отмывали PBS. Воздействие NK-клеток на сфероиды определяли по внутриклеточному содержанию гранзима В в сфероидах или по доле нежизнеспособных клеток SytoxBlue⁺. Определение внутриклеточного содержания гранзима В (GrB) осуществляли с использованием коммерческого набора для пермеабилзации мембран. При анализе нефиксированных образцов непосредственно перед сбором данных на проточном цитометре в суспензию вносили флуоресцентный краситель SytoxBlue, связывающийся с нуклеиновыми кислотами (Invitrogen, США) для исключения погибших клеток из анализа поверхностных маркеров.

2.2.3. Получение генетически модифицированных линий фидерных клеток и CAR-NK-клеток

2.2.3.1. Трансформация клеток *E.coli*

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма X-Blue проводили методом теплового шока. К 100 мкл бактериальной суспензии, оттаявшей на льду, добавляли 10 нг плазмидной ДНК, несущей ген устойчивости к ампициллину, целевой ген (HLA-E или гены 9-29/G3-HER2-CAR) и репортерный ген *GFP*. После 30-минутной инкубации на льду смесь подвергали тепловому воздействию при 42 °C в течение 35 секунд с последующим немедленным охлаждением на льду (2 мин). Далее в образцы вносили 400 мкл питательной среды LB без антибиотика и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и встряхивании (210 об/мин) для экспрессии маркера резистентности. Трансформированные бактерии высевали на твердую среду LB-агар, содержащую ампициллин, и культивировали в течение 12–16 часов при 37 °C. Полученные изолированные колонии использовали для последующей наработки плазмидной ДНК.

2.2.3.2. Накопление и получение плазмид, несущих целевую конструкцию

Для амплификации плазмиды единичные колонии трансформированных клеток вносили в 1 мл среды LB с антибиотиком и инкубировали в течение 12–16 часов (37 °C, 210 об/мин). Полученную стартовую культуру переносили в 10 мл свежей среды и дорастивали при интенсивной аэрации до фазы насыщения $OD_{600} = 1,4-1,6$. Часть полученных бактерий

замораживали в 20%-м растворе глицерина со средой LBS. Экстракцию и очистку плазмидной ДНК из оставшегося объема суспензии выполняли посредством коммерческого набора Plasmid Miniprep 2.0 по стандартной инструкции.

2.2.3.4. Трансфекция клеток Phoenix Ampho

Клетки линии Phoenix-Ampho высевали в чашки Петри диаметром 10 см, предварительно покрытые смесью поли-L-лизина и желатина, в плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/чашку в среде DMEM с 10% FBS без антибиотиков и культивировали в течение суток. Трансфекцию клеток проводили одним из двух методов: липосомальным методом либо с помощью кальций-фосфатного набора.

Получение вирусных частиц для трансдукции K562-mbIL21 осуществляли липосомальным методом. Трансфекцию клеток целевой плазмидой pBABE-HLAЕ и пакующим вектором RD114 выполняли с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в среде Opti-MEM согласно протоколу производителя. Через 4–6 часов среду заменяли на DMEM с 3% FBS. Сбор вирусных супернатантов осуществляли через 48 и 72 часа с последующим замораживанием при $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Эффективность трансфекции детектировали по флуоресценции GFP на 2-е сутки методом конфокальной микроскопии на приборе Nikon Eclipse TE2000-E (Nikon, Япония; лазеры 408, 488 и 543 нм).

Трансфекцию PhoenixAmpho для трансдукции NK-клеток с целью получить HER2-CAR-NK-клетки осуществляли с помощью кальций-фосфатного набора в соответствии с инструкцией производителя.

2.2.3.5. Сбор и концентрирование вирусных частиц

Полученный супернатант, содержащий вирусные частицы, фильтровали через мембрану Millex-HV с порами 0,45 мкм (Millipore, США), после чего вирусные частицы концентрировали ультрацентрифугированием (21 000 g, 2,5 ч, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Полученный осадок ресуспендировали в минимальном объеме ростовой среды.

2.2.3.6. Трансдукция клеток

Лунки 96-луночного планшета предварительно покрывали раствором ретронектина 20 мкг/мл, по 50 мкл на лунку (Takara Bio, Япония) и выдерживали раствор в течение 2 часов при комнатной температуре или 12–16 часов при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После удаления раствора лунки блокировали 2% раствором BSA в PBS. Вирусные частицы, сконцентрированные из 8–10 мл супернатанта, вносили в подготовленные лунки и иммобилизовали центрифугированием (1800 g, 2 ч, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). По окончании центрифугирования супернатант удаляли, в лунки высевали клетки K562-mbIL21 или NK-клетки в культуральной среде и повторно центрифугировали

(1800 g, 30–40 мин, 30 °C). Эффективность трансдукции оценивали через 3–5 суток по доле флуоресцирующих GFP⁺ клеток методом проточной цитометрии.

2.2.4. Инкубация фидерных клеток с пептидами HCMV: синтез пептидов и подбор условий инкубации

2.2.4.1. Синтез пептидов HCMV

Для синтеза пептидов VMAPRTLFL и VMAPQSLLL использовались следующие реагенты: полистирольная смола с 2-хлортритилхлоридным линкером, Fmoc-защищенные аминокислоты и HATU производства GL Biochem Shanghai (Шанхай, Китай), TIS от Iris Biotech (Марктредвиц, Германия), 4-метилпиперидин от Mosinter Chemicals (Нинбо, Китай), трифторуксусная кислота от Solvay S.A. (Брюссель, Бельгия) и ацетонитрил (сорт для градиентного ВЭЖХ) от Biosolve (Дьёз, Франция). Дихлорметан (ДХМ) перед использованием высушивали над CaH₂ и перегоняли с дефлегматором. Все остальные реагенты и растворители коммерчески доступны, были приобретены у локального поставщика и использовались без дополнительной очистки.

Твердофазный синтез пептидов осуществляли на автоматизированном параллельном пептидном синтезаторе индивидуальной сборки, сконструированном на базе жидкостного манипулятора Gilson. В работе применяли Fmoc-стратегию с активацией HATU/DIPEA. Присоединение C-концевой аминокислоты к активированной 2-хлортритилхлоридной смоле проводили в присутствии DIPEA в течение 2 ч. Последующее введение всех аминокислотных остатков выполняли в автоматическом режиме по следующей циклической процедуре:

- PIP (30%-й раствор в NMP, из расчета 25 мл на 1 г смолы), 2 × 10 мин;
- ДМФ (20 мл на 1 г смолы), 5 × 5 мин;
- Fmoc-AA(PG)-OH (8 экв., 0,5 М раствор в NMP) / HATU (8 экв., 0,5 М раствор в NMP) / DIPEA (16 экв.), 40 мин;
- ДМФ (25 мл на 1 г смолы), 5 × 5 мин.

По завершении синтеза пептидил-смола промывали метанолом (MeOH, 30 мл на 1 г смолы, 5 × 5 мин) и высушивали под вакуумом.

Для финального деблокирования пептида использовали стандартную смесь для отщепления состава TFA/DTT/H₂O/TIS (89/6/5/1 по объему). Сухую пептидил-смола суспендировали в смеси для отщепления (из расчета 15 мл на 1 г смолы) и встряхивали в течение 2 часов. После отделения смолы фильтрованием к фильтрату добавляли диэтиловый эфир (в 10-кратном избытке по отношению к объему реакционной смеси), полученную суспензию выдерживали при температуре –20 °C в течение нескольких часов, а затем центрифугировали.

Сформированный осадок промывали аналогичным объемом диэтилового эфира (3 раза) и высушивали под вакуумом.

2.2.4.2. Инкубация фидерных клеток K562-21E с пептидами HCMV

Экспрессию молекул HLA-E на фидерных клетках линии K562-21E индуцировали с помощью пептидов VMAPRTLFL или VMAPQSLLL. Для этого клетки центрифугировали при $200\times g$ в течение 5 минут, после чего насухо удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в бессывороточной среде Opti-MEM, содержащей пептид в концентрациях 75, 150 или 300 мкМ. Затем клетки в диапазоне концентраций от 2×10^5 до 2×10^6 клеток/мл инкубировали с пептидом в течение от 1 до 24 часов в 24-луночной планшете при температуре 37 °C и 5% CO₂.

2.2.5. Статистический анализ и обработка данных

Анализ данных проточной цитометрии выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo VX (v10, FlowJo LLC, США). Статистическую обработку и визуализацию результатов проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism (версий 8.00 / 8.4.3; GraphPad Software, США). В первую очередь оценивали нормальность распределения данных с помощью критерия Д'Агостино–Пирсона (при объеме выборки $n > 8$) или критерия Шапиро–Уилка (при $6 < n < 8$). Выборки объемом $n < 6$ считали распределенными ненормально. Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента корреляции Пирсона для параметрических данных и коэффициента корреляции Спирмена — для непараметрических. Сравнение выборок проводили с применением следующих статистических критериев. Для сравнения двух независимых выборок применялся парный или непарный t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении) либо U-критерий Манна–Уитни (при ненормальном распределении). Для сравнения двух связанных выборок - парный критерий Вилкоксона. Для множественных сравнений применялись однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA), в том числе ANOVA с повторными измерениями (для параметрических данных), либо непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным post-hoc анализом с помощью критерия Данна (для независимых выборок) и критерий Фридмана (для связанных выборок). Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Статистически значимыми считали различия при значении $p\text{-value} < 0,05$. Для обозначения уровней значимости принята следующая система: ns – нет различий; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,005$; **** — $p < 0,0001$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 НК-клетки как агенты против опухолевых сфероидов

3.1.1. Получение сфероидов HER2-экспрессирующих опухолевых линий

Солидные опухоли представляют собой трехмерные структуры с плотными межклеточными контактами и потенциально иммуносупрессивным микроокружением. Проникновение в толщу опухоли может быть затруднено, поэтому для оценки цитотоксической активности НК-клеток против солидных опухолей особенно важна разработка модели, позволяющей получать трехмерные клеточные культуры. Для оценки цитотоксического воздействия НК-клеток на солидные опухоли мы получали 3D-культуры (сфероиды) HER2-экспрессирующих культур BT-474, SKOV-3 и MCF7 в агарозных формах. Опухолевые клетки формировали плотные шарообразные скопления, схожие по форме и размеру. Сфероиды BT-474 и MCF7 с течением времени увеличивались в размерах, тогда как SKOV-3, напротив, уменьшались (Рис. 3А-В). Рост площади сфероидов может быть следствием увеличения клеточной массы, уменьшение площади – следствием повышения экспрессии молекул межклеточной адгезии и формирования более плотной трехмерной структуры. Тесное взаимодействие клеток в сфероиде может влиять на уровень экспрессии таргетной молекулы, поэтому мы провели сравнение экспрессии HER2 на поверхности исследованных культур в 2D- и 3D-модели. В сфероидных культурах BT-474 и SKOV-3 наблюдалась повышенная экспрессия HER2: уровень экспрессии был выше соответственно в 2 и 1,6 раза по сравнению с 2D-культурами. В сфероидных культурах MCF7, напротив, наблюдалось снижение экспрессии HER2 в 1,6 раза по сравнению с 2D-культурами (Таблица 2, Рис. 3Г). Примечательно, что для MCF7 в целом была характерна более низкая экспрессия HER2 по сравнению с культурами BT-474 и SKOV-3.

Таким образом, нами была адаптирована модель 3D-культур для последующего анализа цитотоксической активности НК-клеточных эффекторов.

Таблица 2. Уровень экспрессии HER2 в 2D- и 3D-культурах опухолевых линий BT-474, SKOV-3 и MCF7.

Клеточная линия	HER2, gMFI в 2D-культурах	HER2, gMFI в 3D-культурах	HER2, gMFI (3D)/ HER2, gMFI (2D)
BT-474	114.2	234.9	2.05
SKOV-3	135.6	219.0	1.62
MCF7	6.71	4.15	0.62

3.1.2. NK-клетки периферической крови и клетки линии NK-92 обладают различной цитотоксической активностью в зависимости от типа опухолевых сфероидов

Клетки линии NK-92 широко используются в качестве основы для создания противораковых эффекторов. Поэтому мы сравнили цитотоксическую активность NK-клеток периферической крови (pNK) и клеток линии NK-92 в отношении сфероидов HER2-экспрессирующих опухолевых сфероидов. pNK были предварительно накоплены *in vitro* при стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21, NK-92 были стимулированы IL-2 и IL-15. Инкубация NK-

эффекторов со сфероидами велась в лунках агарозных форм в присутствии IL-2 в концентрации 500 ед./мл. Периферические NK-клетки были предварительно мечены антителами к CD56, клетки NK-92 экспрессировали флуоресцентный белок GFP, что позволило исключить эффекторы из области анализа. Жизнеспособность сфероидов определяли методом проточной цитометрии по доле SytoxBlue⁺ опухолевых клеток. Во всех культурах при коинкубации с NK-клеточными эффекторами наблюдалось повышение доли мертвых SytoxBlue⁺ клеток по сравнению с контрольными культурами, которые не контактировали с эффекторами. Клетки опухоли молочной железы MCF7 обладали повышенной чувствительностью к цитотоксическому воздействию pNK, тогда как BT-474 и SKOV-3 с равной эффективностью элиминировались как pNK, так и NK-92 (Рис. 4А,Б). При этом увеличение доли мертвых клеток при коинкубации с NK-клетками было наиболее выражено в сфероидных культурах SKOV-3, а MCF7 были наименее чувствительны к воздействию клеток линии NK-92 (Рис. 4В).

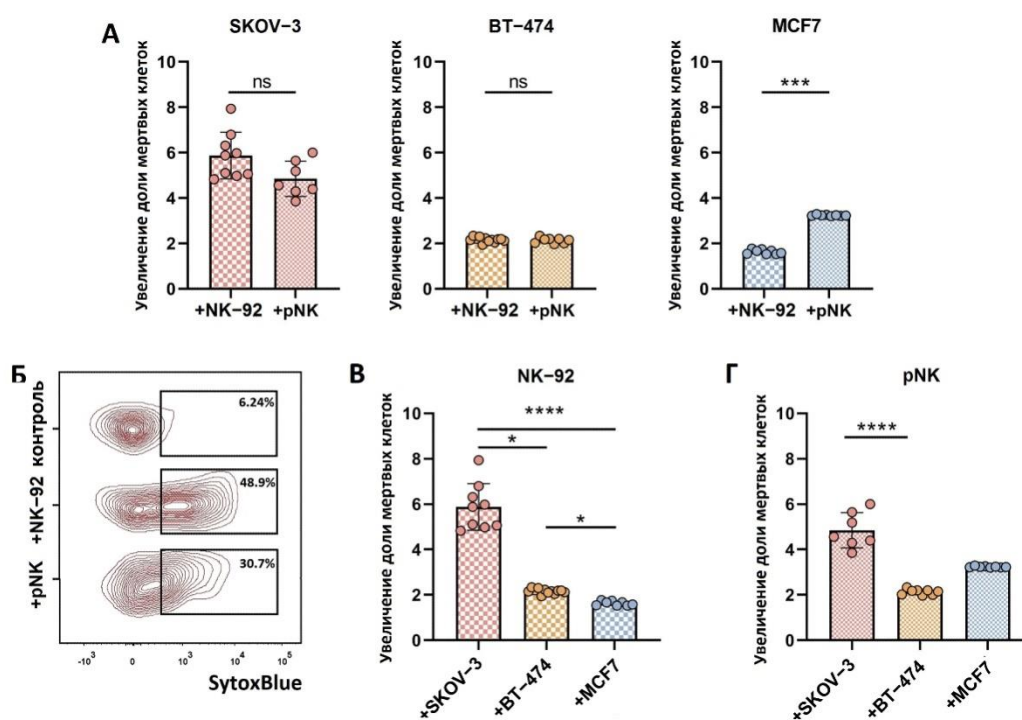


Рисунок 4. Снижение жизнеспособности опухолевых клеток в сфероиде SKOV-3, BT-474 и MCF7 при коинкубации с NK-клеточными эффекторами. А – Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде при коинкубации с периферическими NK-клетками (pNK) или клетками линии NK-92; Б – репрезентативные цитометрические данные, иллюстрирующие долю нежизнеспособных клеток в сфероиде при коинкубации с pNK или NK-92; В – Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде при коинкубации с клетками линии NK-92; Г – Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде при коинкубации с периферическими NK-клетками (pNK). Статистическая обработка данных проводилась

посредством непараметрических тестов Манна-Уитни (А) или теста Класкела-Уоллиса (В,Г), данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Цитометрическое исследование жизнеспособности клеток в сфероиде требует разрушения 3D-структуры, что является недостатком метода. Посредством конфокальной микроскопии возможно наблюдать сфероиды в интактном виде, что позволяет наиболее точно оценить число живых и мертвых клеток после коинкубации с НК-клеточными эффекторами. Для этого мы получили 3D-культуры клеток линии SKOV-Kat, экспрессирующие флуоресцентный белок Katushka, способный испускать свет в дальней красной области спектра. Число живых клеток в сфероиде после коинкубации с pNK и NK-92 мы оценивали по числу Katushka⁺ клеток, число мертвых клеток – по количеству клеток, в которые проник краситель SytoxBlue, добавленный непосредственно перед измерением. Мы показали, что число жизнеспособных Katushka⁺ клеток в сфероиде снижается при коинкубации с НК-клеточными эффекторами (Рис. 5А-Г), а число мертвых клеток, напротив, увеличивается (Рис. 5А-В, Д). При этом клетки сфероидов обладали большей выживаемостью при коинкубации с NK-92. Также мы выявили негативную корреляцию между числом живых Katushka⁺ клеток и мертвых SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде, что подтверждает адекватность использования красителя Sytox для оценки жизнеспособности опухолевых мишеней как методом конфокальной микроскопии, так и методом проточной цитометрии (Рис. 5З).

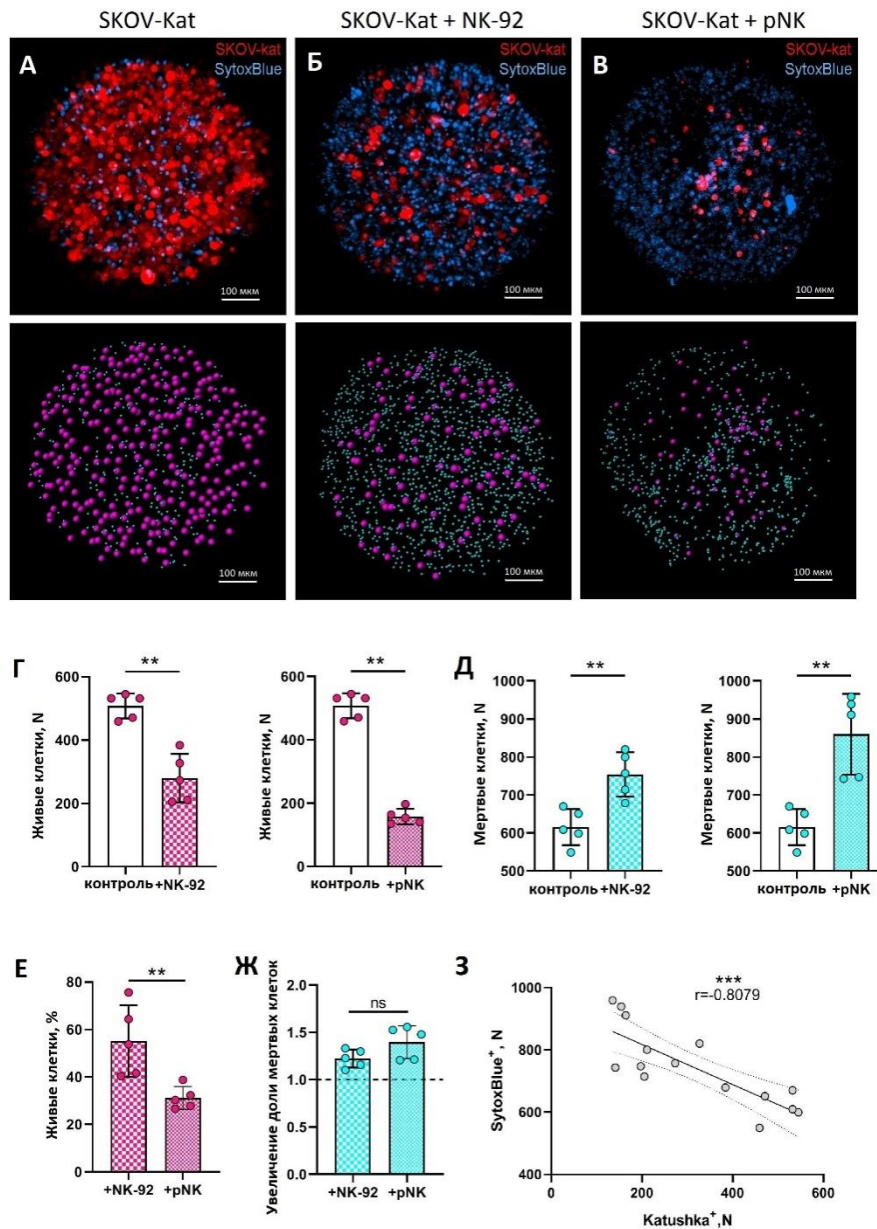


Рисунок 5. Цитотоксическая активность NK-клеточных эффекторов в отношении сфероидов SKOV-Kat, измеренная методом конфокальной микроскопии. (А-В) – Репрезентативные изображения контрольного сфероида SKOV-kat (А), сфероида SKOV-kat после коинкубации с NK-92 (Б) и сфероида SKOV-kat после коинкубации с pNK (В). Клетки коинкубировались в соотношении Е:Т = 3:1 в течение 24 часов, Клетки SKOV-Kat (красные) и ядра, положительные по SytoxBlue (синие), представлены с помощью объемного рендеринга (вверху) или с помощью пятен (SKOV-Kat, пурпурный; SytoxBlue, голубой) (снизу). (Г-Ж) – Количество живых клеток в сфероиде Katushka⁺ (Г,Е) и мертвых клеток в сфероиде SytoxBlue⁺ (Д,Ж); (З) – Корреляция между числом живых Katushka⁺ и нежизнеспособных SytoxBlue⁺ NK-клеток. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста

Манна-Уитни, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$. Корреляционный анализ проведен посредством корреляции Спирмена.

3.1.3. Периферические NK-клетки при коинкубации с опухолевыми сфероиды увеличивают продукцию IFN γ , TNF и GM-CSF

NK-клетки способны элиминировать опухолевые мишени посредством рецепторов натуральной цитотоксичности, а также вносить вклад в иммунную реакцию, продуцируя провоспалительные цитокины и активируя эффекторы опухолевого микроокружения. Чтобы оценить потенциал гуморального противоопухолевого ответа периферических NK-клеток и клеток NK-92, мы методом проточной цитометрии оценили накопление внутриклеточного IFN γ , а также посредством мультиплексного анализа детектировали накопление цитокинов IFN γ , TNF и GM-CSF в среде культивирования. Клетки NK-92 по сравнению с pNK отличались сниженным накоплением IFN γ при коинкубации с опухолевыми сфероиды. Наиболее выраженное внутриклеточное содержание и внеклеточная продукция IFN γ наблюдались при коинкубации pNK со сфероиды клеток SKOV-3 (Рис. 6А,Б). Также в среде коинкубации pNK и SKOV-3 наблюдалась повышенная концентрация провоспалительных цитокинов TNF и GM-CSF (Рис. 6В,Г). При коинкубации с BT-474 и MCF7, напротив, наблюдалась тенденция к сниженной продукции TNF. Периферические NK-клетки некоторых индивидов также демонстрировали повышенную продукцию GM-CSF при коинкубации со сфероиды MCF7 (Рис. 6Г). Особого внимания заслуживает значительный разброс значений концентрации цитокинов в супернатантах, который может быть следствием различий популяционного состава pNK между донорами. Кроме того, периферические NK-клетки отличались повышенной базовой продукцией IFN γ , TNF и GM-CSF по сравнению с клетками линии NK-92 (Рис. 6Б-Г).

Таким образом, pNK отличались большим секреторным потенциалом по сравнению с NK-92, а сфероиды SKOV-3 индуцировали более выраженную продукцию цитокинов по сравнению со сфероиды BT-474 и MCF7.

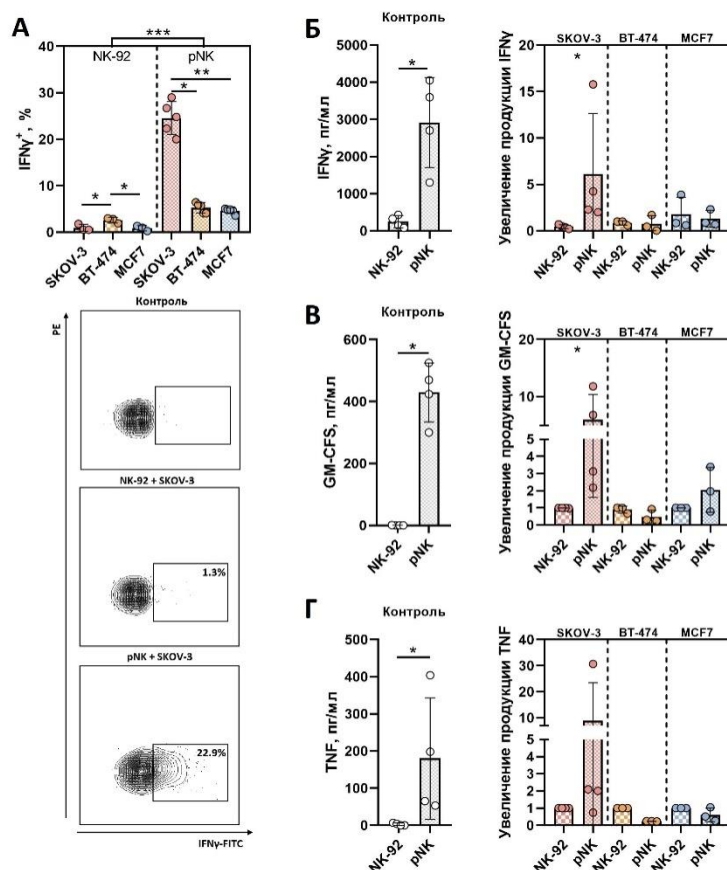


Рисунок 6. Различия в продукции цитокинов клетками NK-92 и pNK в ответ на стимуляцию сфероидом линий SKOV-3, BT-474 и MCF7. (А) Доля IFN γ -положительных клеток NK-92 и pNK в культуре после сокультивирования со сфероидом SKOV-3, BT-474 и MCF7. (Б) Уровень IFN γ в супернатантах культур клеток NK-92 или pNK без сфероидов (слева) или в присутствии сфероидов SKOV-3, BT-474 и MCF7 (справа). (В) Уровень GM-CSF в супернатантах культур клеток NK-92 или pNK без сфероидов (слева) или в присутствии сфероидов SKOV-3, BT-474 и MCF7 (справа). (Г) Уровень TNF в супернатантах культур клеток NK-92 или pNK без сфероидов (слева) или в присутствии сфероидов SKOV-3, BT-474 и MCF7 (справа). Соотношение «эффектор:мишень» Е:Т = 3:1, время инкубации $t = 24$ ч. Статистический анализ выполнен с использованием U-критерия Манна–Уитни или критерия множественного сравнения Краскела–Уоллиса; данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD).

3.1.4. Периферические NK-клетки с различной интенсивностью дегранулируют при коинкубации со сфероидом SKOV-3, BT-474 и MCF7

В основе цитотоксической активности противоопухолевых NK-клеточных эффекторов лежит их способность накапливать внутри литические гранулы, содержащие перфорин и гранзимы.

При распознавании опухоль-ассоциированных маркеров НК-клетки формируют с опухолевой клеткой иммунологический синапс, в который литические гранулы дегранулируют. Маркером дегрануляции, с экспрессией которого ассоциирована цитолитическая активность НК-клеток, является молекула CD107a/LAMP-1. Мы оценили интенсивность дегрануляции периферических НК-клеток при коинкубации со сфероиды SKOV-3, BT-474 и MCF7. Наибольшая доля CD107a⁺ НК-клеток наблюдалась при коинкубации со сфероиды SKOV-3 и MCF7 (Рис. 7А). Мы также показали, что во фракции НК-клеток, дегранулировавших в ответ на коинкубацию со всеми тремя типами сфероидов, по сравнению с покоившимися клетками, наблюдалось повышенное содержание IFN γ (Рис. 7Б). Наиболее выраженная продукция IFN γ наблюдалась в ответ на коинкубацию с клетками SKOV-3 как среди CD107a-позитивных, так и среди CD107a-негативных НК-клеток.

Мы оценили внеклеточное и внутриклеточное содержание гранзима В (GrB) в модели коинкубации периферических НК-клеток и сфероидов SKOV-3. По сравнению с контрольными значениями не наблюдалось повышенного содержания GrB во внеклеточной среде (Рис. 7В), вероятно, по той причине, что гранзимы и перфорин изливаются непосредственно в область иммунологического синапса. Вместе с тем, в НК-клеточных эффекторах мы наблюдали снижение экспрессии GrB в ответ на инкубацию со сфероиды (Рис. 7Г), а в клетках SKOV-3 детектировали клетки, в которые проникли молекулы GrB (Рис. 7Д).

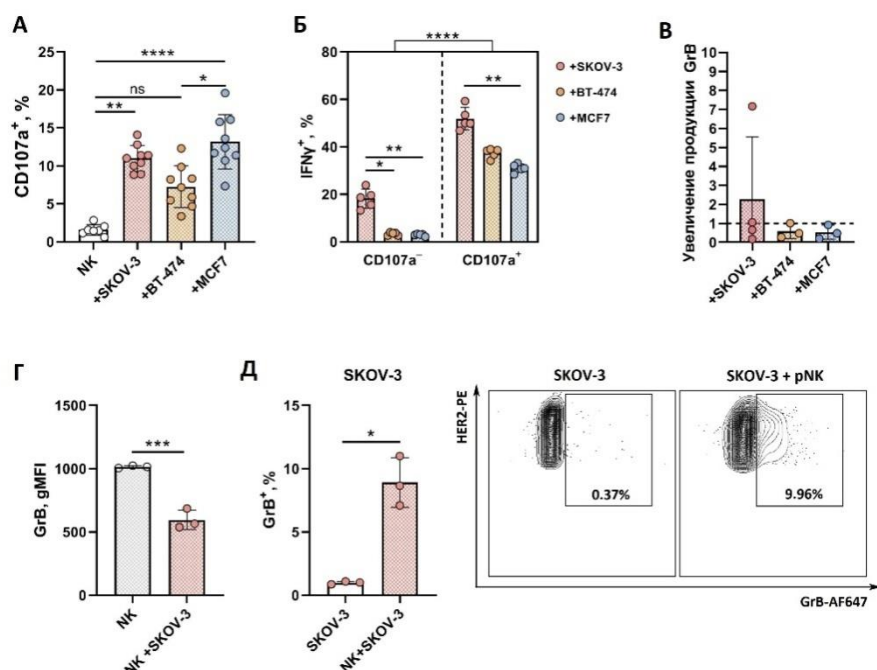


Рисунок 7. Факторы, ассоциированные с цитотоксичностью клеток pNK в ответ на стимуляцию сфероиды линий SKOV-3, BT-474 и MCF-7. (А) Дегрануляционная активность

и (Б) внутриклеточное содержание IFN γ в покоящихся (CD107a $^-$) и дегранулировавших (CD107a $^+$) клетках pNK. (В) Накопление гранзима В (GrB) в супернатантах после сокультивирования клеток pNK с опухолевыми сфероидом; (Г) Внутриклеточный уровень GrB в клетках pNK (CD56 $^+$) при раздельном культивировании и после взаимодействия со сфероидом SKOV-3; (Д) Внутриклеточный уровень GrB в клетках SKOV-3 при раздельном культивировании и после взаимодействия с клетками pNK. Соотношение «эффектор:мишень» Е:Т = 3:1, время инкубации = 24 ч. Статистический анализ выполнен с использованием U-критерия Манна–Уитни или критерия множественного сравнения Краскела–Уоллиса; данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (Mean $\pm$ SD).

3.1.5. Периферические NK-клетки задействуют в распознавании опухолевых мишеней различные оси «рецептор-лиганд»

В предыдущих экспериментах мы показали, что от типа опухоли зависела интенсивность ответа NK-клеток. Эффекторы при коинкубации со сфероидом SKOV-3, BT-474 и MCF7 демонстрировали различный уровень продукции цитокинов, дегрануляции, а также различную эффективность элиминации опухолевых сфероидов. Мы предположили, что NK-клеточный ответ на сферомиды определяется основными осями взаимодействия рецептор-лиганд, которые возникают при контакте эффекторов с мишенью. Активирующие рецепторы зачастую интернализуются при связывании со своим лигандом [220,221]. Таким образом, по снижению уровня экспрессии рецепторов можно судить о том, какие именно оси взаимодействия между NK-клетками и сфероидными культурами преобладают. По новейшей классификации, основанной на транскриптомном анализе, NK-клетки подразделяются на три когорты различной степени дифференцировки, обладающие различными функциональными чертами. В ходе дифференцировки NK-клеток изменяется профиль экспрессии активирующих и ингибирующих рецепторов, распознающих опухоль-ассоциированные лиганды. Для наименее дифференцированных клеток группы NK2 характерна высокая экспрессия активирующего рецептора NKG2D, более зрелые клетки группы NK2 экспрессируют Tim-3 и CX3CR1, а клетки группы адаптивных NK-клеток NK3 характеризуются высокой экспрессией NKG2C. Упомянутые рецепторы способны распознавать лиганды, экспонированные на клеточной мембране опухолевых мишеней. Кроме того, цитотоксически активные NK-клетки, прошедшие лицензирование в контексте здоровых тканей организма, характеризуются экспрессией ингибирующих рецепторов NKG2A и KIR. Лицензированные NK-клетки составляют основу цитотоксического пула, поэтому мы оценили вклад NK-клеток, экспрессирующих NKG2A и KIR2DL2/3, во фракцию дегранулирующих эффекторов. Также мы исследовали динамику экспрессии NK-клеточных рецепторов NKG2D, NKG2C, Tim-3,

CX3CR1 при коинкубации со сфероиды SKOV-3, BT-474 и MCF7. Помимо этого, мы детектировали экспрессию соответствующих лигандов на поверхности клеток SKOV-3, BT-474 и MCF7.

Опухолевые клетки зачастую существуют в неоптимальных условиях и экспрессируют маркеры стресса, среди них – молекулы высокой полиморфности MICA/B, родственные молекулам HLA класса I, и UL16-связывающие белки (ULBP), которые распознаются рецептором NKG2D, одним из важнейших рецепторов натуральной цитотоксичности NK-клеток. Мы показали, что при коинкубации со всеми типами сфероидов на поверхности NK-клеток, в том числе дегранулировавших, уровень экспрессии NKG2D снижается. Наиболее выраженное снижение экспрессии NKG2D – и, вероятно, наиболее выраженная интернализация рецептора при встрече с лигандом, - наблюдалась при коинкубации со сфероиды SKOV-3 (Рис. 8А). Во всех трех культурах мы детектировали экспрессию лигандов NKG2D: MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6 и ULBP3. Однако в культурах SKOV-3, по сравнению со сфероиды BT-474 и MCF7, наблюдалось наибольшее содержание клеток, экспрессирующих лиганды NKG2D. В частности, доля $ULBP3^+$ клеток в сфероидах составила более 70% (Рис. 8Б,В).

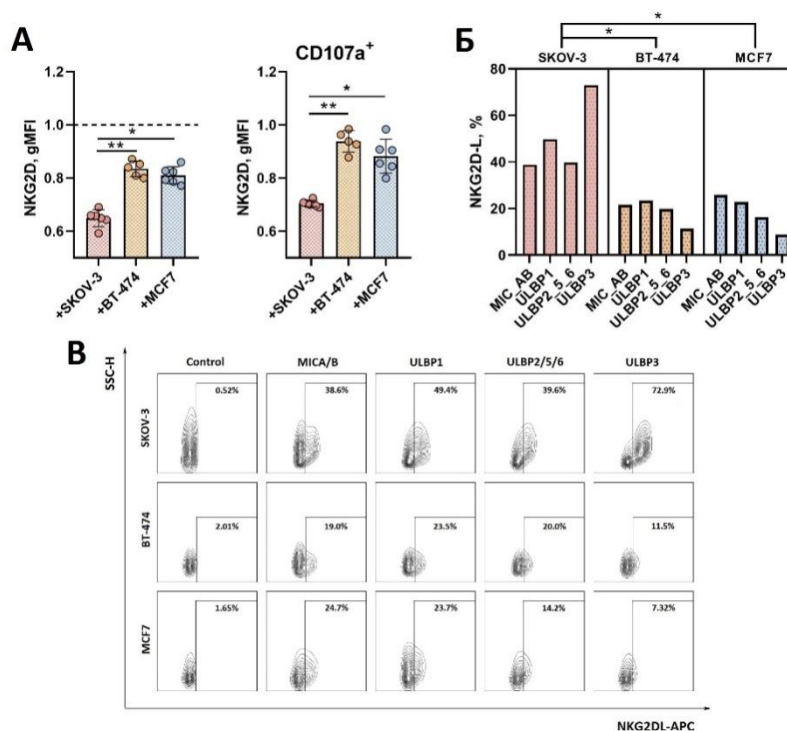


Рисунок 8. Взаимодействие NK-клеточных эффекторов со сфероиды SKOV-3, BT-474 и MCF7 по оси «рецептор-лиганд» NKG2D-NKG2D-L. (А) – Уровень экспрессии NKG2D на поверхности NK-клеток после коинкубации со сфероиды SKOV-3, BT-474 и MCF7; (Б,В) – Уровень экспрессии MICA/B, ULBP1, ULBP2/5/6, ULBP3, лигандов NKG2D, на поверхности

клеток SKOV-3, BT-474 и MCF7. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Краскела-Уоллиса, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Помимо NKG2D, в регуляцию активности NK-клеток вовлечен ряд других рецепторов, в их числе коингибирующий рецептор Tim-3. Экспрессия Tim-3 характерна для когорты NK1, пула цитотоксических NK-клеток, более зрелых по сравнению с NK2, высокое содержание которых в микроокружении опухолей может быть ассоциировано с позитивным исходом заболевания. Из лигандов Tim-3 в настоящее время наиболее хорошо изучены CEACAM1 (CEA cell adhesion molecule 1) и галектин-9. Мы исследовали экспрессию этих молекул на поверхности клеток 3D-культур SKOV-3, BT-474 и MCF7. В пуле клеток SKOV-3 и BT-474 детектировалось менее 6% клеток, экспрессирующих CEACAM1 или галектин-9, при этом более 70% клеток MCF7 экспрессировали на своей поверхности галектин-9 (Рис. 9А). Мы показали, что в ответ на коинкубацию со сфероидными SKOV-3 и BT-474 экспрессия Tim-3 на поверхности NK-клеток повышается (Рис. 9Б). При инкубации со сфероидными MCF7 такого эффекта не наблюдалось. Во фракции NK-клеток, дегранулировавших в ответ на опухолевые мишени, наблюдалось повышенная экспрессия Tim-3, менее выраженная при коинкубации с MCF7 (Рис. 9Б).

Помимо Tim-3, NK-клетки когорты NK1 характеризуются высокой экспрессией хемокинового рецептора CX3CR1 [9]. Мы исследовали экспрессию лиганда этого рецептора, CX3CL1, на поверхности клеток сфероидных культур SKOV-3, BT-474 и MCF7. Клетки SKOV-3 практически не экспрессировали CX3CL1, в пуле BT-474 и MCF7 мы детектировали соответственно 7% и чуть менее 80% клеток с фенотипом CX3CL1⁺ (Рис. 9В). Далее мы показали, что при коинкубации NK-клеток с CX3CL1-позитивными мишенями BT-474 и MCF7 наблюдается сниженная экспрессия рецептора CX3CR1 как в общем пуле клеток, так и в пуле дегранулировавших NK-эффекторов. При коинкубации со сфероидными SKOV-3 схожего эффекта не наблюдалось (Рис. 9Г).

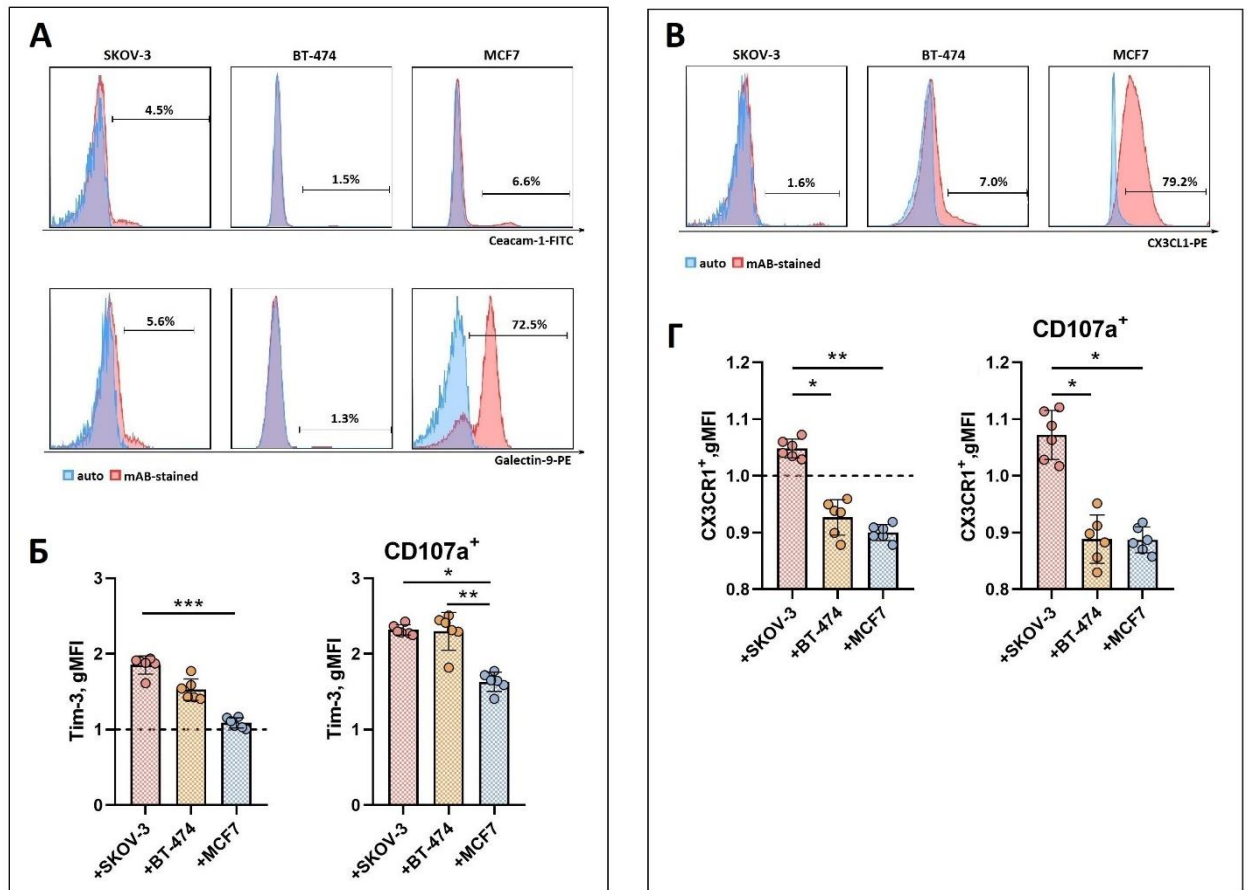


Рисунок 9. Взаимодействие NK-клеточных эффекторов со сфероидными культурами SKOV-3, BT-474 и MCF7 по осям «рецептор-лиганд» Tim-3 Ceacam-1/Galectin-9 и CX3CR1-CX3CL1. (А) – Уровень экспрессии Ceacam-1 и Galectin-9, лигандов Tim-3, на поверхности клеток SKOV-3, BT-474 и MCF7; (Б) – Уровень экспрессии Tim-3 на поверхности NK-клеток после коинкубации со сфероидными культурами SKOV-3, BT-474 и MCF7; (В) – Уровень экспрессии CX3CL1, лиганда CX3CR1, на поверхности клеток SKOV-3, BT-474 и MCF7; (Г) – Уровень экспрессии CX3CR1 на поверхности NK-клеток после коинкубации со сфероидными культурами SKOV-3, BT-474 и MCF7. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Краскела-Уоллиса, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Характерной особенностью популяции адаптивных NK-клеток NK3 является высокая экспрессия рецептора NKG2C. Этот рецептор делит лиганд HLA-E с ингибирующим рецептором NKG2A. Оверэкспрессия HLA-E помогает опухолевым клеткам избегать иммунного надзора NK-клеток, блокируя их активность по оси NKG2A-HLA-E. Мы показали, что все исследованные нами сфероидные культуры обладают экспрессией HLA-E, которая была наиболее выражена в культурах SKOV-3 (Рис. 10А,Б). Также в сфероидных культурах по сравнению с 2D-культурами наблюдалось снижение экспрессии HLA-E (Рис. 10Б, Таблица 3). При коинкубации NK-клеток со сфероидными культурами SKOV-3 мы наблюдали снижение экспрессии NKG2C

(Рис. 10В). Схожая тенденция наблюдалась при коинкубации НК-клеток со сфероидными MCF7.

Таблица 3. Уровень экспрессии HLA-E на поверхности 2D- и 3D-культур SKOV-3, BT-474 и MCF7

	HLA-E, gMFI (2D)	HLA-E, gMFI (3D)	HLA-E, gMFI (3D)/ HLA-E, gMFI (2D)
SKOV-3	34.34	30.66	0.89
BT-474	2.75	2.06	0.74
MCF7	11.9	3.07	0.26

Мы также оценили вклад в дегрануляцию лицензированных НК-клеток, экспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR или NKG2A. В пуле дегранулировавших $CD107a^+$ НК-клеток, по сравнению с покоившимися $CD107a^-$, наблюдалась большая доля НК-клеток, экспрессирующих KIR2DL2/3, что свидетельствует об их вкладе в лизис мишеней (Рис. 10Г). НК-клетки, дегранулировавшие при коинкубации с BT-474, содержали меньшую долю $NKG2A^+$ клеток, чем покоившиеся $CD107a^-$ (Рис. 10Г). Экспрессия NKG2A свойственна менее дифференцированным НК-клеткам, а ранее мы показали, что в распознавании BT-474 могут принимать более зрелые $CX3CR1^+$ НК-клетки. Кроме того, к снижению дегрануляционной активности НК-клеток могло приводить ингибирование по оси NKG2A-HLA-E. Тем не менее, при коинкубации со сфероидными SKOV-3 и MCF7, для которых была свойственна более высокая экспрессия HLA-E, доля $NKG2A^+$ НК-клеток в пуле дегранулировавших эффекторов была выше, чем в пуле покоившихся клеток. Мы предположили, что вклад в дегрануляцию могут вносить НК-клетки, которые наряду с NKG2A экспрессируют NKG2C и таким образом преодолевают ингибирование. В самом деле, вне зависимости от типа сфероидов, НК-клетки популяции $NKG2A^+NKG2C^+$ вносили больший вклад в пул дегранулировавших клеток, чем в пул покоившихся (Рис. 10Д). Клетки популяции $NKG2A^+NKG2C^-$ менее активно дегранулировали при коинкубации с BT-474, та же тенденция наблюдалась при коинкубации с MCF7 (Рис. 10Д). При коинкубации со сфероидными SKOV-3 $NKG2A^+NKG2C^-$ вносили вклад в пул $CD107a^+$ НК-клеток.

Таким образом, KIR^+ НК-клетки вносят вклад в цитотоксический ответ, а $NKG2C^-$ экспрессирующие НК-клетки способны распознавать HLA-E-экспрессирующие мишени. Что примечательно, NKG2A-опосредованное ингибирование при коинкубации с HLA-E-экспрессирующими сфероидными может быть преодолено при коэкспрессии NKG2A и NKG2C.

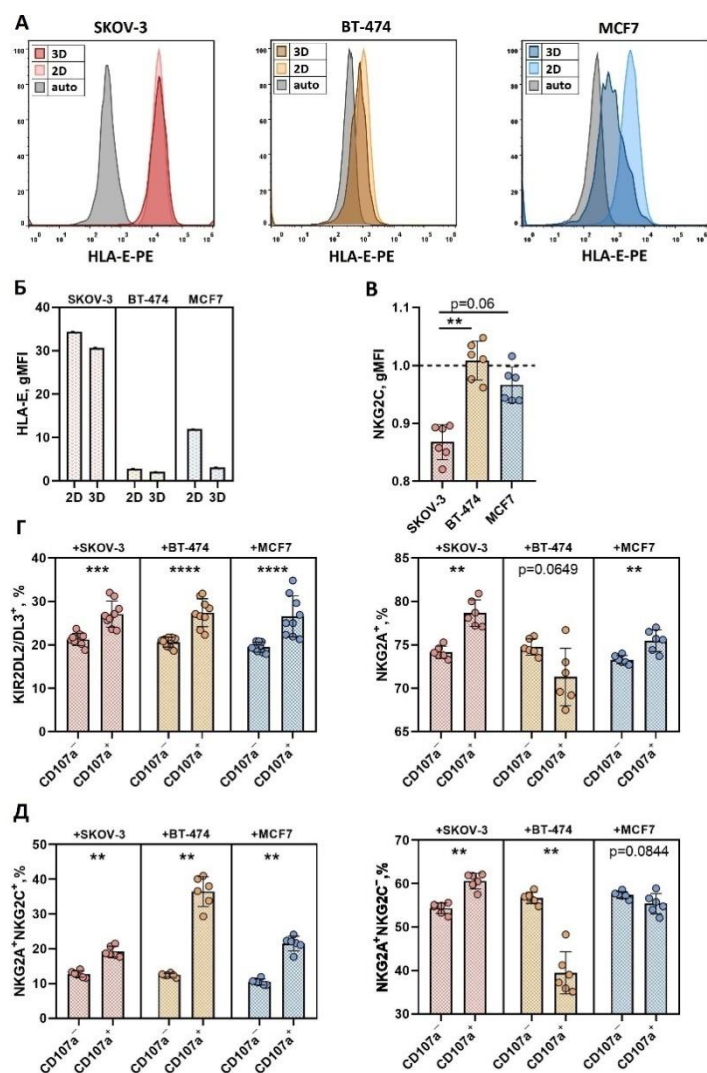


Рисунок 10. Взаимодействие NK-клеточных эффекторов со сфероидными SKOV-3, BT-474 и MCF7 по осям «рецептор-лиганд» NKG2C-HLA-E. (А,Б) – Уровень экспрессии HLA-E, лиганда NKG2C, на поверхности клеток SKOV-3, BT-474 и MCF7; (В) Уровень экспрессии NKG2C на поверхности NK-клеток после коинкубации со сфероидными SKOV-3, BT-474 и MCF7; (Г) – Доля KIR2DL2/3⁺ (слева) и NKG2A⁺ (справа) NK-клеток в пуле покоящихся (CD107a⁻) и дегранулировавших (CD107a⁺) NK-клеток при коинкубации со сфероидными SKOV-3, BT-474 и MCF7; (Д) – Доля NKG2A⁺NKG2C⁺ (слева) и NKG2A⁺NKG2C⁻ (справа) NK-клеток в пуле покоящихся (CD107a⁻) и дегранулировавших (CD107a⁺) NK-клеток при коинкубации со сфероидными SKOV-3, BT-474 и MCF7. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Манна-Уитни или теста Краскела-Уоллиса, данные представлены в виде среднее±SD.

Одним из преимуществ периферических NK-клеток как основы для создания противоопухолевых CAR-эффекторов является экспрессия ряда рецепторов, с помощью

которых NK-клетки способны распознавать даже мишени, утратившие экспрессию таргетной молекулы. С помощью 3D-модели опухолей *in vitro* мы выявили ряд дополнительных осей «рецептор-лиганд», по которым осуществляется взаимодействие между NK-клетками и опухолевыми мишенями. Для NK-клеток разных стадий дифференцировки характерна экспрессия определенного набора рецепторов, посредством которых осуществляется детекция опухолевых клеток. Мы показали, что менее дифференцированные NKG2D-экспрессирующие клетки участвуют в распознавании NKG2DL⁺ мишеней SKOV-3, более зрелые CX3CR1⁺ NK-клетки распознают мишени MCF7, которые отличаются высокой экспрессией CX3CL1. Также мы продемонстрировали высокий дегрануляционный потенциал KIR-позитивных NK-клеток и выявили участие рецептора NKG2C в цитотоксическом ответе NK-клеток на инкубацию с HLA-E-экспрессирующими опухолями (Таблица 3). Популяция NK-клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, в особенности клетки с адаптивными свойствами из когорты NK3, представляет особый интерес в контексте цитотерапии, поскольку широкий ряд солидных опухолей избегает иммунного надзора, экспрессируя HLA-E и ингибируя NK-клеточный иммунный ответ по оси NKG2A-HLA-E. Однако KIR⁺NKG2C⁺ NK-клетки обладают высокой степенью зрелости и, как следствие, сниженной чувствительностью к растворимым стимулам *in vitro*, что может затруднять их накопление в терапевтических целях. В связи с этим важен поиск источников большого числа этих клеток и разработка новых подходов к их накоплению *in vitro*.

Таблица 3. Оси взаимодействия «рецептор-лиганд» между NK-клетками и опухолевыми сфероиды SKOV-3, BT-474 и MCF7.

Когорта NK- клеток	NK2				NK1			NK3
Рецептор	NKG2D				Tim-3		CX3CR1	NKG2 C
Лиганд	MICA /B, %	ULBP1 ,%	ULBP2/5/6 ,%	ULBP3 ,%	CEACA M-1,%	Галек тин- 9,%	CX3CL1 ,%	HLA- E, gMFI
SKOV-3	38,6	49,4	39,6	72,9	4,5	5,6	1,6	30,66
BT-474	19	23,5	20	11,5	1,5	1,3	7,0	2,06
MCF7	24,7	23,7	14,2	7,32	6,6	72,5	79,2	3,07

3.2. Проллиферативная активность и стабильность фенотипа НК-клеток, коэкспрессирующих KIR2DL2/3 и NKG2C

3.2.1 Экспрессия KIR2DL2/3 и NKG2C в популяции НК-клеток ассоциирована с серологическим статусом индивидов к HCMV

Известно, что инфекция HCMV приводит к изменениям в экспрессии ряда маркеров на поверхности НК-клеток. В частности, в пуле НК-клеток HCMV-серопозитивных доноров, по сравнению с HCMV-серонегативными, наблюдается повышенное содержание NKG2C⁺ клеток, которые обладают высоким потенциалом цитотоксичности против HLA-E-экспрессирующих мишеней. Мы оценили связь серологического статуса индивидов с экспрессией активирующего рецептора NKG2C, ингибирующих рецепторов KIR2DL2/3 (далее - KIR), ингибирующего рецептора NKG2A и маркера активации HLA-DR на НК-клетках *ex vivo*. Для фенотипирования были отобраны индивиды, обладающие одной (C2/C1) или двумя (C1/C1) аллелями HLA-C1, а также несущие гены ингибирующих рецепторов KIR2DL2 и/или KIR2DL3. Таким образом KIR-экспрессирующие клетки считались прошедшими лицензирование и обладающими высоким цитотоксическим потенциалом. В пуле НК-клеток HCMV-серопозитивных доноров, по сравнению с HCMV-серонегативными, мы выявили повышенное содержание NKG2C-позитивных клеток (Рис. 11А), клеток с адаптивным фенотипом CD57⁺NKG2C⁺ (Рис. 11Б). Также мы показали, что в пуле НК-клеток HCMV-серопозитивных доноров, по сравнению с HCMV-серонегативными, содержались большие доли клеток KIR⁺, в том числе KIR⁺NKG2C⁺ (Рис. 11В,Г). Были выявлены позитивные корреляции между титром антител к HCMV и долями НК-клеток с фенотипом NKG2C⁺, CD57⁺NKG2C⁺, KIR⁺, KIR⁺NKG2C⁺ (Рис. 11А-Г).

Помимо этого, мы показали, что в кровотоке HCMV-серопозитивных доноров, по сравнению с HCMV-серонегативными, наблюдается сниженное содержание НК-клеток, экспрессирующих NKG2A (Рис. 11Д), и повышенное содержание клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (Рис. 11Е).

Популяция НК-клеток отличается высоким фенотипическим разнообразием, которое формируется под воздействием внутренних и внешних факторов. Мы показали, что инфекция HCMV влияет на фенотип НК-клеток, способствуя накоплению клеток с адаптивным фенотипом когорты NK3. Эти клетки характеризуются высокой экспрессией маркера активации HLA-DR, активирующего рецептора NKG2C, ингибирующих рецепторов KIR к собственным молекулам HLA-I, а также сниженной экспрессией NKG2A.

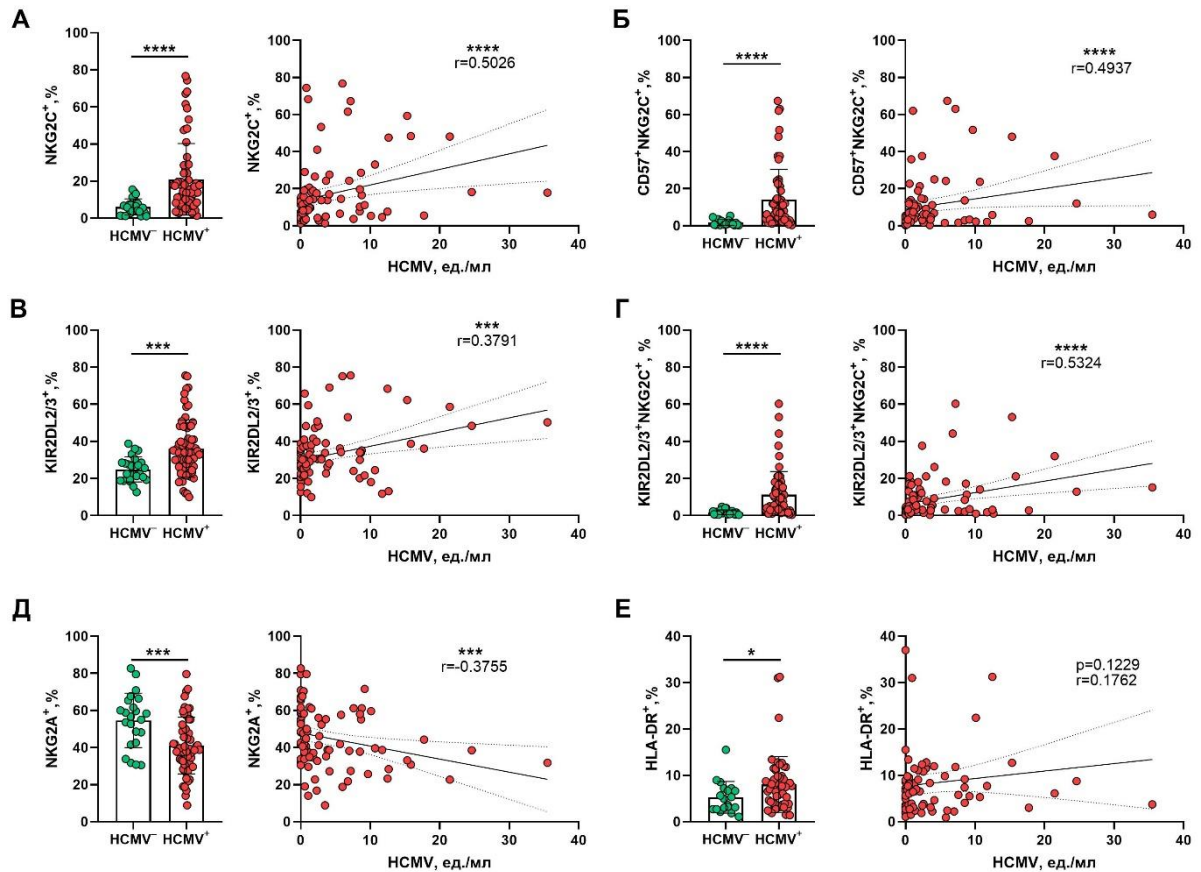


Рисунок 11. Связь инфицирования HCMV и фенотипа NK-клеток *ex vivo*. Доля NK-клеток NKG2C⁺ (А), CD57⁺NKG2C⁺ (Б), KIR2DL2/3⁺ (В), KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ (Г), NKG2A⁺ (Д) и HLA-DR⁺(Е) в кровотоке HCMV-серопозитивных и –серонегативных доноров, и корреляция между долей этих клеток и титром антител к HCMV. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Манна-Уитни, данные представлены в виде среднее±SD. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена.

Мы также оценили содержание потенциальных эффекторов с фенотипом KIR⁺NKG2C⁺ во фракциях менее дифференцированных (CD57⁻) и более дифференцированных (CD57⁺) NK-клеток HCMV-серопозитивных доноров. Клетки, не экспрессирующие KIR и NKG2C, составляли большинство в обеих фракциях. Во фракции CD57⁻ популяция KIR⁺NKG2C⁺ была самой малочисленной, в среднем 3,6%. Среди более дифференцированных клеток CD57⁺ популяция KIR⁺NKG2C⁺ была более крупной, в среднем 14,9% от общего числа CD57⁺ NK-клеток (Рис. 12).

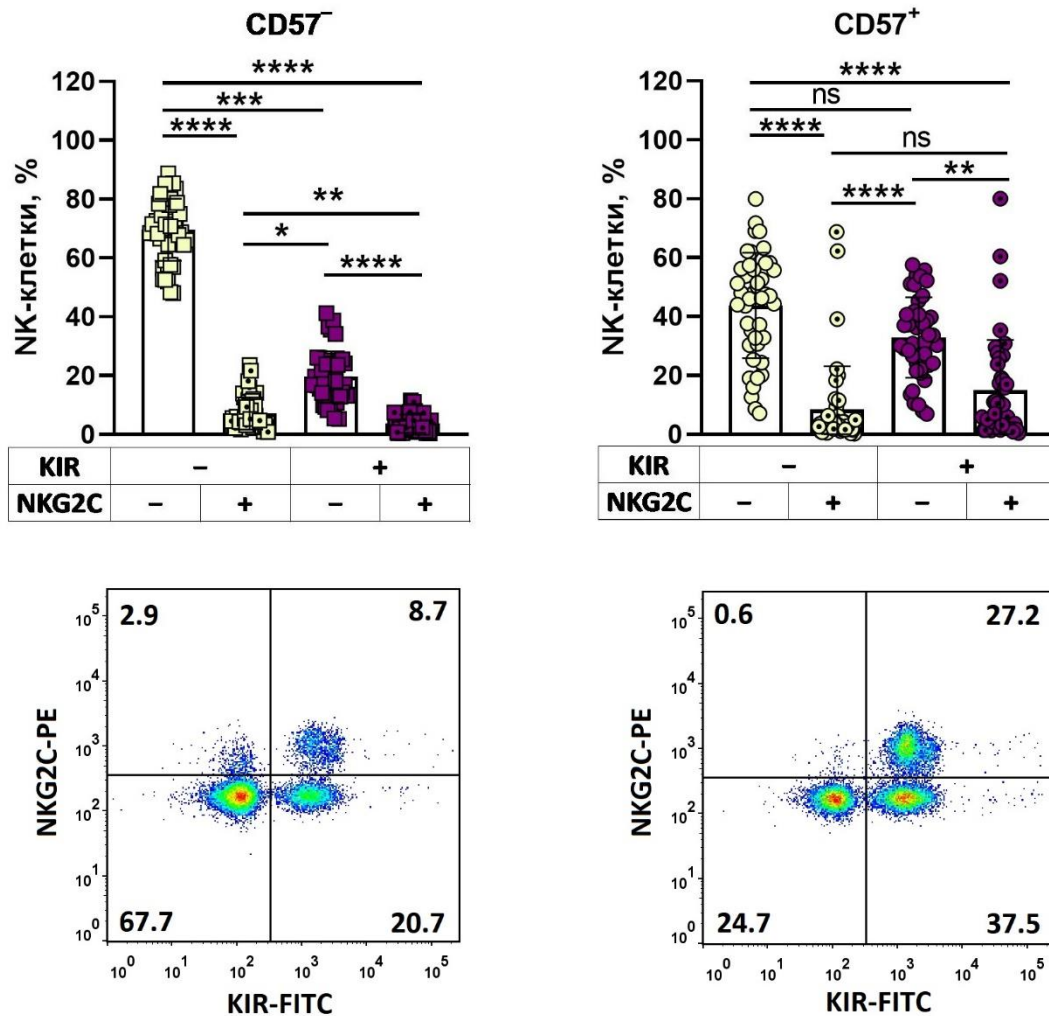


Рисунок 12. Пропорции субпопуляций с различной экспрессией KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C во фракциях CD57⁻ и CD57⁺ NK-клеток. В нижней части рисунка представлены репрезентативные цитометрические данные. Статистическая обработка проводилась посредством теста Краскела-Уоллиса, данные представлены в виде среднее±SD.

3.2.2. CD57-негативные NK-клетки, коэкспрессирующие KIR2DL2/3 и NKG2C, характеризуются низкой частотой клонообразования, однако формируют крупные клоны KIR⁺NKG2C⁺ NK-клетки составляют большую долю во фракции CD57⁺ по сравнению с фракцией CD57⁻. Однако высокодифференцированные CD57⁺ NK-клетки обладают сниженной экспрессией рецепторов к цитокинам, вследствие чего может быть затруднено накопление *in vitro* клеток с адаптивным фенотипом CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺NKG2A⁻. Ранее мы показали, что NK-клетки популяции CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺ обладают рядом свойств, присущих адаптивным клеткам, сохраняя при этом высокую пролиферативную активность.

Чтобы оценить пролиферативную активность и фенотипическую стабильность KIR^+NKG2C^+ НК-клеток разной степени дифференцировки, мы получили гетерогенные (из 100 клеток) культуры субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией маркеров CD57, KIR и NKG2C. В качестве стимула *in vitro* использовали IL-2 в концентрации 100 ед./мл и фидерные клетки K562 с мембрано-связанным IL-21 (K562-mbIL21). Гетерогенные культуры НК-клеток $CD57^-KIR^+NKG2C^+$ отличались более выраженной пролиферативной активностью по сравнению с более зрелыми клетками $CD57^+KIR^+NKG2C^+$ (Рис. 13А). Также культуры $CD57^-NKG2C^+$ НК-клеток, экспрессирующих KIR, более активно пролиферировали по сравнению с KIR-негативными культурами (Рис. 13Б).

Чтобы оценить вклад индивидуальных клеток в пролиферативный ответ, мы получили клональные культуры субпопуляций $CD57^-$ с различной экспрессией KIR и NKG2C. Всего было посажено по 120 клеток каждой субпопуляции от 4 HCMV-серопозитивных доноров. Через 5 недель мы оценивали эффективность клонирования и размер клонов. В популяции $CD57^-NKG2C^-$ НК-клетки, экспрессирующие KIR, формировали меньшее число клонов по сравнению с KIR-негативными клетками, та же тенденция наблюдалась во фракции $CD57^-NKG2C^+$ (Рис. 13В). Хотя клетки $CD57^-KIR^-$ отличались большей эффективностью клонирования, в популяции $CD57^-KIR^+NKG2C^+$ наблюдалась тенденция к формированию более крупных клонов по сравнению с популяцией $CD57^-KIR^-NKG2C^+$ (Рис. 13Г).

Мы предположили, что высокая эффективность клонирования популяций $CD57^-KIR^-$ может быть обусловлена вкладом менее дифференцированных клеток $CD56^{bright}$. Для НК-клеток $CD56^{bright}$ характерна высокая экспрессия CD25, рецептора к IL-2 высокой аффинности, и, как следствие, большая чувствительность к стимуляции IL-2 *in vitro*. Чтобы проверить эту гипотезу, мы получили клональные культуры $CD56^{bright}CD57^-NKG2C^+$ с различной экспрессией KIR. На 14 день культивирования наблюдалась тенденция к накоплению большего числа клеток в KIR-негативных клонах по сравнению с клонами KIR^+ . Однако на более поздних сроках культивирования более выраженная экспансия наблюдалась в клонах популяции $CD56^{bright}CD57^-KIR^+NKG2C^+$ (Рис. 13Д).

Таким образом, выраженная экспансия $CD57^-$ НК-клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, вероятно, обусловлена пролиферацией небольшого числа крупных клонов. На более поздних сроках культивирования возможен вклад в экспансию $CD57^-KIR^+NKG2C^+$ менее дифференцированных клеток $CD56^{bright}CD57^-KIR^+NKG2C^+$, обладающих повышенной чувствительностью к цитокиновой стимуляции.

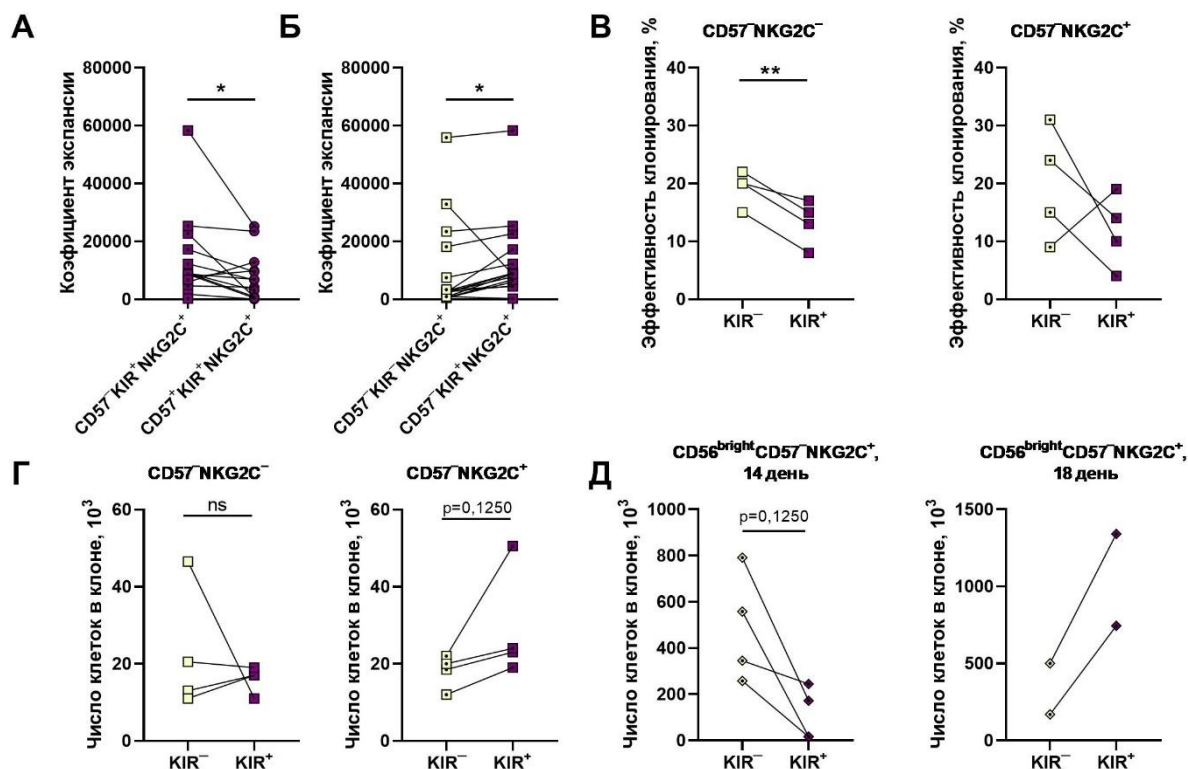


Рисунок 13. Пролиферативная активность NK-клеток с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C при активации *in vitro* посредством IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21. (А) Коэффициент экспансии культур $KIR^{+}NKG2C^{+}$ с различной экспрессией CD57; (Б) Коэффициент экспансии культур $CD57^{+}NKG2C^{+}$ с различной экспрессией KIR; (В) Эффективность клонирования NK-клеток $CD57^{-}NKG2C^{-/+}$ с различной экспрессией KIR; (Г) Число клеток в клональных культурах NK-клеток $CD57^{-}NKG2C^{-/+}$ с различной экспрессией KIR; (Д) Число клеток в клональных культурах NK-клеток $CD56^{bright}CD57^{-}NKG2C^{+}$ с различной экспрессией KIR. Статистическая обработка данных проводилась посредством парного теста Вилкоксона, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

3.2.3. NK-клетки, коэкспрессирующие KIR2DL2/3 и NKG2C, отличаются повышенной стабильностью экспрессии NKG2C

Помимо пролиферативной активности, мы также оценили фенотипическую стабильность культур NK-клеток, экспрессирующих KIR и NKG2C. Для этого при стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 были получены гетерогенные культуры из 25 000 и 100 клеток субпопуляций $CD57^{-}KIR^{+/-}NKG2C^{+/-}$. На 14 день культивирования была оценена экспрессия рецепторов KIR и NKG2C. Мы наблюдали более высокую стабильность экспрессии NKG2C в KIR-позитивных культурах по сравнению с KIR-негативными: в этих

культурах наряду с повышенной долей клеток NKG2C^+ (Рис. 14А) детектировалась также повышенная поверхностная плотность молекул NKG2C (Рис. 14Б). Мы не выявили связи между стабильностью экспрессии KIR и наличием рецептора NKG2C в культурах, полученных из 100 НК-клеток. Однако в культурах, полученных из 25 000 клеток, наблюдалась тенденция к более высокой доле KIR^+ клеток и более выраженной поверхностной экспрессии KIR при коэкспрессии с рецептором NKG2C (Рис. 14В,Г).

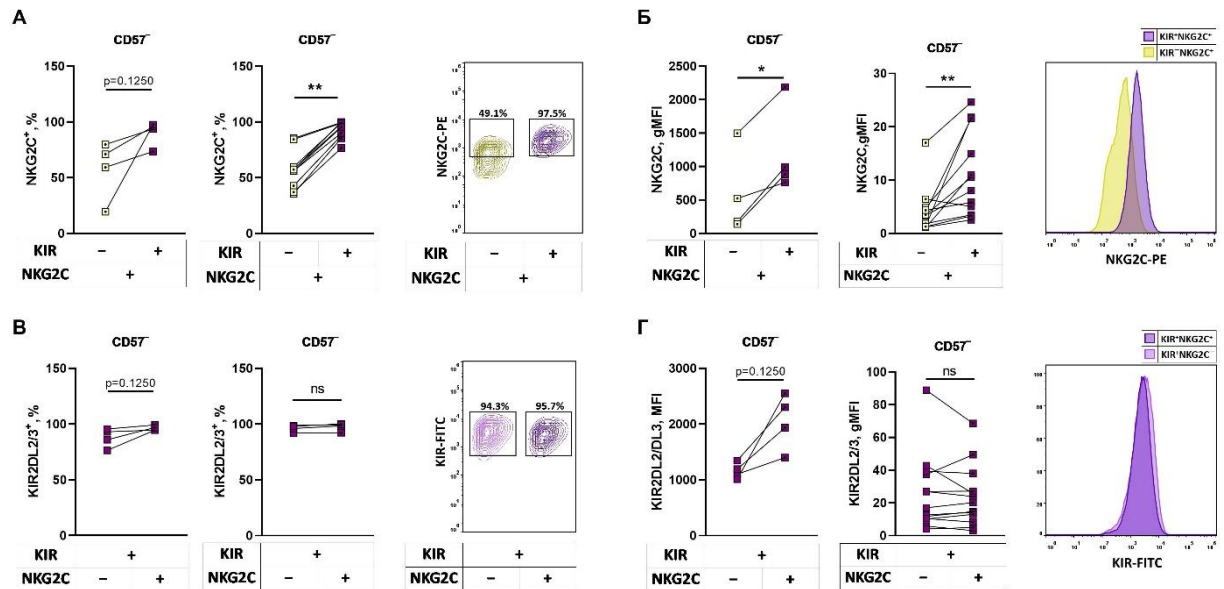


Рисунок 14. Стабильность фенотипа НК-клеток с различной экспрессией CD57 , KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C при активации *in vitro* посредством IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21 . Доля NKG2C^+ НК-клеток (А), уровень экспрессии NKG2C (Б), доля KIR2DL2/3^+ НК-клеток (В) и уровень экспрессии KIR2DL2/3 (Г). На каждом подрисунке представлены данные, полученные при анализе культур из 25 000 клеток (слева) и 100 клеток (в центре), а также репрезентативные цитометрические данные (справа). Статистическая обработка данных проводилась посредством парного теста Вилкоксона, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Также для подтверждения стабильности коэкспрессии KIR и NKG2C нами были получены клональные культуры субпопуляций $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{KIR}^{+/-}\text{NKG2C}^{+/-}$ НК-клеток от двух HCMV-серопозитивных доноров. У одного из доноров с экспрессией NKG2C была ассоциирована более высокая доля KIR^+ клеток в клонах (Рис. 15А, Донор 2), у другого донора – повышенный уровень экспрессии KIR (Рис. 15Б, Донор 1). Также у обоих доноров в клонах $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ наблюдался более высокий уровень экспрессии NKG2C по сравнению с клонами субпопуляции $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{KIR}^-\text{NKG2C}^+$ (Рис. 15В).

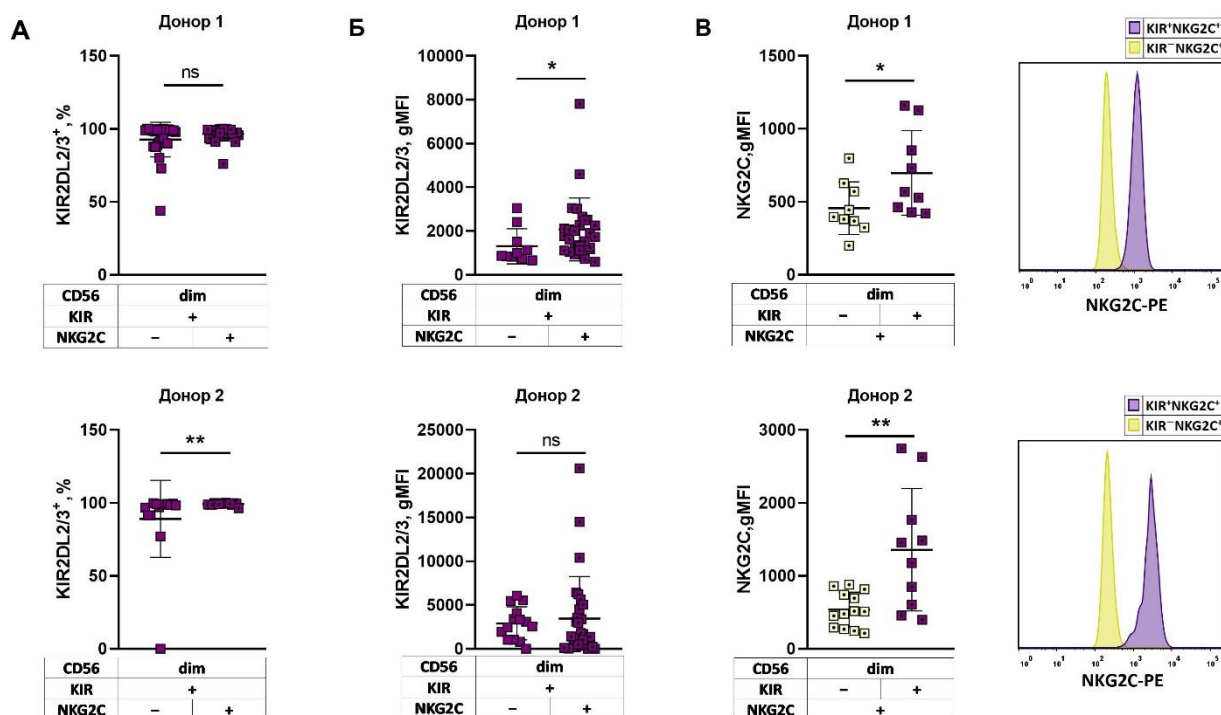


Рисунок 15. Стабильность фенотипа в клональных культурах CD57⁻ NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C при активации *in vitro* посредством IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21. Доля KIR2DL2/3⁺ NK-клеток (А), уровень экспрессии KIR2DL2/3 (Б) и уровень экспрессии NKG2C с репрезентативными цитометрическими данными (справа) (В). Представлены данные, полученные от двух HCMV-серопозитивных доноров. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Манна-Уитни, данные представлены в виде среднее±SD.

3.2.4. В ходе экспансии *in vitro* CD57⁻ NK-клетки приобретают экспрессию CD57 *de novo*

Далее мы оценили в культурах субпопуляций, полученных из 25 000 и 100 NK-клеток, экспрессию маркера зрелых клеток CD57 *de novo* и маркера активации HLA-DR. В культурах, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, наблюдалась большая доля CD57⁺ клеток по сравнению с культурами субпопуляции KIR⁻NKG2C⁺ (Рис. 16А). При этом между культурами KIR⁺NKG2C⁺ и KIR⁺NKG2C⁻ не было выявлено различий в экспрессии CD57 *de novo* (Рис. 16Б). В культурах клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C, по сравнению с культурами KIR⁻NKG2C⁺, наблюдалась повышенная доля клеток, экспрессирующих маркер активации HLA-DR (Рис. 16В), а также повышенная экспрессия HLA-DR (Рис. 16Г). При этом между культурами KIR⁺NKG2C⁺ и KIR⁺NKG2C⁻ не было выявлено различий в экспрессии HLA-DR (Рис. 16Д,Е).

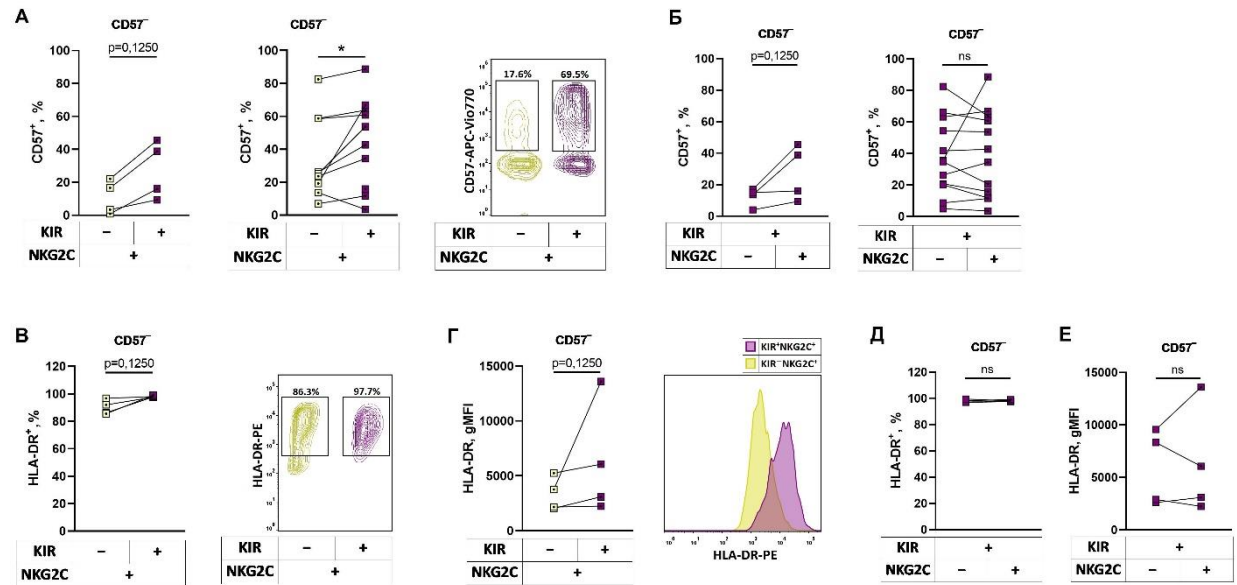


Рисунок 16. Фенотип НК-клеток с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C при активации *in vitro* посредством IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21. Доля CD57⁺ НК-клеток в культурах NKG2C⁺ с различной экспрессией KIR (А), Доля CD57⁺ НК-клеток в культурах KIR⁺ с различной экспрессией NKG2C (Б), доля HLA-DR⁺ НК-клеток в культурах NKG2C⁺ с различной экспрессией KIR (В) и доля HLA-DR⁺ НК-клеток в культурах KIR⁺ с различной экспрессией NKG2C (Г). На каждом подрисунке представлены данные, полученные при анализе культур из 25 000 клеток (слева) и 100 клеток (в центре), а также репрезентативные цитометрические данные (справа). Статистическая обработка данных проводилась посредством парного теста Вилкоксона, данные представлены в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$.

Таким образом, в пуле НК-клеток HCMV-серопозитивных доноров наблюдалось повышенное содержание клеток с адаптивным фенотипом, в том числе потенциальных противораковых эффекторов KIR⁺NKG2C⁺. Менее дифференцированные CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ НК-клетки пролиферировали *in vitro* с большей интенсивностью по сравнению с клетками CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺. При этом во фракции CD57⁻NKG2C⁺ наиболее выраженным пролиферативным потенциалом обладали клетки KIR⁺. Накопление клеток KIR⁺NKG2C⁺ достигалось, по всей видимости, за счет активной пролиферации отдельных клонов. Также при коэкспрессии с KIR рецептор NKG2C обладал более высокой стабильностью экспрессии, а в культурах CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ по сравнению с CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ наблюдалась тенденция к более выраженной экспрессии маркера активации HLA-DR. Вместе с тем, в культурах CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ детектировалась более высокая доля клеток, экспрессирующих CD57 *de novo*.

3.3. Презентация пептида HCMV *in vitro* как инструмент накопления NK-клеток с адаптивным фенотипом, коэкспрессирующих KIR2DL2/3 и NKG2C

3.3.1. Получение HLA-E-экспрессирующих фидерных клеток и подбор условий инкубации с пептидами HCMV

Одним из подходов к накоплению NKG2C⁺ NK-клеток *in vitro* является презентация HLA-E в комплексе с рядом пептидов на поверхности фидерных клеток. Для реализации такой системы стимуляции *in vitro* необходимо было создать фидерные клетки, способные презентировать на своей поверхности HLA-E в комплексе с пептидами.

Посредством ретровирусной трансдукции мы модифицировали клетки линии K562-mbIL21 конструкцией, содержащей ген HLA-E, в результате чего была получена линия клеток K562-21E, способных презентировать пептиды в составе HLA-E. Помимо гена HLA-E конструкция также содержала ген GFP, по уровню флуоресценции GFP мы определяли успешность трансдукции.

Молекула HLA-E экспонируется на клеточной мембране, только связав пептид в антигенпрезентирующей щели. Для дальнейшего применения клеток K562-21E в качестве фидерных клеток мы установили оптимальные условия инкубации с пептидом. При высоких концентрациях K562-21E во время инкубации мы наблюдали повышенное содержание нежизнеспособных клеток (Таблица 4). В качестве оптимальной плотности инкубации, при которой наблюдалась высокая экспрессии HLA-E без потери жизнеспособности, была выбрана плотность 2×10^5 клеток/мл.

При инкубации K562-21E с пептидом LFL мы наблюдали повышение экспрессии HLA-E, которая достигала максимальных значений через 5 ч инкубации (Рис. 17А). В зависимости от концентрации пептида (75 мкМ, 150 мкМ и 300 мкМ) наблюдалась различная динамика экспрессии HLA-E. При малых концентрациях (75 мкМ) экспрессия HLA-E наблюдалась после 3,5 ч инкубации, тогда как более высокие концентрации индуцировали экспрессию HLA-E уже через 2 ч. Дальнейшая инкубация приводила к повышению доли HLA-E-экспрессирующих клеток и увеличению плотности поверхностной экспрессии HLA-E (Рис. 17А, Таблица 4).

Фидерные клетки K562-21E перед применением подвергаются гамма-облучению (70-100 Гр), что наряду с заморозкой и разморозкой может сказаться на их способности презентировать HLA-E. Мы оценили экспрессию HLA-E на поверхности облученных, замороженных и размороженных клеток K562-21E после инкубации с пептидами VMAPRTLFL (LFL) и контрольным пептидом VMAPQSLLL (LLL), который обладает меньшей силой связывания с рецепторами NKG2X в комплексе с HLA-E. Инкубация с LFL приводила к экспрессии HLA-E

на поверхности фидерных клеток K562-21E, контрольный пептид LLL в этих условиях не индуцировал значительно экспрессию HLA-E на клеточной поверхности (Рис. 17Б).

Таблица 4. Влияние условий инкубации клеток K562-21E с пептидом LFL на индукцию экспрессии HLA-E.

K562-21E, 10 ³ /мл	Концентрация пептида, мкМ	Уровень экспрессии HLA-E, нормированный на контрольные образцы, инкубированные без пептида, gMFI					Доля мертвых клеток, %
		1 ч	2 ч	3,5 ч	5 ч	24 ч	
200	0	1	1	1	1	1	
	75	1,01	1,01	2,59	3,77		
	150	1,02	2,61	2,8	4,37		
	300	1,02	3,93	3,03	5,01	3,58	11,8
500	300					3,44	28
700						3,31	33
2000						1,15	70

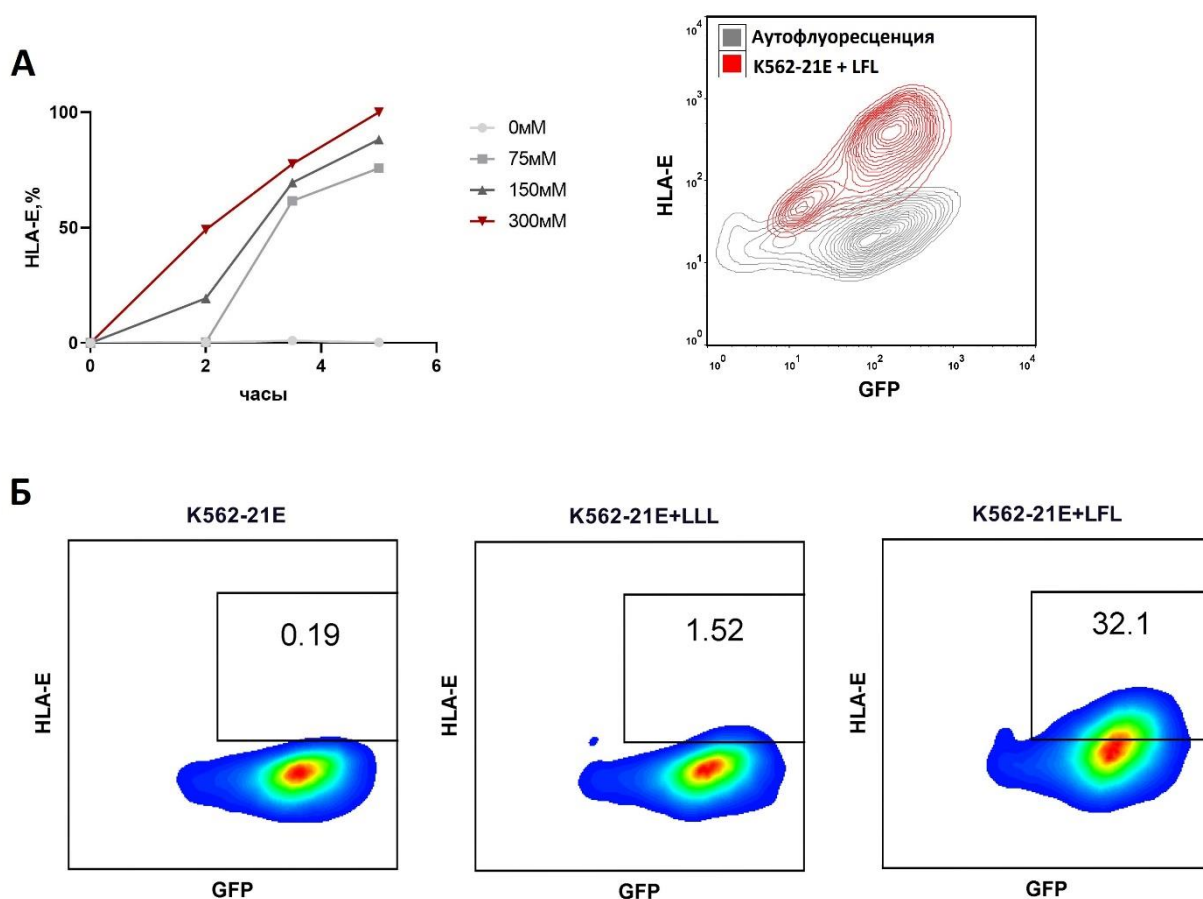


Рисунок 17. Характеристика HLA-E-экспрессирующих клеток K562-21E. (А) Зависимость доли HLA-E-экспрессирующих клеток K562-21E от концентрации пептида LFL, репрезентативные данные о экспрессии HLA-E клетками K562-21E после инкубации с 300 мкМ пептида LFL в течение 5 ч; (Б) Доля HLA-E-экспрессирующих клеток K562-21E после инкубации с пептидами LLL и LFL, использованы облученные клетки, прошедшие цикл заморозки-разморозки.

Чтобы подтвердить способность полученных клеток K562-21E активировать NK-клетки *in vitro*, мы оценили пролиферативную активность NK-клеток, стимулированных K562-21E+IL-2. В качестве контрольных стимулов использовали IL-2 в концентрации 100 ед./мл и фидерные клетки K562-mbIL21 в сочетании с IL-2. NK-клетки были предварительно мечены CFSE, активация проводилась в течение 7 дней, после чего оценивалось содержание не делившихся клеток с высокой экспрессией CFSE (CFSE^{hi}) и активно пролиферировавших клеток (CFSE^{low}). Мы не выявили различий в долях CFSE^{hi} и CFSE^{low} между NK-клетками, активированными в присутствии фидерных клеток K562-21E и K562-mbIL21 (Рис. 18). Таким образом, модификация HLA-E не повлияла на фидерные свойства клеток K562-21E.

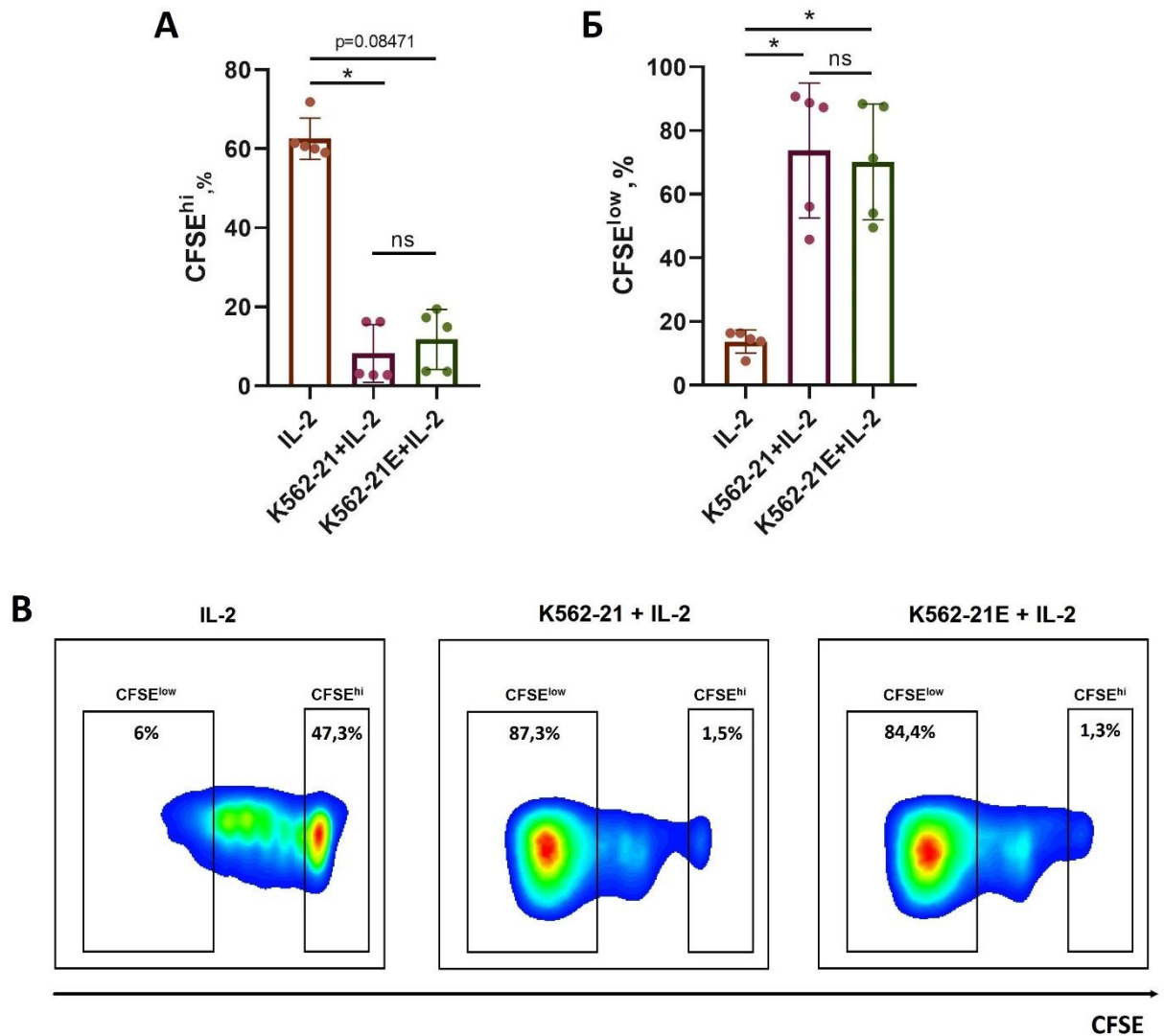


Рисунок 18. Пролиферативная активность NK-клеток при стимуляции IL-2 в комбинации с фидерными клетками K562-21E или K562-mbIL21. (А) Доля NK-клеток CFSE^{hi}, не делившихся в ответ на стимул; (Б) Доля NK-клеток CFSE^{low}, поделившихся 6 и более раз при стимуляции; (В) Содержание CFSE в меченных CFSE NK-клетках после стимуляции IL-2 в комбинации с фидерными клетками K562-21E или K562-mbIL21. Число доноров N = 5 (А,Б). Время культивирования t = 7 дней. Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического теста Краскела-Уоллиса для множественных сравнений, данные представлены в виде среднее±стандартное отклонение.

3.3.2. Пролиферативный ответ bulk-культур и CD57-негативных культур NK-клеток на презентацию пептида HCMV *in vitro*

Чтобы оценить влияние презентации комплекса HLA-E+пептид на пролиферативную активность NK-клеток, мы получили bulk-культуры NK-клеток и культуры CD57-негативных NK-клеток при стимуляции IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-21E, которые

инкубировались с пептидом LFL (LFL-культуры) или без него (контрольные культуры). NK-клетки были получены от HCMV-серопозитивных и серонегативных индивидов. Пролиферативная активность bulk-культур оценивалась через 14 дней культивирования по коэффициенту экспансии культур. LFL-культуры обладали более низкой пролиферативной активностью по сравнению с контрольными культурами (Рис.19А). Коэффициент экспансии LFL-культур CD57⁻ NK-клеток и контрольных культур оценивался через 6, 12 и 18 дней после начала стимуляции. Помимо этого, был оценен относительный коэффициент экспансии ($E/21$), $K = K(\text{LFL})/K(\text{контроль})$, где $K(\text{LFL})$ – коэффициент экспансии LFL-культур, $K(\text{контроль})$ – коэффициент экспансии контрольных культур. Через 12 дней LFL-культуры CD57⁻ NK-клеток обладали более высокой пролиферативной активностью по сравнению с контрольными культурами (Рис. 19Б). Примечательно, что CD57⁻ NK-клетки были способны отвечать на стимуляцию LFL вне зависимости от серологического статуса индивида. Также по сравнению с днем 6 на 12-й день культивирования наблюдалось повышение относительного коэффициента экспансии, однако пролиферативный ответ на 18-й день варьировал в зависимости от донора (Рис. 19В).

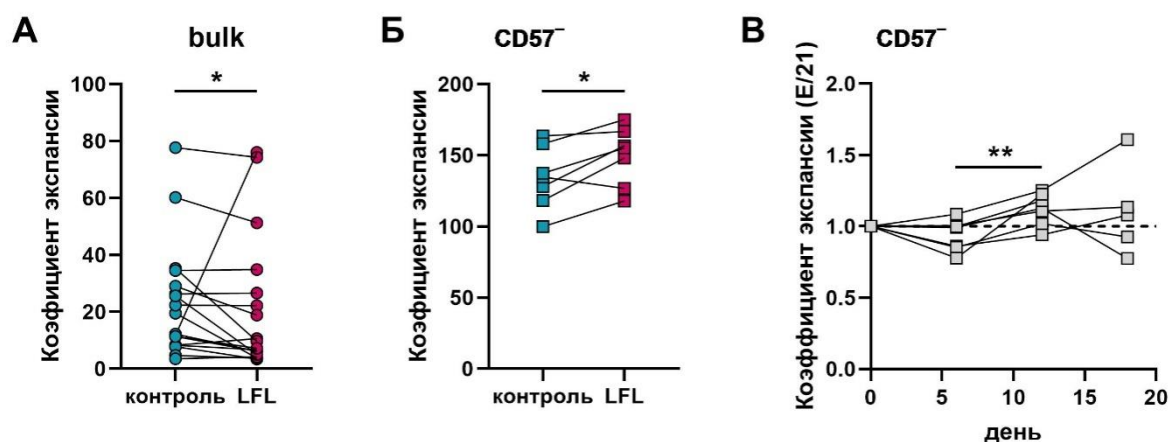


Рисунок 19. Пролиферативная активность bulk- и CD57-негативных культур NK-клеток при стимуляции IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-21E с пептидом LFL или без пептида. (А) Коэффициент экспансии bulk-культур NK-клеток в ответ на стимуляцию IL-2 + K562-21E с пептидом LFL или без него, время культивирования $t=14$ дней, число доноров $N = 18$; (Б) Коэффициент экспансии CD57-негативных культур NK-клеток в ответ на стимуляцию IL-2 + K562-21E с пептидом LFL или без него, время культивирования $t=12$ дней, число доноров $N = 7$; (В) Относительный коэффициент экспансии ($E/21$) CD57-негативных культур NK-клеток в ответ на стимуляцию IL-2 + K562-21E с пептидом LFL или без него, время культивирования $t=6, 12$ и 18 дней, число доноров $N = 7$. Статистическая обработка данных

выполнена посредством теста Вилкоксона для парных непараметрических данных (А,Б) и теста ANOVA(В).

3.3.3. Интенсивность пролиферации NK-клеток в ответ на LFL ассоциирована с экспрессией маркеров *ex vivo*

Ранее было показано, что инфекция HCMV влияет на экспрессию ряда поверхностных молекул. Мы предположили, что интенсивность пролиферативного ответа NK-клеток на стимуляцию *in vitro* в присутствии LFL может быть ассоциирована с уровнем экспрессии этих HCMV-модулируемых маркеров. Чтобы выявить взаимосвязь, мы оценили корреляции между фенотипом NK-клеток *ex vivo* коэффициентами экспансии LFL-культур, контрольных культур и относительным коэффициентом экспансии. Примечательно, что более выраженная экспансия LFL-культур bulk NK-клеток была ассоциирована не с экспрессией NKG2C, а с повышенным содержанием NKG2A⁺ NK-клеток *ex vivo* (Рисунок 20А,Б). Также мы оценивали относительный коэффициент экспансии, вычисляемый по формуле $K_{\text{отн}} = K(\text{LFL})/K(\text{контроль})$, где K(LFL) – коэффициент экспансии LFL-культур, K(контроль) – коэффициент экспансии контрольных культур. Была выявлена негативная корреляция между долей KIR2DL2/3⁺ (далее – KIR⁺) NK-клеток *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии в bulk-культурах (Рис. 20В).

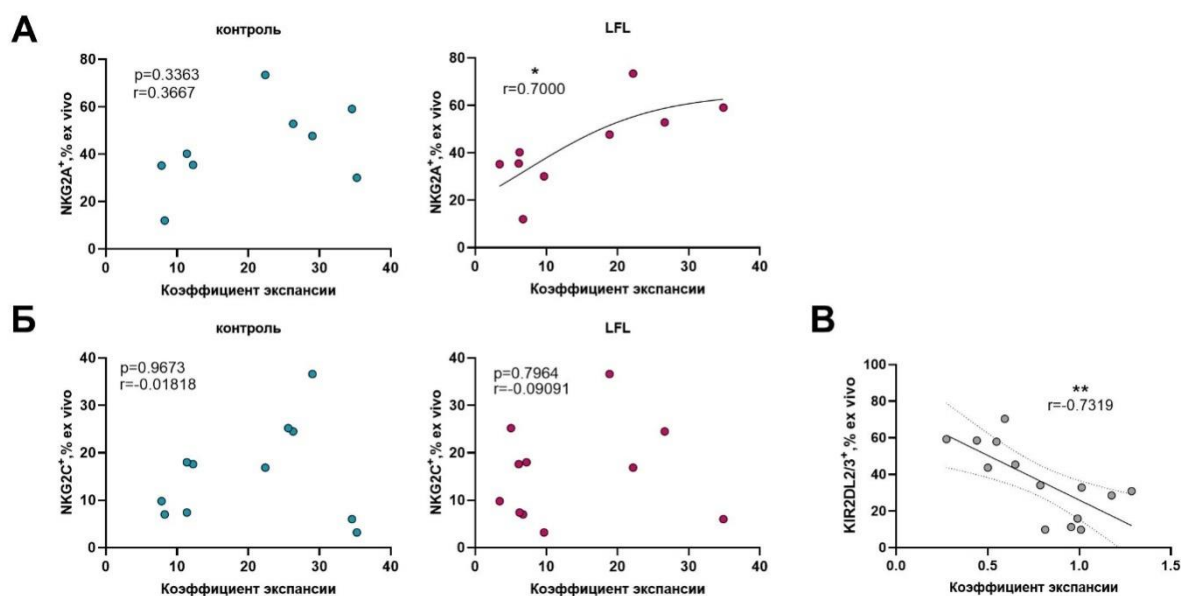


Рисунок 20. Корреляции между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативной активностью в культурах NK-клеток, активированных в присутствии пептида LFL и без него. (А) Корреляции между долей NKG2A⁺ NK-клеток *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных (слева) и LFL-культур (справа) bulk NK-клеток; (Б) Корреляции между долей NKG2C⁺ NK-клеток *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных (слева) и LFL-культур

(справа) bulk NK-клеток; (В) Корреляции между долей $KIR^+(KIR2DL2/3^+)$ NK-клеток *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии bulk NK-клеток. Корреляционный анализ проводился посредством корреляции Пирсона.

Также мы наблюдали повышенную пролиферативную активность как LFL-культур, так и контрольных культур, ассоциированную с высокой долей NK-клеток с фенотипом $HLA-DR^+$ и $CD56^{bright}HLA-DR^+$ *ex vivo* (Рис. 21А,Б). Примечательно, что в культурах $CD57^-$ также наблюдалась связь между повышенным относительным коэффициентом экспансии и высоким содержанием NK-клеток $CD56^{bright}HLA-DR^+$ в кровотоке (Рис. 21В).

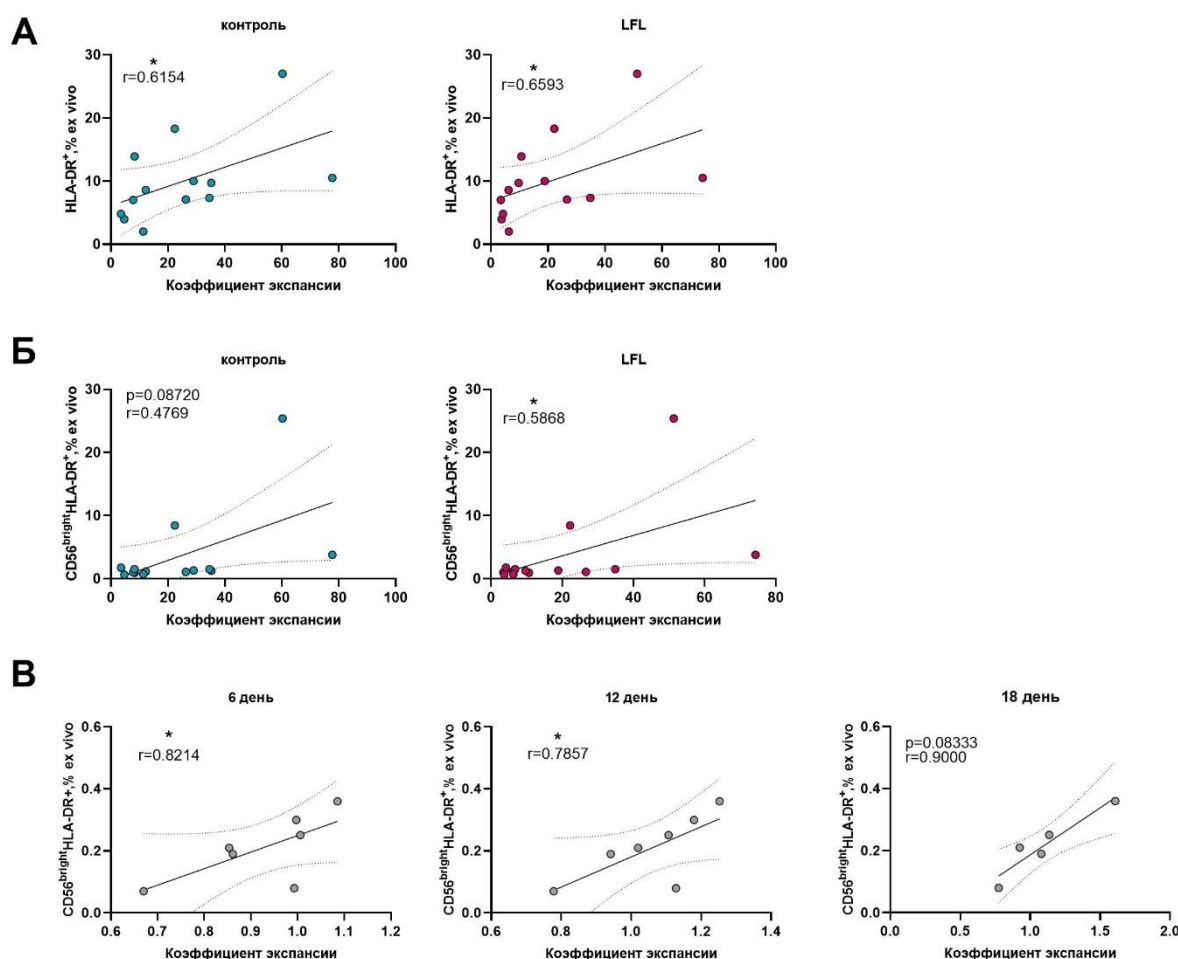


Рисунок 21. Корреляции между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативной активностью в культурах NK-клеток, активированных в присутствии пептида LFL и без него. (А) Корреляции между долей $HLA-DR^+$ NK-клеток *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных (слева) и LFL-культур (справа) bulk NK-клеток; (Б) Корреляции между долей $CD56^{bright}HLA-DR^+$ NK-клеток *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных (слева) и LFL-культур (справа) bulk NK-клеток; (В) Корреляции между долей $CD56^{bright}HLA-DR^+$ NK-

клеток *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии CD57-негативных культур НК-клеток на 6, 12 и 18 день культивирования. Корреляционный анализ проводился посредством корреляции Пирсона.

3.3.4. Презентация пептида LFL индуцирует накопление НК-клеток с адаптивным фенотипом в bulk-культурах

Стимуляция *in vitro* оказывает влияние на экспрессию ряда маркеров в культурах НК-клеток. Мы исследовали фенотип полученных культур и выявили в bulk LFL-культурах более высокое содержание клеток с адаптивным фенотипом по сравнению с контрольными культурами. В LFL-культурах наблюдалась более высокая доля клеток NKG2C⁺, CD57⁺NKG2C⁺ (Рис. 22А,Б), а также сниженное содержание NKG2A-позитивной фракции (Рис. 22В). Мы также оценили влияние презентации пептида LFL на экспрессию рецепторов KIR. LFL-культуры отличались повышенным содержанием как клеток, экспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR (Рис. 22Г), так и высокой долей KIR⁺NKG2C⁺, потенциальных высокотоксичных эффекторов (Рис. 22Д).

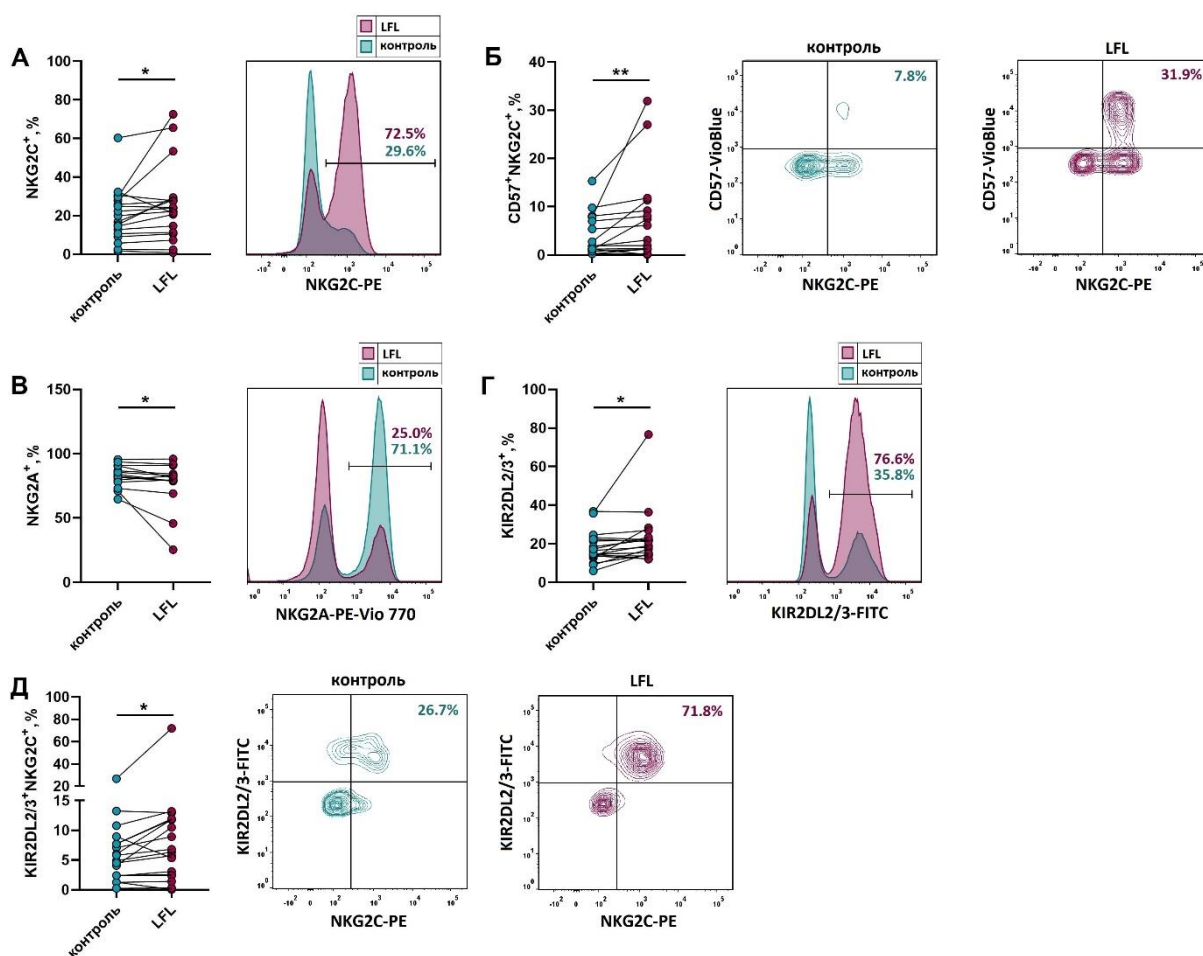


Рисунок 22. Фенотип НК-клеток в bulk-культурах, полученных при стимуляции *in vitro* с презентацией пептида LFL и без презентации пептида. (А) Доля NKG2C⁺ клеток в bulk LFL-

культурах и контрольных культурах; (Б) Доля $CD57^+NKG2C^+$ клеток в bulk LFL-культурах и контрольных культурах; (В) Доля $NKG2A^+$ клеток в bulk LFL-культурах и контрольных культурах; (Г) Доля $KIR2DL2/3^+$ клеток в bulk LFL-культурах и контрольных культурах; (Д) Доля $KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ клеток в bulk LFL-культурах и контрольных культурах. На рисунках справа представлены репрезентативные цитометрические данные. Время культивирования $t=14$ дней, число доноров $N = 18$. Статистическая обработка проводилась с помощью теста Вилкоксона для непараметрических парных данных.

Мы также вычислили относительное накопление KIR^+ и $NKG2C^+$ клеток в LFL-культурах по формуле: $\%_{отн} = \% \text{ в LFL-культуре} / \% \text{ в контрольной культуре}$. Более выраженное накопление KIR^+ НК-клеток при презентации LFL наблюдалось в культурах НК-клеток, полученных от доноров с высокой долей $CD57^+NKG2C^+$ и KIR^+NKG2C^+ НК-клеток в кровотоке (Рис. 23А,Б). Та же тенденция детектировалась при высокой доле $NKG2C^+$ НК-клеток *ex vivo* (Рис. 23В). LFL-ассоциированное накопление $NKG2C^+$ НК-клеток было связано с повышенным содержанием активированных $HLA-DR^+$ клеток *ex vivo* (Рис. 23Г).

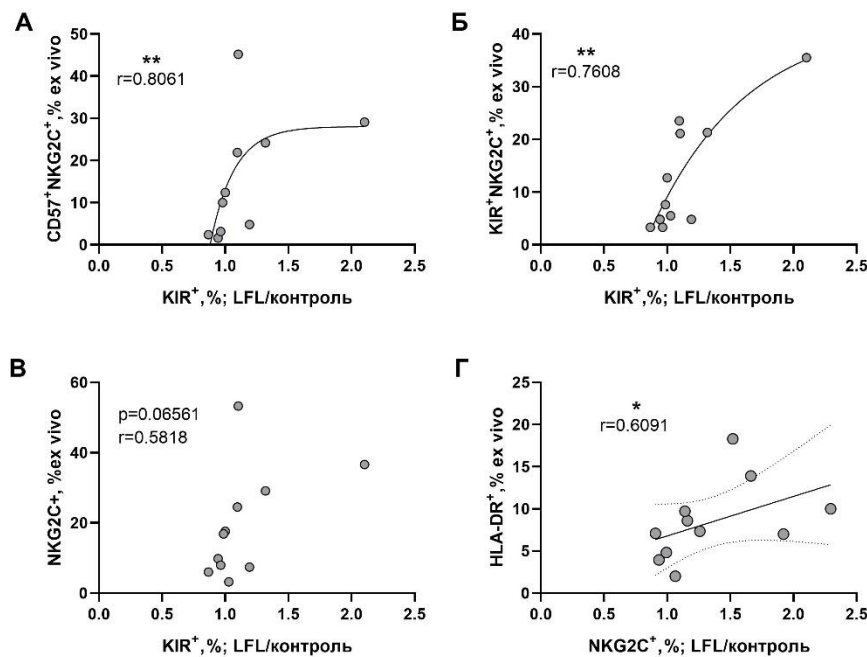


Рисунок 23. Корреляции между фенотипом НК-клеток *ex vivo* и эффективностью накопления $KIR2DL2/3^+$ и $NKG2C^+$ клеток в культурах при презентации пептида LFL. (А) Корреляция между долей $CD57^+NKG2C^+$ НК-клеток *ex vivo* и относительной долей $KIR2DL2/3^+$ НК-клеток при стимуляции в присутствии пептида LFL; (Б) Корреляция между долей $KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ НК-клеток *ex vivo* и относительной долей $KIR2DL2/3^+$ НК-клеток при стимуляции в присутствии пептида LFL; (В) Корреляция между долей $NKG2C^+$ НК-клеток *ex vivo*

in vivo и относительной долей KIR2DL2/3⁺ NK-клеток при стимуляции в присутствии пептида LFL; (Г) Корреляция между долей HLA-DR⁺ NK-клеток *ex vivo* и относительной долей KIR2DL2/3⁺ NK-клеток при стимуляции в присутствии пептида LFL. Корреляционный анализ проводился посредством корреляции Пирсона.

3.3.5. Bulk-культуры, которым был презентируем пептид, отличаются сниженной цитокин-индуцированной функциональной активностью

Презентация пептида LFL в bulk-культурах NK-клеток приводила к накоплению клеток с более зрелым фенотипом. Известно, что в ходе дифференцировки NK-клеток снижается экспрессия рецепторов к цитокинам, что обуславливает снижение чувствительности к растворимым стимулам. Как следствие, LFL-культуры могут обладать отличным от контрольных культур функциональным профилем. Поэтому мы оценили цитокин-зависимую активность полученных NK-клеток, а также их цитотоксический потенциал в отношении 3D-культур опухолевых линий, экспрессирующих HLA-E.

Для оценки цитокин-зависимой продукции IFN γ NK-клетки стимулировали комбинацией IL-12 и IL-18 в течение 16 часов, после чего измеряли внутриклеточное содержание IFN γ методом проточной цитометрии. Цитокин-зависимую дегрануляционную активность в ответ на инкубацию с опухолевыми клетками K562 оценивали по доле CD107a-позитивных NK-клеток в культурах после стимуляции IL-2. LFL-культуры отличались сниженной продукцией IFN γ (Рис. 24А) и меньшей долей CD107a⁺ клеток (Рис. 24Б).

Далее мы оценивали способность LFL-культур элиминировать сфероиды HLA-E-экспрессирующих культур. В качестве мишеней использовали сфероиды SKOV-3 и MCF7, культур, экспрессирующих HLA-E и обладающих генотипом HLA-C2/C2. Чувствительность сфероидов к воздействию NK-клеток определяли по доле нежизнеспособных клеток SKOV-3 или MCF7, в которые после коинкубации с эффекторами проникал краситель SytoxBlue. При коинкубации с LFL-культурами в сфероидах SKOV-3 и MCF7 наблюдались большие доли SytoxBlue⁺ клеток, чем при коинкубации с контрольными культурами (Рис. 24В).

Таким образом, культуры, которые получают при активации NK-клеток *in vitro* в присутствии фидерных клеток, презентирующих комплекс HLA-E+пептид, отличаются от контрольных культур сниженной цитокин-зависимой функциональной активностью, но вместе с тем способны с большей эффективностью элиминировать HLA-E-экспрессирующие мишени.

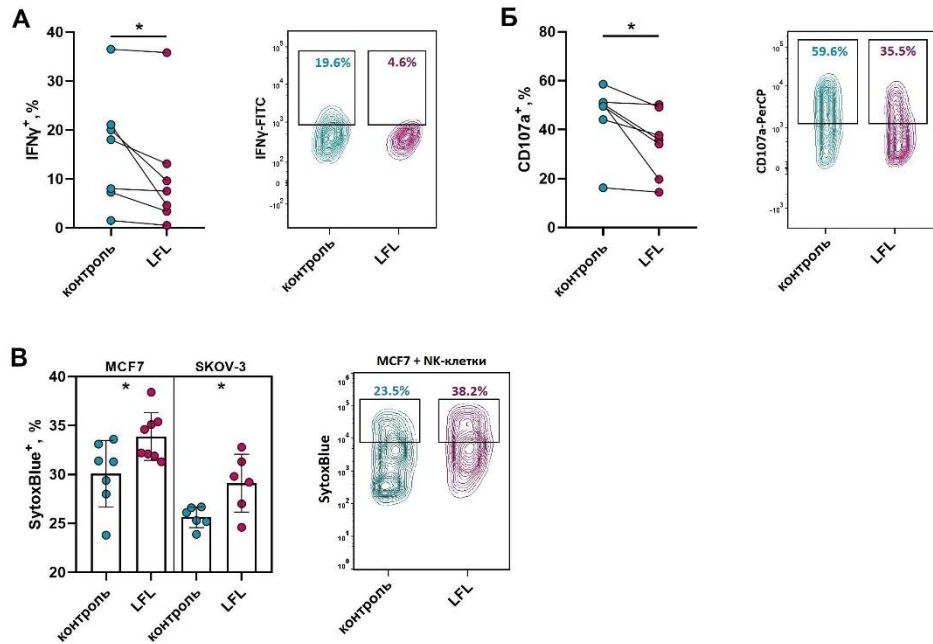


Рисунок 24. Функциональная активность bulk-культур НК-клеток, полученных при стимуляции в присутствии пептида LFL и без него. (А) Доля IFN γ -продуцирующих НК-клеток в bulk-культурах после стимуляции IL-12 и IL-18; (Б) Доля дегранулирующих CD107a⁺ НК-клеток в bulk-культурах в ответ на инкубацию с мишенями K562; (В) Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероиде SKOV-3 и MCF7 после коинкубации с bulk-культурами НК-клеток. На рисунках справа представлены репрезентативные цитометрические данные. Статистический анализ проводился посредством парного непараметрического теста Вилкоксона (А,Б) и непараметрического теста Манна-Уитни (В).

3.4. Накопление клеток KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ при презентации пептида LFL ассоциировано с фенотипом *ex vivo*

Однократная презентация пептида LFL НК-клеткам *in vitro* не приводит к повышению пролиферативной активности в bulk-культурах, однако способствует накоплению клеток с адаптивным фенотипом, а том числе KIR⁺NKG2C⁺ НК-клеток. Обогащение этой фракции в ходе стимуляции LFL, по всей видимости, приводит к более выраженному цитотоксическому воздействию LFL-культур на HLA-E-экспрессирующие мишени. Накопление клеток KIR⁺NKG2C⁺ может идти двумя путями: посредством пролиферации клеток популяции KIR⁺NKG2C⁺ или при появлении экспрессии NKG2C и KIR *de novo* в популяциях, изначально негативных по этим маркерам. Чтобы прояснить, какой из механизмов задействован при стимуляции LFL-презентирующими фидерными клетками, мы посредством клеточного сортировщика получили культуры НК-клеток шести субпопуляций с различной экспрессией

KIR и NKG2C, а также различной экспрессией CD57, маркера высокой степени дифференцировки: CD57⁻KIR⁻NKG2C⁻, CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺, CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻, CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺, CD57⁺KIR⁺NKG2C⁻, CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺. Субпопуляции CD57⁺KIR⁻ с различной экспрессией NKG2C не были исследованы в этих экспериментах, поскольку были слишком малы для получения необходимого числа образцов. Клетки субпопуляций были отсортированы в лунки 96-луночного планшета по 100 клеток в каждую лунку (далее – 100-клеточные культуры), к ним были добавлены фидерные клетки K562-21E в концентрации 10⁴ клеток/мл, предварительно фидерные клетки инкубировались в бессывороточной среде с пептидом LFL или без пептида. Культуры были получены в общей сложности от 17 доноров, из них 11 HCMV-серопозитивных и 6 HCMV-серонегативных. На 14 день после начала культивирования оценивался пролиферативный потенциал клеток в культурах по коэффициенту экспансии, а также стабильность фенотипа культур, их цитокин-зависимая функциональная активность и цитотоксичность в отношении HLA-E-экспрессирующих мишеней. Помимо этого, была оценена взаимосвязь между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативной активностью, фенотипической изменчивостью и функциональными характеристиками клеток в полученных культурах.

3.4.1. Клетки CD57⁻KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ обладают наибольшей пролиферативной активностью среди NKG2C⁺ популяций, однако различия нивелируются при презентации пептида LFL

В первую очередь мы оценили влияние экспрессии NKG2C на пролиферативный потенциал культур разной степени дифференцировки при презентации пептида (LFL-культуры) и без него (контрольные культуры). Во фракции наименее дифференцированных NK-клеток CD57⁻KIR⁻ NKG2C-позитивные клетки при стимуляции LFL отличались меньшей пролиферативной активностью по сравнению с NKG2C-негативными клетками. Та же тенденция наблюдалась и в соответствующих контрольных культурах, полученных без презентации пептида LFL (Рис. 25А). Во фракции более дифференцированных NK-клеток, экспрессирующих маркер лицензирования KIR, CD57⁻KIR⁺, наблюдалась обратная тенденция вне зависимости от типа стимуляции: NKG2C⁺ NK-клетки пролиферировали более интенсивно в ответ на активацию *in vitro* (Рис. 25Б). В контрольных культурах наиболее дифференцированной фракции CD57⁺KIR⁺ интенсивность пролиферации не зависела от экспрессии NKG2C. Однако при стимуляции с пептидом LFL культуры CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ обладали более выраженной экспансией по сравнению с клетками CD57⁺KIR⁺NKG2C⁻ (Рис. 25В). Это может быть следствием дополнительной стимуляции CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ NK-клеток по оси HLA-E-NKG2C.

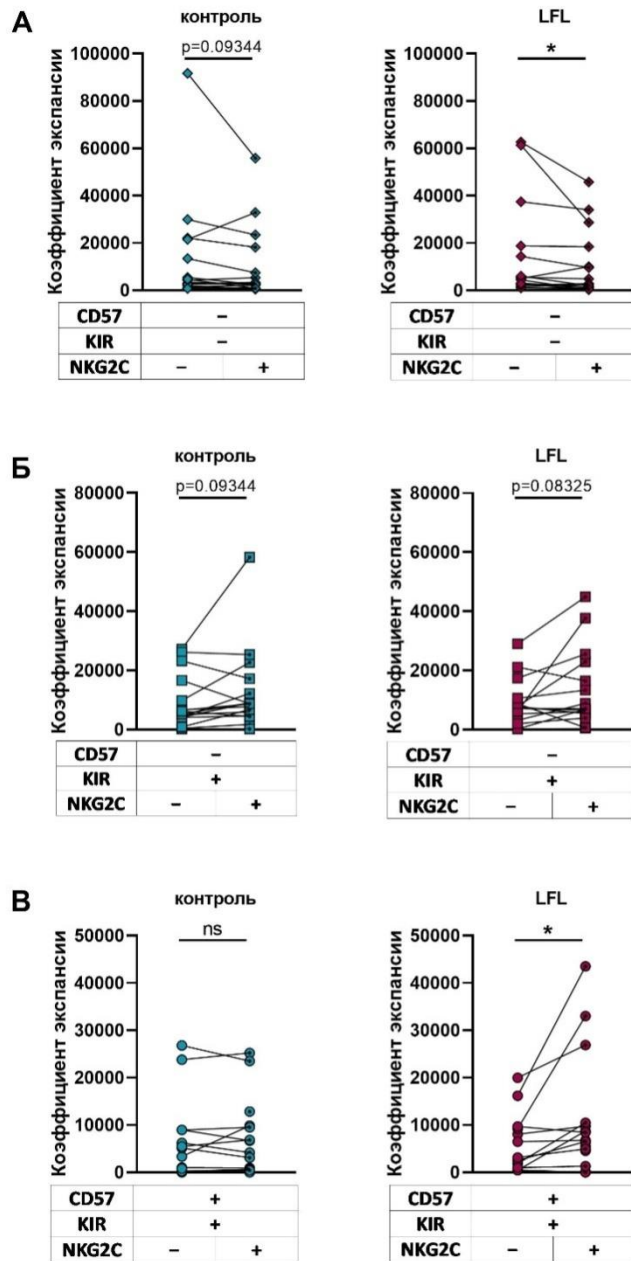


Рисунок 25. Пролиферативная активность субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C, стимулированных *in vitro* в присутствии пептида LFL или без него. (А) Коэффициент экспансии культур НК-клеток CD57⁻KIR⁻ с различной экспрессией NKG2C, полученных при стимуляции без пептида LFL (лево) и в присутствии пептида LFL (право); (Б) Коэффициент экспансии культур НК-клеток CD57⁻KIR⁺ с различной экспрессией NKG2C, полученных при стимуляции без пептида LFL (лево) и в присутствии пептида LFL (право); (В) Коэффициент экспансии культур НК-клеток CD57⁺KIR⁺ с различной экспрессией NKG2C, полученных при стимуляции без пептида LFL (лево) и в присутствии пептида LFL (право). Время культивирования $t = 12$ дней, число доноров $N = 17$ (HCMV⁺ 11, HCMV⁻ 6).

Статистическая обработка данных проводилась посредством парного непараметрического теста Вилкоксона.

Мы также провели сравнение пролиферативной активности NKG2C^+ НК-клеток разной степени дифференцировки. При культивировании НК-клеток субпопуляций без презентации пептида наибольший коэффициент экспансии наблюдался в культурах субпопуляции $\text{CD57}^- \text{KIR}^+ \text{NKG2C}^+$. Что примечательно, при стимуляции фидерными клетками, презентирующими пептид LFL, не наблюдалось подобных различий между NKG2C^+ культурами (Рис. 26).

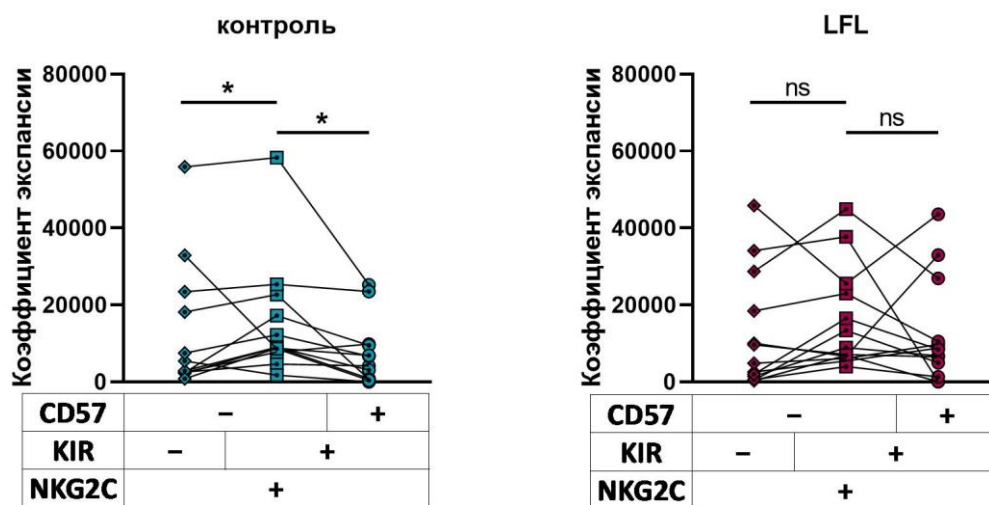


Рисунок 26. Пролиферативная активность субпопуляций NKG2C^+ НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR (KIR2DL2/3), стимулированных *in vitro* в присутствии пептида LFL (право) или без него (лево). Время культивирования $t = 12$ дней, число доноров $N = 17$ (HCMV^+ 11, HCMV^- 6). Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Фридмана.

3.4.2. Адаптивноподобные клетки $\text{CD57}^+ \text{KIR2DL2/3}^+ \text{NKG2C}^+$ отвечают на презентацию пептида LFL более выраженной экспансией

Особый интерес в контексте накопления HLA-E-направленных эффекторов представляет LFL-индуцированная пролиферация потенциальных NKG2C^+ эффекторов *in vitro*. Мы провели сравнение пролиферативной активности LFL-культур и контрольных культур субпопуляций NKG2C^+ НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR . Более интенсивное накопление клеток при презентации пептида LFL наблюдалось только в культурах наиболее дифференцированных НК-клеток с адаптивным фенотипом $\text{CD57}^+ \text{KIR}^+ \text{NKG2C}^+$ (Рис. 27А). Мы также оценили влияние презентации LFL на пролиферативную активность NKG2C^+

негативных культур НК-клеток и не выявили различий между LFL-культурами и контрольными культурами (Рис. 27Б).

Известно, что по мере созревания НК-клеток снижается их чувствительность к растворимым стимулам *in vitro*. Вследствие чего клетки $CD57^+KIR^+NKG2C^+$ уступают в интенсивности экспансии менее дифференцированным клеткам $CD57^-KIR^+NKG2C^+$ (Рис. 25). Однако, по всей вероятности, презентация пептида LFL в составе HLA-E на поверхности фидерных клеток индуцирует пролиферацию адаптивноподобных НК-клеток $CD57^+KIR^+NKG2C^+$, что подтверждает перспективность такого метода накопления клеток в терапевтических целях.

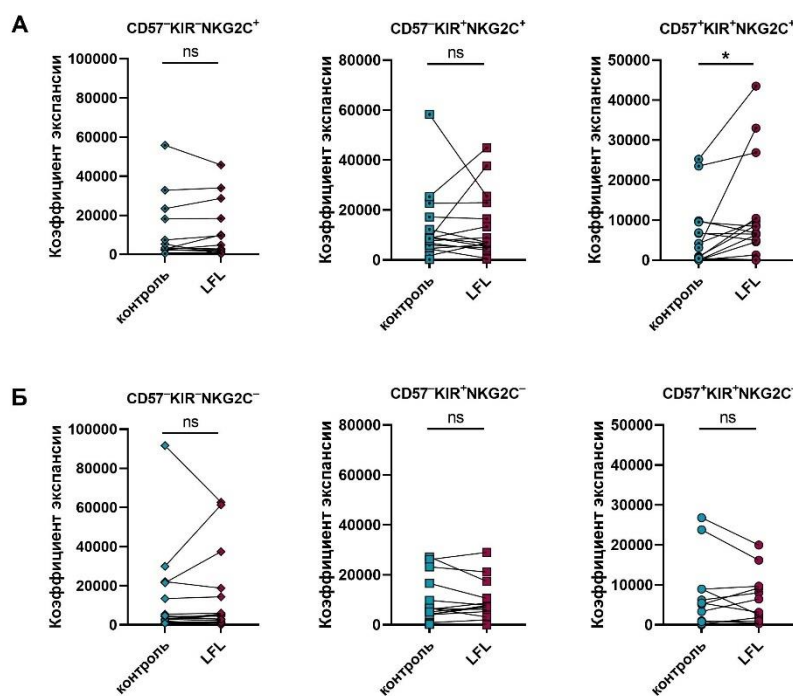


Рисунок 27. Пролиферативная активность субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C, стимулированных *in vitro* в присутствии пептида LFL или без него. (А) Коэффициент экспансии культур NKG2C-позитивных НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR, полученных при стимуляции без пептида LFL и в присутствии пептида LFL; (Б) Коэффициент экспансии культур NKG2C-негативных НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR, полученных при стимуляции без пептида LFL и в присутствии пептида LFL. Время культивирования $t = 12$ дней, число доноров $N = 17$ (HCMV⁺ 11, HCMV⁻ 6). Статистическая обработка данных проводилась посредством парного непараметрического теста Вилкоксона.

3.4.3. Пролиферативная активность $KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ NK-клеток при презентации пептида LFL ассоциирована с экспрессией $KIR2DL2/3$, $NKG2C$ и $NKG2A$ *ex vivo*

Ранее мы показали, что пролиферативная активность bulk-культур NK-клеток и изменчивость их фенотипа ассоциированы с фенотипом NK-клеток *ex vivo*. Выбор доноров с наилучшими пролиферативными характеристиками NK-клеток особенно важен в контексте противораковой терапии. Поэтому мы выявили корреляции между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативной активностью в культурах субпопуляций NK-клеток с различной экспрессией $CD57$, KIR и $NKG2C$, полученных при активации в присутствии пептида LFL или без него.

Большой относительный коэффициент экспансии в культурах менее дифференцированных $NKG2C^+$ NK-клеток из фракции $CD57^-KIR^+$ был ассоциирован с высокой долей $NKG2C^+$ клеток *ex vivo* (Рис. 28А), а также с высоким содержанием клеток с адаптивным фенотипом $CD57^+NKG2C^+$ *ex vivo* (Рис. 28Б). Кроме того, мы наблюдали корреляцию между высоким содержанием $KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ NK-клеток *ex vivo* и высоким коэффициентом экспансии клеток $CD57^-KIR^+NKG2C^+$ в LFL-культурах, но не в контрольных культурах (Рис. 28В).

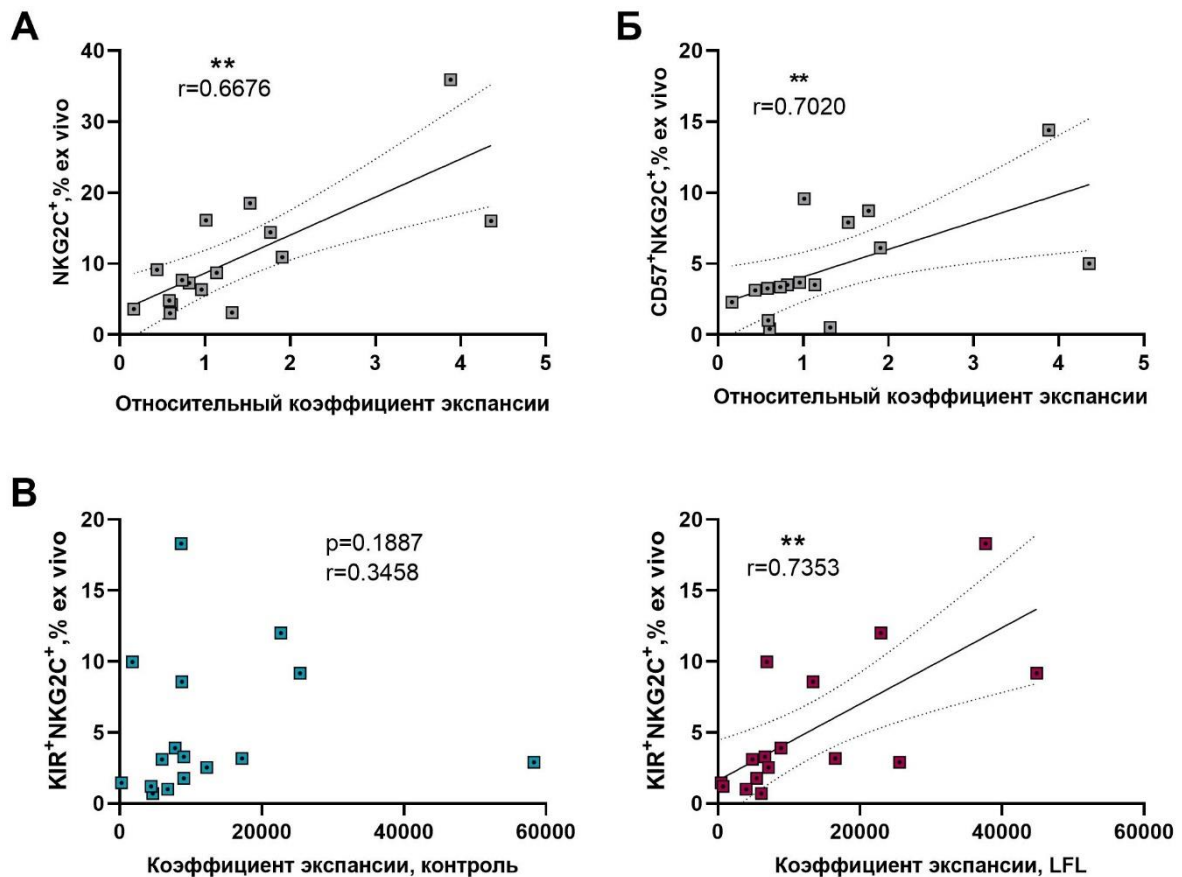


Рисунок 28. Связь между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативным потенциалом NK-клеток субпопуляции $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^+$, которым был и не был презентируем пептид LFL. (А) Корреляция между долей клеток $NKG2C^+$ *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ NK-клеток; (Б) Корреляция между долей клеток $CD57^+NKG2C^+$ *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ NK-клеток; (В) Корреляция между долей клеток $KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных культур (слева) и LFL-культур (справа) $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^+$ NK-клеток. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена, значения $p\text{-value} < 0.05$ принимались статистически значимыми (** $p < 0.01$).

Примечательно, что в $NKG2C$ -негативных культурах из той же фракции $CD57^-KIR^+$, напротив, наблюдался сниженный относительный коэффициент экспансии при высокой доле $NKG2C^+$ и $CD57^+NKG2C^+$ NK-клеток *ex vivo* (Рис. 29).

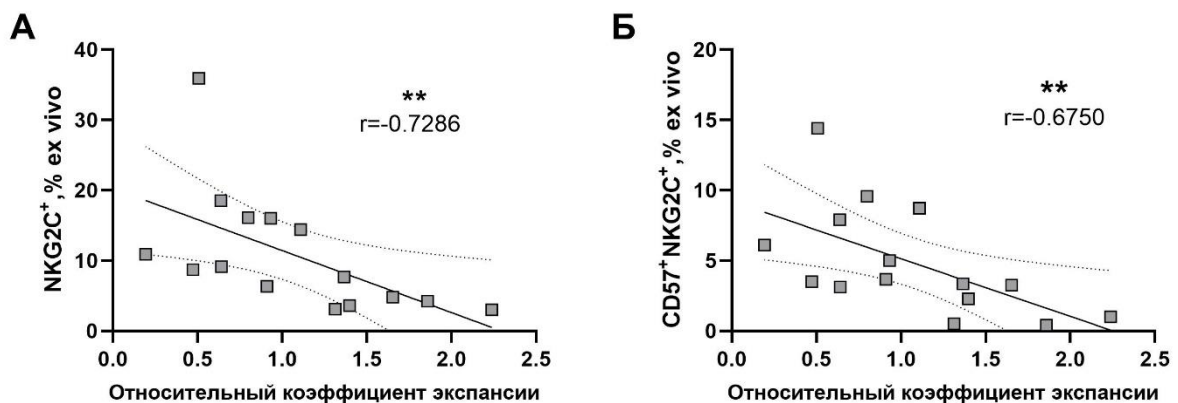


Рисунок 29. Связь между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативным потенциалом NK-клеток субпопуляции $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^-$, которым был и не был презентируем пептид LFL. (А) Корреляция между долей клеток $NKG2C^+$ *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^-$ NK-клеток; (Б) Корреляция между долей клеток $CD57^+NKG2C^+$ *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии $CD57^-KIR2DL2/3^+NKG2C^-$ NK-клеток. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена, значения $p\text{-value} < 0.05$ принимались статистически значимыми.

Мы также оценили связь между фенотипом *ex vivo* и пролиферативной активностью в культурах NK-клеток с адаптивноподобным $CD57^+KIR^+NKG2C^+$. Мы не выявили связи между коэффициентами экспансии этих культур и долей $NKG2C^+$ и адаптивных клеток

CD57⁺NKG2C⁺, однако наибольший относительный коэффициент экспансии клеток популяции CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ был ассоциирован с высоким содержанием NKG2A⁺ NK-клеток *ex vivo* (Рис. 30А). Также с высокой долей клеток KIR2DL2/3⁺ *ex vivo* была ассоциирована более выраженная экспансия LFL-культур CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ NK-клеток. В контрольных культурах схожей связи не наблюдалось (Рис. 3Б).

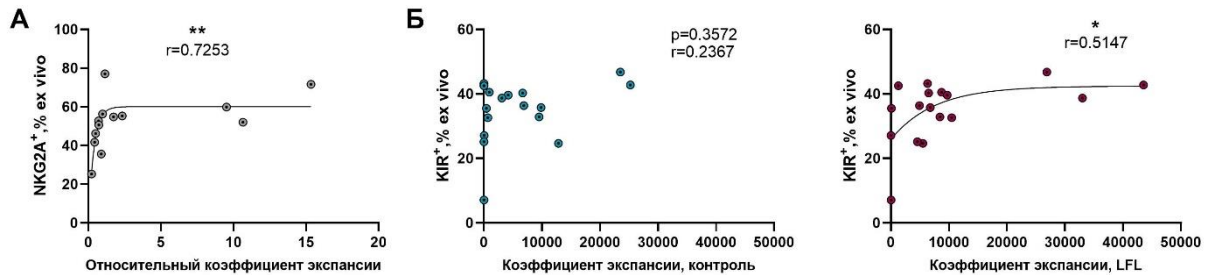


Рисунок 30. Связь между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и пролиферативным потенциалом NK-клеток субпопуляции CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺, которым был и не был презентируван пептид LFL. (А) Корреляция между долей клеток NKG2A⁺ *ex vivo* и относительным коэффициентом экспансии CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ NK-клеток; (Б) Корреляция между долей клеток KIR2DL2/3⁺ *ex vivo* и коэффициентом экспансии контрольных культур (слева) и LFL-культур (справа) CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ NK-клеток. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена, значения $p\text{-value} < 0.05$ принимались статистически значимыми.

3.4.4. Высокая экспрессия NKG2C *de novo* и высокая стабильность экспрессии NKG2C наблюдается в KIR2DL2/3-позитивных субпопуляциях NK-клеток

Накопление NK-клеток с фенотипом KIR⁺NKG2C⁺ может также осуществляться при появлении экспрессии рецепторов KIR и/или NKG2C *de novo*. В первую очередь мы оценили появление экспрессии NKG2C в культурах популяциях NK-клеток с различной экспрессией KIR и CD57, полученных при презентации пептида LFL или без него. В LFL-культурах субпопуляций KIR⁺ по сравнению с KIR-негативными культурами наблюдались большие доли клеток, экспрессирующих NKG2C *de novo*. Та же тенденция детектировалась в контрольных культурах (Рис. 31А). Экспрессия NKG2C в NKG2C-позитивных культурах также была более стабильна при коэкспрессии NKG2C с рецептором KIR как в LFL-культурах, так и в контрольных культурах (Рис. 31Б).

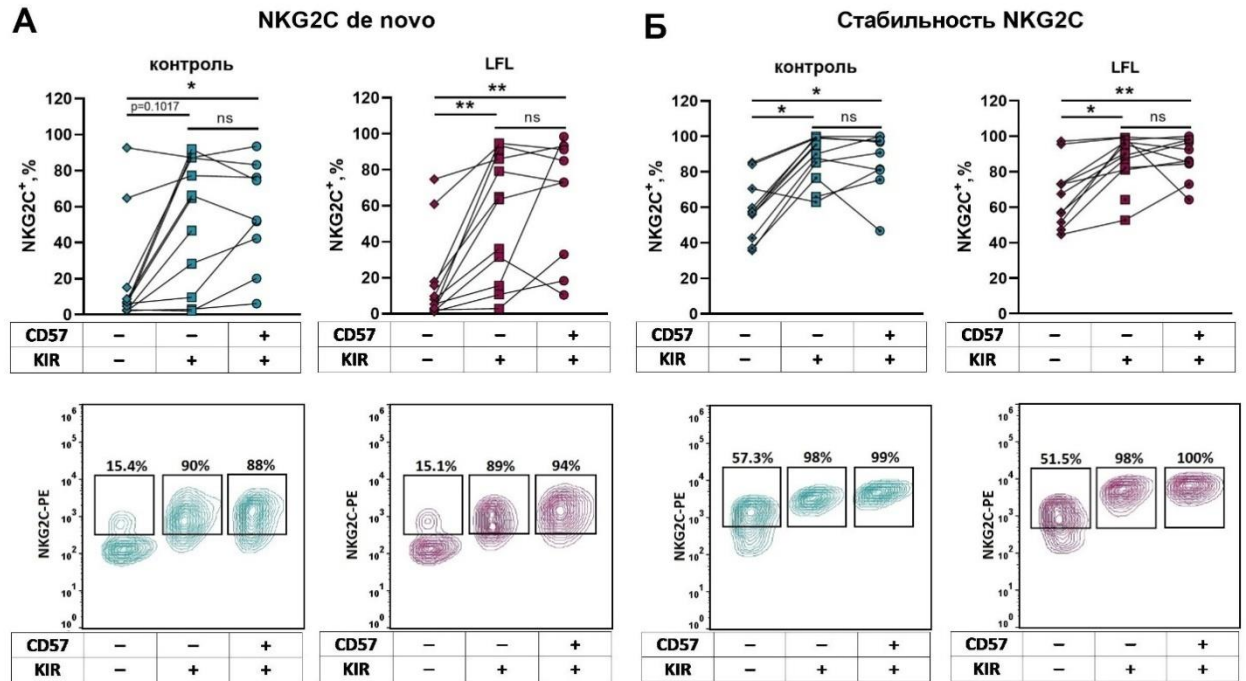


Рисунок 31. Экспрессия NKG2C *de novo* и стабильность экспрессии NKG2C в культурах НК-клеток с различной экспрессией KIR (KIR2DL2/3) и CD57, полученных при презентации пептида LFL или без нее. (А) Экспрессия NKG2C *de novo* в NKG2C-негативных культурах НК-клеток с различной экспрессией KIR и CD57, полученных без презентации LFL (слева) и с презентацией LFL (справа); (Б) Стабильность экспрессии NKG2C в NKG2C-позитивных культурах НК-клеток с различной экспрессией KIR и CD57, полученных без презентации LFL (слева) и с презентацией LFL (справа). В нижней части рисунка представлены репрезентативные цитометрические данные. Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического теста Фридмана.

3.4.5. LFL-ассоциированная повышенная стабильность экспрессии NKG2C наблюдается в популяции низкодифференцированных клеток CD57⁻KIR2DL2/3⁻NKG2C⁺

Далее мы оценили влияние презентации пептида LFL на экспрессию NKG2C в культурах субпопуляций с различной экспрессией CD57 и KIR. В LFL-культурах NKG2C⁺ НК-клеток из фракции CD57⁻KIR⁻, по сравнению с контрольными культурами, наблюдалась более высокая стабильность экспрессии NKG2C (Рис. 32А). В культурах остальных субпопуляций презентация пептида LFL не оказывала влияния ни на стабильность экспрессии NKG2C (Рис. 30Б), ни на появление экспрессии NKG2C *de novo* (Рис. 32В).

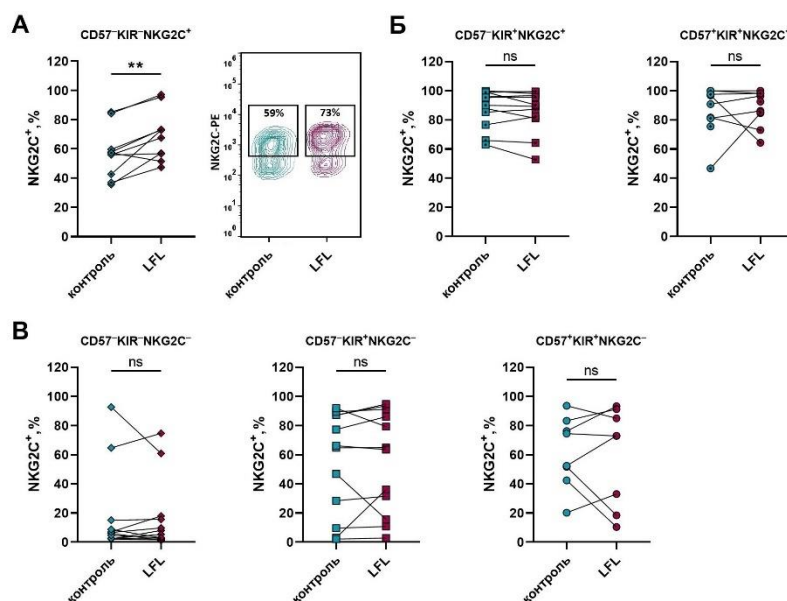


Рисунок 32. Экспрессия NKG2C в культурах НК-клеток с различной экспрессией KIR (KIR2D2/3) и CD57, полученных при презентации пептида LFL и без презентации пептида. (А) Доля NKG2C⁺ НК-клеток в культурах субпопуляции CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺, полученных без презентации LFL и с презентацией LFL, справа представлены репрезентативные цитометрические данные; (Б) Доля NKG2C⁺ НК-клеток в культурах KIR⁺NKG2C⁺ субпопуляций с различной экспрессией CD57, полученных без презентации LFL и с презентацией LFL; (В) Доля NKG2C⁺ НК-клеток в культурах NKG2C-негативных субпопуляций с различной экспрессией CD57 и KIR, полученных без презентации LFL и с презентацией LFL. Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического теста Вилкоксона.

3.4.6. Презентация LFL приводит к повышенной экспрессии KIR2DL2/3 *de novo* в популяции CD57⁻NKG2C⁺ НК-клеток

Ранее мы показали, что в ходе пролиферации наблюдается снижение экспрессии рецепторов KIR. Повышенная стабильность экспрессии KIR, как и высокая доля клеток, экспрессирующих KIR *de novo*, могут вносить вклад в обогащение популяции KIR⁺NKG2C⁺ при накоплении НК-клеток *ex vivo* в ответ на стимуляцию LFL-презентирующими фидерными клетками.

В первую очередь мы оценили стабильность экспрессии KIR в культурах субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2C и не выявили различий по доле KIR⁺ клеток как в LFL-культурах, так и в контрольных культурах (Рис. 33А). Далее мы исследовали влияние презентации LFL на экспрессию KIR как в KIR-негативных, так и в KIR-позитивных культурах. В LFL-культурах популяции CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ наблюдалось более высокое

содержание клеток, экспрессирующих KIR *de novo*, по сравнению с контрольными культурами (Рис. 33Б). При этом в остальных популяциях способ стимуляции не влиял на экспрессию KIR (Рис. 33Б,В).

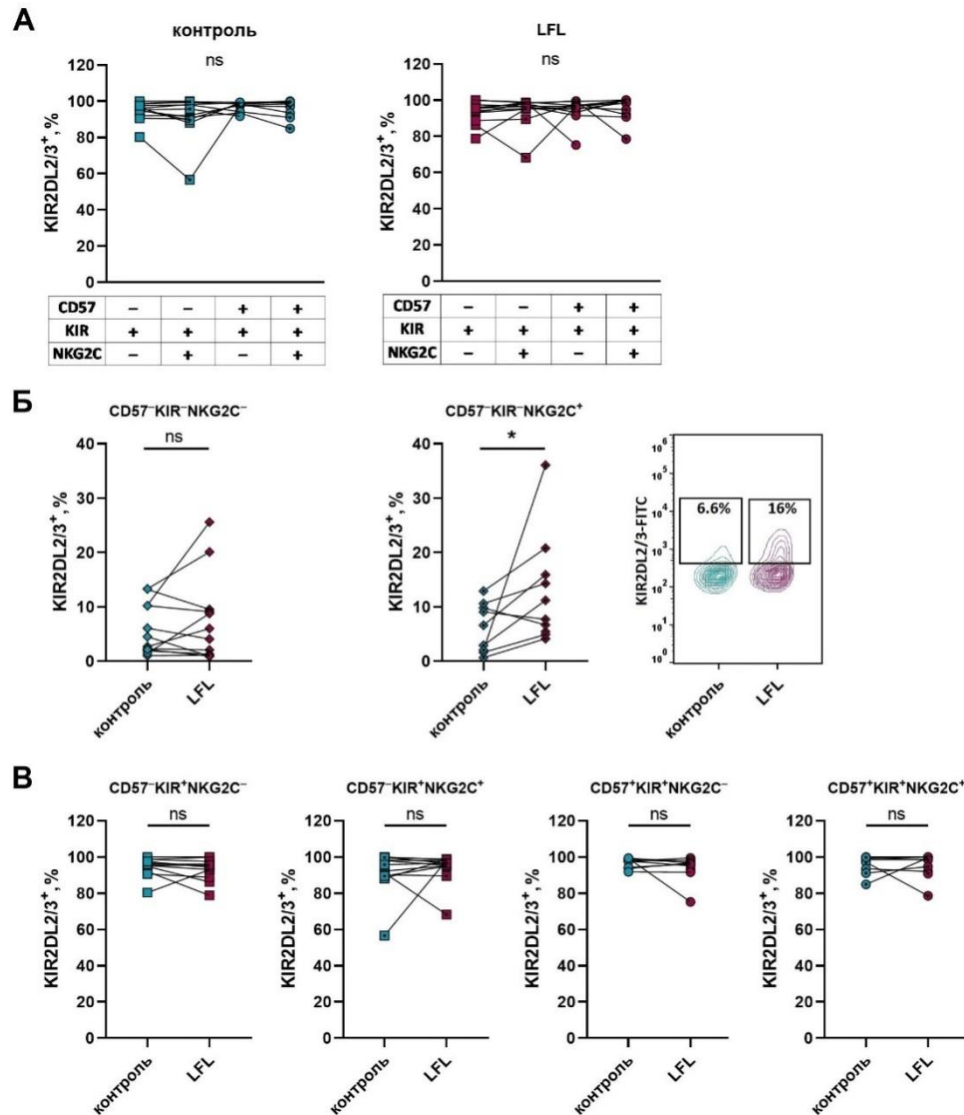


Рисунок 33. Экспрессия KIR (KIR2DL2/3) в культурах НК-клеток с различной экспрессией KIR и CD57, полученных при презентации пептида LFL и без презентации пептида. (А) Доля KIR⁺ НК-клеток в культурах KIR-позитивных субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2C, полученных без презентации LFL (слева) и с презентацией LFL (справа); (Б) Доля KIR⁺ НК-клеток в культурах CD57⁻KIR⁻ субпопуляций с различной экспрессией NKG2C, полученных без презентации LFL и с презентацией LFL, справа представлены репрезентативные цитометрические данные; (В) Доля KIR⁺ НК-клеток в культурах KIR-позитивных субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2C, полученных без презентации LFL (слева) и с презентацией LFL (справа).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического теста Фридмана (А) либо теста Вилкоксона (Б,В) (* $p < 0.05$).

3.4.7. Экспрессия NKG2C *de novo* и стабильность экспрессии KIR2DL2/3 в популяции CD57⁻KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻ ассоциированы с высокой долей клеток HLA-DR⁺ *ex vivo*

Из описанных выше результатов следует, что популяции CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻ и CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ могут являться потенциальными предшественниками NK-клеток CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺. В bulk-культурах LFL-ассоциированное накопление клеток KIR⁺ и NKG2C⁺ было связано с определенным фенотипом NK-клеток *ex vivo*. Поэтому мы посредством корреляционного анализа выявили ряд ассоциаций между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и долями KIR⁺ и NKG2C⁺ клеток в популяциях-предшественниках. Высокая стабильность экспрессии KIR в LFL-культурах популяции CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻ была ассоциирована с повышенным содержанием HLA-DR⁺ *ex vivo*. Та же тенденция наблюдалась и в контрольных культурах (Рис. 34А). Также с высокой долей HLA-DR⁺ *ex vivo* была связана повышенная доля клеток, экспрессирующих NKG2C *de novo*, в контрольных культурах CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻, со слабой тенденцией в LFL-культурах (Рис. 34Б). В популяции CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ наблюдалась ассоциация между содержанием клеток KIR⁺NKG2C⁺ *ex vivo* и долей клеток с фенотипом KIR⁺ *de novo* в стимулированных LFL-культурах. В контрольных культурах подобной связи не наблюдалось (Рис. 34В).

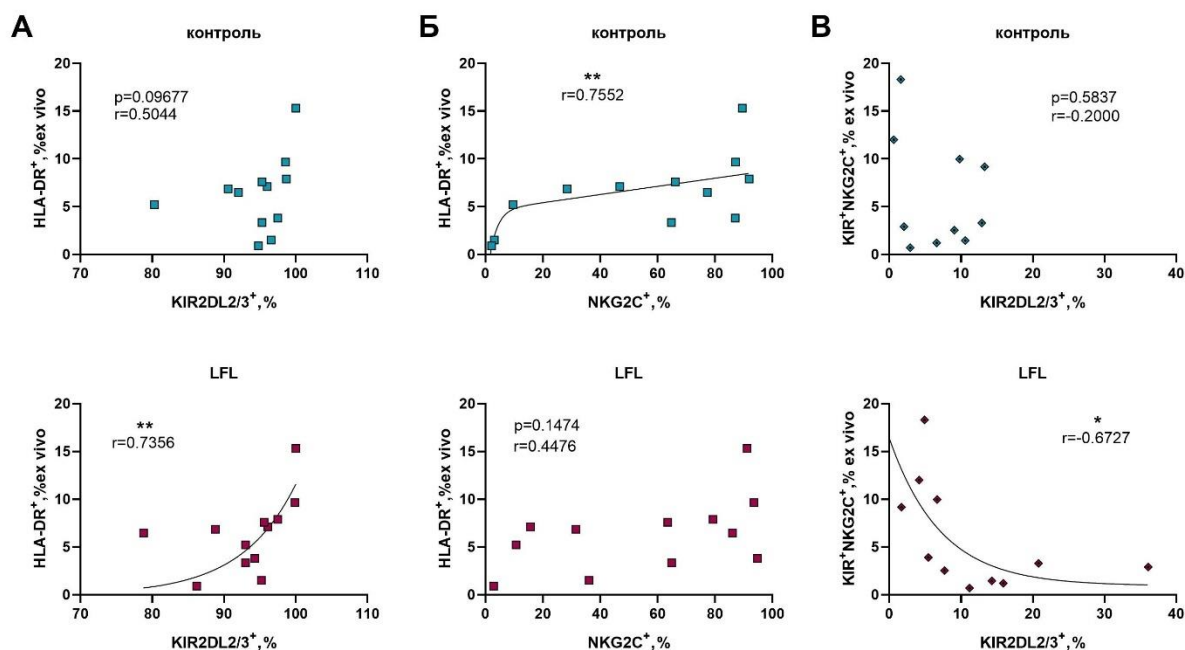


Рисунок 34. Ассоциация между фенотипом NK-клеток *ex vivo* и экспрессией KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C в культурах NK-клеток CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻ и CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺. (А) Корреляция между долей NK-клеток HLA-DR⁺ *ex vivo* и стабильностью экспрессии KIR в культурах

популяции $CD57^{-}KIR^{+}NKG2C^{-}$, полученных при стимуляции пептидом LFL и без него; (Б) Корреляция между долей NK-клеток $HLA-DR^{+}$ *ex vivo* и экспрессией $NKG2C$ *de novo* в культурах популяции $CD57^{-}KIR^{+}NKG2C^{-}$, полученных при стимуляции пептидом LFL и без него; (В) Корреляция между долей NK-клеток $KIR^{+}NKG2C^{+}$ *ex vivo* и экспрессией KIR *de novo* в культурах популяции $CD57^{-}KIR^{-}NKG2C^{+}$, полученных при стимуляции пептидом LFL и без него. Корреляционный анализ проводился посредством корреляционного теста Спирмена.

3.4.8. Культуры $CD57^{-}KIR2DL2/3^{+}$ NK-клеток, полученные при презентации пептида LFL, отличаются повышенной продукцией $IFN\gamma$

Ранее мы показали, что презентация пептида LFL bulk-культурам приводит к снижению цитокин-индуцируемой функциональной активности: как дегрануляции, так и продукции $IFN\gamma$. Мы оценили цитокин-зависимую функциональную активность LFL-культур и контрольных культур субпопуляций NK-клеток с различной экспрессией $CD57$, KIR и $NKG2C$, чтобы выявить влияние презентации пептида LFL на чувствительность к цитокиновой стимуляции. Тесты проводились через три недели после начала культивирования, стимуляции цитокинами предшествовал период покоя в течение 16-18 часов.

В ответ на стимуляцию $IL-12$ и $IL-18$ в LFL-культурах $CD57^{-}KIR^{+}$, по сравнению с контрольными культурами, наблюдалась повышенная продукция $IFN\gamma$ в $NKG2C$ -негативной фракции, та же тенденция наблюдалась в $NKG2C$ -позитивной фракции (Рис. 35А). Примечательно, что в остальных субпопуляциях презентация пептида LFL не влияла на продукцию $IFN\gamma$, как в $NKG2C$ -позитивных (Рис. 35Б), так и в $NKG2C$ -негативных фракциях (Рис. 35В). Таким образом, не удалось выявить субпопуляцию, за счет которой происходит снижение продукции $IFN\gamma$ в bulk-культурах. По всей видимости, при культивировании клеток всех субпопуляций вместе в сниженную продукцию $IFN\gamma$ вносит не только презентация LFL, но и взаимодействие NK-клеток различных субпопуляций друг с другом.

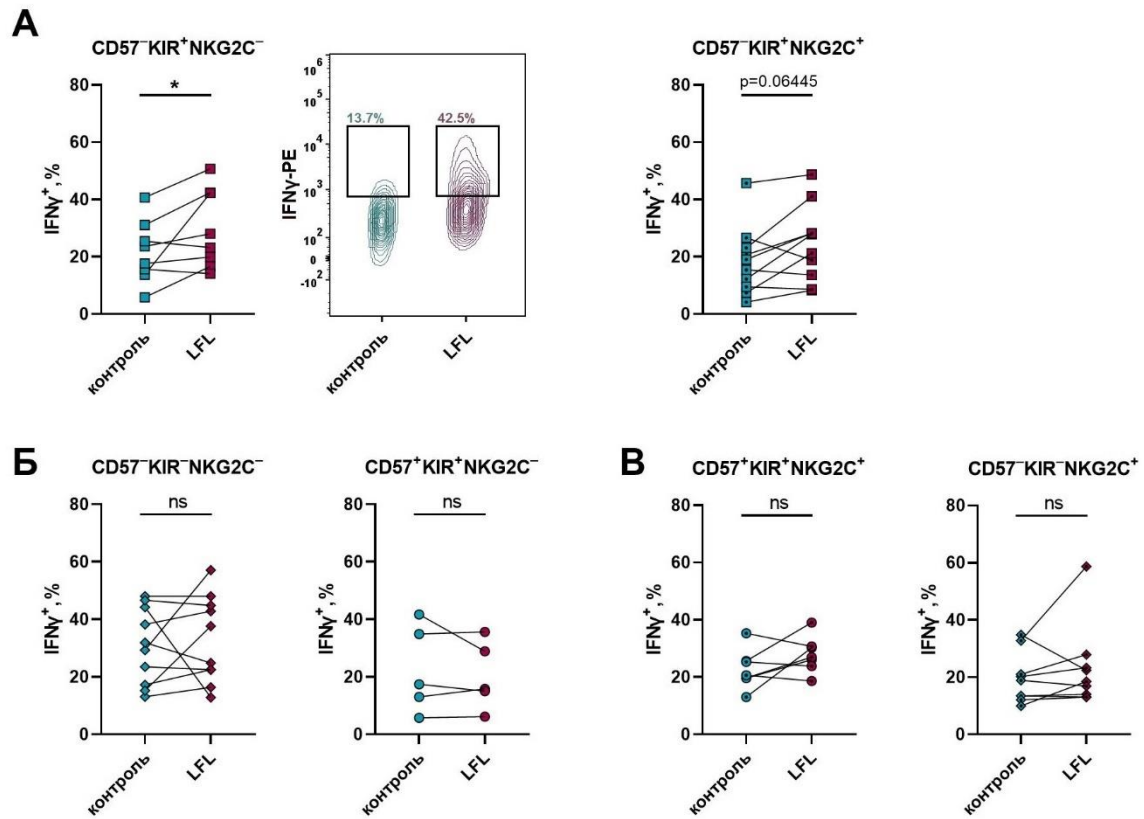


Рисунок 35. Цитокин-зависимая продукция $\text{IFN}\gamma$ в культурах субпопуляций НК-клеток с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C, полученных при презентации LFL и без нее. (А) Доля клеток, продуцирующих $\text{IFN}\gamma$, в культурах $\text{CD57}^{-}\text{KIR}^{+}$ НК-клеток с различной экспрессией NKG2C, полученных при презентации LFL и без нее; (Б) Доля клеток, продуцирующих $\text{IFN}\gamma$, в культурах NKG2C^{+} НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR, полученных при презентации LFL и без нее; (В) Доля клеток, продуцирующих $\text{IFN}\gamma$, в культурах NKG2C^{-} НК-клеток с различной экспрессией CD57 и KIR, полученных при презентации LFL и без нее. Статистическая обработка проводилась с помощью непараметрического теста Вилкоксона.

3.4.9. Презентация пептида LFL не приводит к снижению дегрануляционного потенциала НК-клеток в NKG2C-позитивных культурах

Также мы оценили дегрануляционную активность НК-клеток при инкубации с клетками-мишенями K562 после стимуляции IL-2. Между LFL-культурами и контрольными культурами не наблюдалось различий в долях дегранулирующих CD107a^{+} НК-клеток ни в одной из NKG2C-позитивных (Рис. 36А) и NKG2C-негативных (Рис. 36Б) субпопуляций.

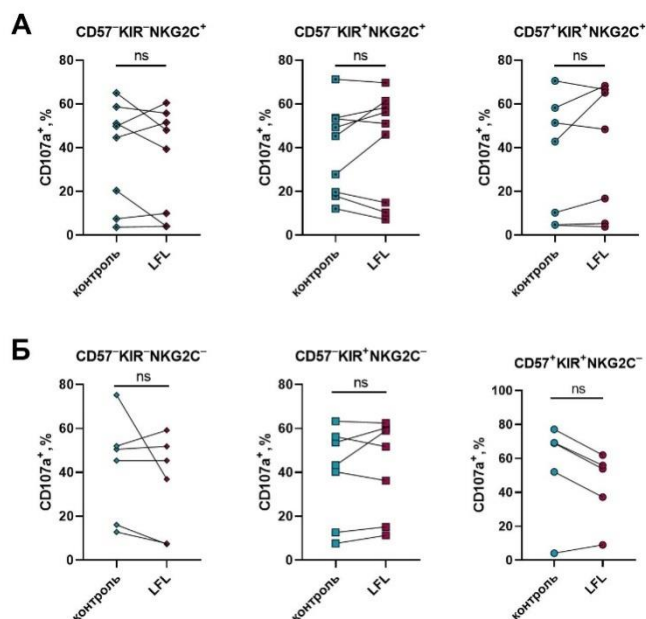


Рисунок 36. Цитокин-зависимая дегрануляция NK-клеток в культурах с различной экспрессией CD57, KIR (KIR2DL2/2) и NKG2C, полученных при презентации пептида LFL и без нее. (А) Доля дегранулирующих CD107a⁺ NK-клеток в NKG2C⁺ культурах; (Б) Доля дегранулирующих CD107a⁺ NK-клеток в NKG2C⁻ культурах. Статистическая обработка данных проводилась с помощью непараметрического теста Вилкоксона.

3.4.10. LFL-ассоциированная высокая продукция IFN γ в культурах субпопуляции CD57⁻KIR2DL2/3⁺NKG2C⁻ связана с высоким содержанием клеток NKG2C⁺ *ex vivo*

Далее мы оценили связь между цитокин-зависимой функциональной активностью полученных культур и фенотипом NK-клеток *ex vivo*. Повышенная продукция IFN γ в LFL-культурах субпопуляции CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻ была ассоциирована с высоким содержанием клеток NKG2C⁺ *ex vivo*, чего не наблюдалось в контрольных культурах (Рис. 37А). Наблюдалась связь между высокой долей клеток KIR⁺NKG2C⁺ *ex vivo* и сниженной продукцией IFN γ в LFL-культурах CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ (Рис. 37Б) и подавленной дегрануляционной активностью в LFL-культурах CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ (Рис. 37В).

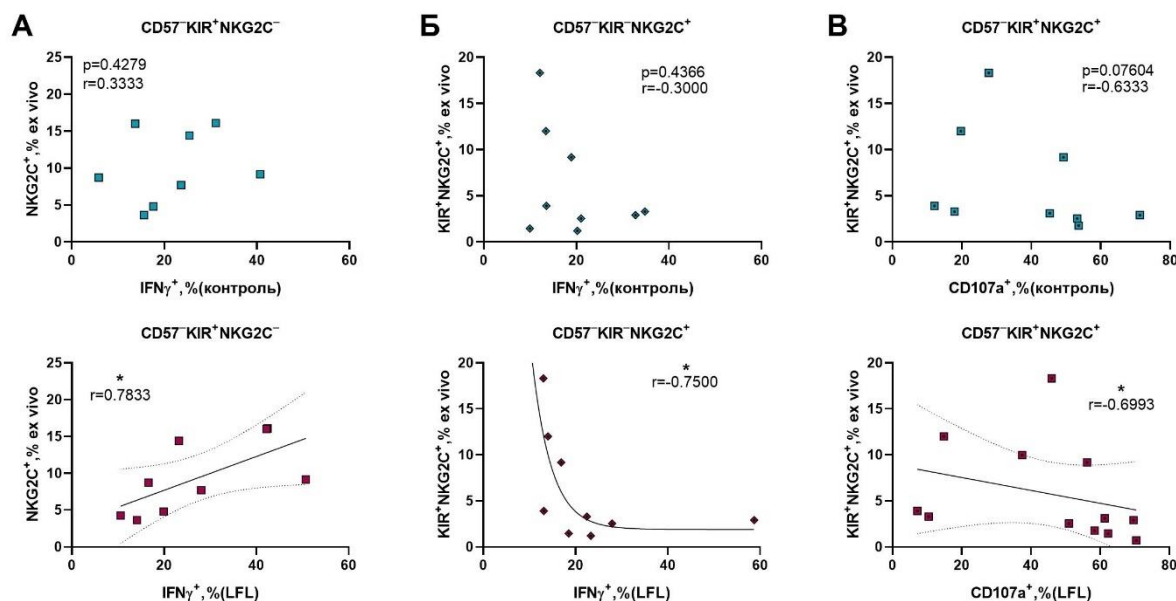


Рисунок 37. Ассоциация между долей НК-клеток с фенотипом NKG2C^+ и $\text{KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$ *ex vivo* и цитокин-зависимой функциональной активностью культур субпопуляций с различной экспрессией KIR (KIR2DL2/3) и NKG2C, полученных при стимуляции LFL и без нее. (А) Корреляция между долей НК-клеток NKG2C^+ *ex vivo* и продукцией $\text{IFN}\gamma$ в культурах субпопуляции $\text{CD57}^-\text{KIR}^+\text{NKG2C}^-$, полученных при стимуляции LFL и без нее; (Б) Корреляция между долей НК-клеток $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ *ex vivo* и продукцией $\text{IFN}\gamma$ в культурах субпопуляции $\text{CD57}^-\text{KIR}^-\text{NKG2C}^+$, полученных при стимуляции LFL и без нее; (В) Корреляция между долей НК-клеток $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ *ex vivo* и долей дегранулирующих клеток CD107a^+ в культурах субпопуляции $\text{CD57}^-\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$, полученных при стимуляции LFL и без нее. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена.

3.4.11. С высокой долей клеток HLA-DR^+ *ex vivo* ассоциирована сниженная дегрануляционная активность в культурах субпопуляций $\text{KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$

Мы выявили связь между долей различных HLA-DR^+ -позитивных популяций НК-клеток *ex vivo* и сниженной цитотоксичностью в культурах субпопуляций $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ при коинкубации с клетками-мишенями K562. Помимо дегрануляции, в LFL-культурах и контрольных культурах оценивалось также относительное содержание CD107a^+ НК-клеток. Относительное содержание CD107a^+ высчитывалось по формуле: $\text{CD107a}^+,\% (\text{отн}) = \text{CD107a}^+,\% (\text{LFL}) / \text{CD107a}^+,\% (\text{контроль})$. В субпопуляции менее дифференцированных клеток $\text{CD57}^-\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ наблюдалась сниженная дегрануляция, ассоциированная с высоким содержанием HLA-DR^+ в пуле $\text{CD56}^{\text{bright}}$ НК-клеток *ex vivo* (Рис. 38А). При этом сниженная дегрануляция в LFL-культурах более дифференцированных клеток $\text{CD57}^+\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ была ассоциирована с высокой долей клеток $\text{HLA-DR}^+\text{CD56}^{\text{bright}}$ *ex vivo* (Рис. 38Б).

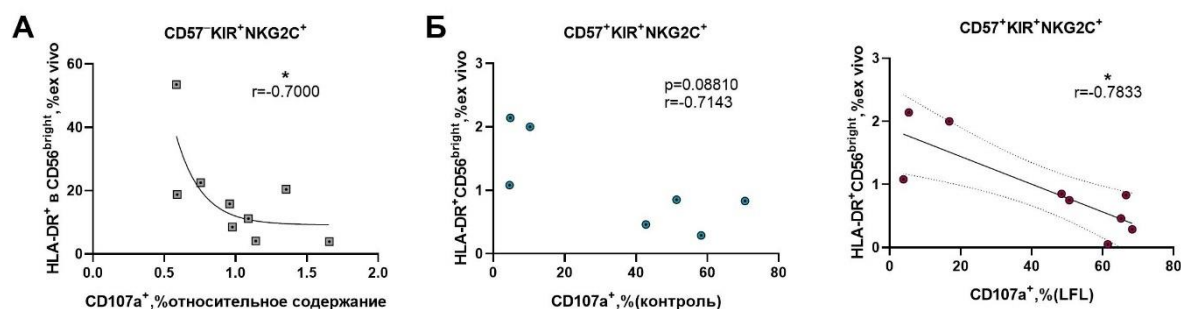


Рисунок 38. Ассоциация между долей NK-клеток с фенотипом HLA-DR⁺ *ex vivo* и цитокин-зависимой дегрануляцией культур KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ NK-клеток, полученных при стимуляции LFL и без нее, при коинкубации с клетками-мишенями K562. (А) Корреляция между долей NK-клеток HLA-DR⁺ во фракции CD56^{bright} *ex vivo* и относительным содержанием CD107a⁺ клеток в LFL-культурах субпопуляции CD57⁻KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺; (Б) Корреляция между долей NK-клеток HLA-DR⁺CD56^{bright} *ex vivo* и содержанием CD107a⁺ клеток в культурах субпопуляции CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺, полученных при стимуляции LFL (справа) и без нее (слева). Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена.

3.4.12. Повышенная цитокин-зависимая функциональная активность KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺ NK-клеток ассоциирована с повышенным содержанием NKG2A⁺ клеток *ex vivo*

Одной из наиболее примечательных взаимосвязей стала ассоциация между высокой долей NKG2A⁺ *ex vivo* и большей цитокин-зависимой функциональной активностью культур KIR⁺NKG2C⁺. Повышенная продукция IFN γ , ассоциированная с высокой долей NKG2A⁺ *ex vivo*, наблюдалась в культурах менее дифференцированных клеток CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺, которым был презентируем LFL, но не в контрольных культурах (Рис. 39А). Более выраженная дегрануляция в культурах адаптивно-подобных клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ также коррелировала с высоким содержанием NKG2A⁺ *ex vivo* (Рис. 39Б).

Экспрессия NKG2A наблюдается в популяциях менее дифференцированных NK-клеток, обладающих, вероятно, большей экспрессией рецепторов к цитокинам и, как следствие, большим потенциалом к цитокин-индуцированному ответу.

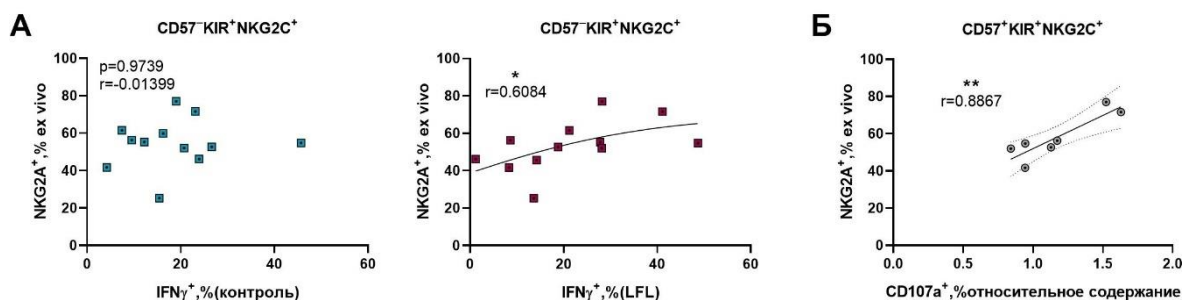


Рисунок 39. Ассоциация между долей NK-клеток с фенотипом NKG2A^+ *ex vivo* и цитокин-зависимой функциональной активностью культур $\text{KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$ NK-клеток, полученных при стимуляции LFL и без нее. (А) Корреляция между долей NK-клеток NKG2A^+ *ex vivo* и продукцией $\text{IFN}\gamma$ в культурах субпопуляции $\text{CD57-KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$, полученных при стимуляции LFL (справа) и без нее (слева); (Б) Корреляция между долей NK-клеток NKG2A^+ *ex vivo* и относительным содержанием CD107a^+ клеток в LFL-культурах субпопуляции $\text{CD57}^+\text{KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$ при коинкубации с клетками-мишенями K562. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена.

3.4.13. LFL-стимулированные NK-клетки $\text{KIR2DL2/3}^+\text{NKG2C}^+$ обладают повышенной цитотоксической активностью в отношении HLA-E^+ опухолевых сфероидов

Ранее мы показали, что презентация LFL в bulk-культурах NK-клеток приводит к повышению цитотоксической активности против HLA-E -экспрессирующих опухолевых сфероидов. Далее мы решили оценить HLA-E -направленную цитотоксичность NK-клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C. В качестве мишеней были использованы сфероидные культуры линий РМЖ MCF7 и рака яичников SKOV-3, обладающие экспрессией HLA-E . Выживаемость сфероидных культур после 24 часов инкубации с NK-клетками оценивали по доле нежизнеспособных клеток SytoxBlue⁺ и по проникновению гранзима В (GrB) в клетки-мишени. $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ клетки из фракций CD57^+ и CD57^- обладали различной эффективностью против этих линий. LFL-культуры $\text{CD57-KIR}^+\text{NKG2C}^+$ элиминировали сфероиды SKOV-3, но не MCF7, с большей эффективностью по сравнению с контрольными культурами: в культурах SKOV-3 наблюдалась повышенная доля SytoxBlue⁺ нежизнеспособных клеток, а также большее содержание внутриклеточного GrB (Рис. 40А,Б). Более дифференцированные клетки $\text{CD57}^+\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$, которым был презентируем LFL, по сравнению с контрольными культурами, обладали более выраженной цитотоксичностью против сфероидов MCF7, но не SKOV-3. После коинкубации MCF7 с LFL-культурами $\text{CD57}^+\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$, в клетках-мишенях наблюдалось большая доля SytoxBlue⁺ клеток, а также повышенное содержание GrB

(Рис. 40А,Б). Таким образом, эффективность KIR^+NKG2C^+ НК-клеток против $HLA-E^+$ солидных опухолей варьирует в зависимости от степени дифференцировки эффекторов.

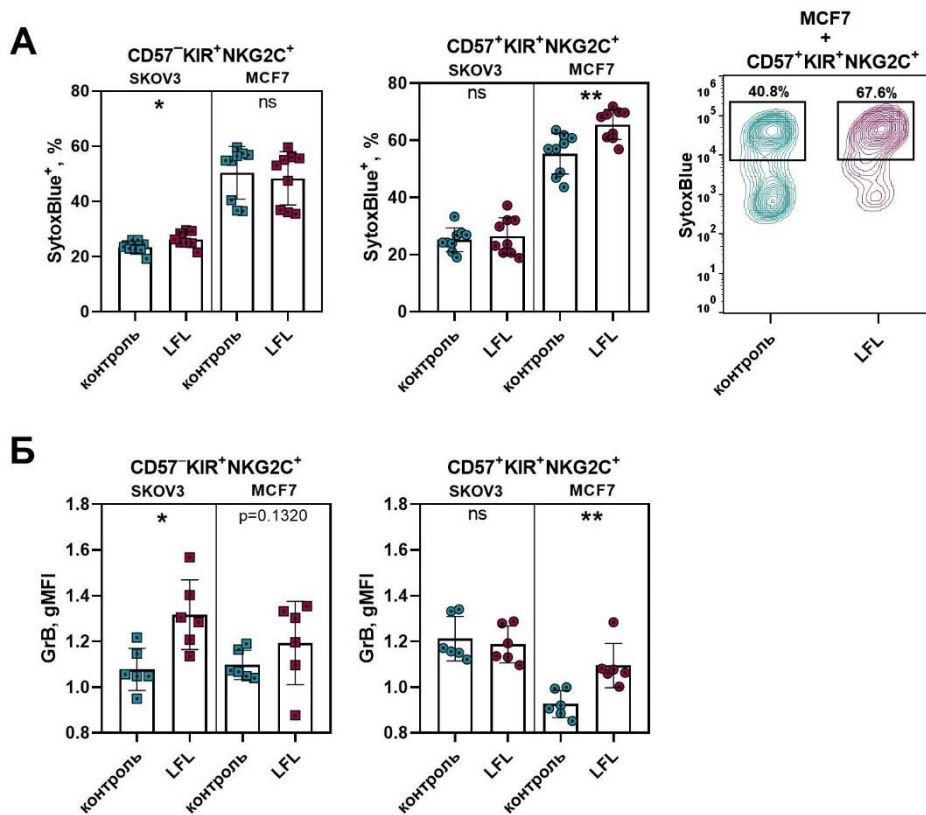


Рисунок 40. Цитотоксическая активность KIR^+NKG2C^+ ($KIR2DL2/3^+NKG2C^+$) НК-клеток против $HLA-E^+$ опухолей. (А) Доля нежизнеспособных клеток SytoxBlue⁺ в сфероиде $HLA-E^+$ клеток MCF7 и SKOV-3 после коинкубации с культурами KIR^+NKG2C^+ НК-клеток, полученными при презентации LFL или без нее, справа представлены репрезентативные цитометрические данные; (Б) Уровень проникновения гранзима В (GrB) в $HLA-E^+$ клетки-мишени MCF7 и SKOV-3 после коинкубации с культурами KIR^+NKG2C^+ НК-клеток, полученными при презентации LFL или без нее. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Манна-Уитни.

Таким образом, презентация LFL в составе $HLA-E$ на поверхности фидерных клеток приводит к накоплению KIR^+NKG2C^+ клеток, обладающих повышенной цитотоксической активностью в отношении $HLA-E$ -экспрессирующих опухолевых линий. Накопление может протекать двумя путями: посредством пролиферации KIR^+NKG2C^+ клеток или при появлении экспрессии $NKG2C$ и KIR *de novo*. При этом мы выявили взаимосвязь между фенотипом НК-клеток *ex vivo* и предрасположенностью к первому или второму типу накопления. Наиболее выраженная экспрессия $NKG2C^+$ *de novo* наблюдалась в KIR^+ субпопуляциях и была

ассоциирована с повышенным содержанием HLA-DR⁺ NK-клеток *ex vivo*. С тем же фенотипом *ex vivo* была связана и активная пролиферация клеток в bulk-культурах в ответ на презентацию LFL, но при этом сниженная функциональная активность LFL-культур KIR⁺NKG2C⁺ субпопуляций. LFL-ассоциированная пролиферация наблюдалась в популяции наиболее дифференцированных клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ и была связана с повышенным содержанием NKG2A⁺ NK-клеток *ex vivo*. С тем же фенотипом *ex vivo* была ассоциирована повышенная цитокин-зависимая функциональная активность LFL-культур KIR⁺NKG2C⁺ субпопуляций NK-клеток, а также более выраженная LFL-ассоциированная экспансия bulk-культур NK-клеток. Экспрессия NKG2A свойственна менее дифференцированным клеткам с повышенной экспрессией рецепторов к цитокинам [9] и, как следствие, более выраженной чувствительностью к цитокиновой стимуляции. Мы предположили, что NK-клетки, коэкспрессирующие NKG2C и NKG2A могут обладать более высоким пролиферативным потенциалом при экспансии *in vitro*. Кроме того, экспрессия NKG2A – один из маркеров лицензированного состояния NK-клеток и повышенного содержания цитотоксических гранул. Благодаря этим свойствам NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клетки могут представлять интерес в контексте противоопухолевой терапии наряду с NK-клетками, коэкспрессирующими KIR и NKG2C.

3.5. NK-клетки, коэкспрессирующие NKG2C и NKG2A – особая субпопуляция, сочетающая адаптивные свойства и высокую пролиферативную активность

Адаптивные NK-клетки CD57⁺NKG2C⁺ обладают рядом привлекательных свойств в контексте терапии опухолей: отличаются высокой продолжительностью жизни и высоким уровнем ADCC, что позволяет применять их в сочетанной терапии с опухоль-направленными антителами. Ранее было показано, что менее дифференцированные клетки CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺, обладая большей пролиферативной активностью, также делят с адаптивными клетками ряд фенотипических и функциональных свойств. В этой работе мы наблюдали ассоциацию между высоким содержанием низкодифференцированных NK-клеток NKG2A⁺ *ex vivo* и накоплением адаптивноподобных клеток при презентации LFL и высокой цитокин-индуцированной функциональной активностью этих клеток. Однако NKG2A и NKG2C делят один лиганд – HLA-E, и известно, что одним из препятствий на пути NK-клеточной элиминации HLA-E⁺ опухолей является ингибирование по оси NKG2A-HLA-E. Тем не менее, в Главе 1 мы показали, что экспрессия NKG2A при ко-экспрессии с NKG2C не приводит к подавлению дегрануляции NK-клеток в отношении HLA-E-экспрессирующих мишеней. Известно, что повышенное содержание клеток NKG2C⁺NKG2A⁺ наблюдается в организме ВИЧ-зараженных индивидов с низкой вирусной нагрузкой в отсутствие антиретровирусной терапии. Мы предположили, что при коэкспрессии с NKG2C рецептор NKG2A может играть

роль не только молекулы-чекпойнта, но также маркера особого функционального состояния НК-клеток с адаптивными свойствами.

В этой главе мы исследовали уникальную популяцию НК-клеток, коэкспрессирующих NKG2C и NKG2A, сравнивая ее с адаптивными клетками $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^-$. Было проведено сравнение фенотипа, транскриптома, а также пролиферативной и функциональной активности культур $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ и $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^-$ из фракций с различной экспрессией CD57. Также было оценено влияние презентации пептида LFL на пролиферацию, фенотип и функциональную активность НК-клеток из этих субпопуляций.

3.5.1. Размер субпопуляции $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ НК-клеток не ассоциирован с титром антител к HCMV в сыворотке крови

В первую очередь мы оценили размер субпопуляции дабл-положительных НК-клеток $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ в пуле клеток CD56^{dim} . В крови большей части доноров популяция дабл-положительных клеток была относительно малой и составляла не более 3% от числа зрелых НК-клеток. Приблизительно у четверти доноров наблюдались большие доли $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ клеток (Рис. 41А). Мы не выявили связи между титром антител к HCMV и размером дабл-положительной субпопуляции во фракциях менее дифференцированных CD57^- и более дифференцированных CD57^+ НК-клеток. При этом у HCMV-серопозитивных доноров в обеих фракциях наблюдалось повышенное содержание клеток с адаптивным фенотипом $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^-$ (Рис. 41Б,В).

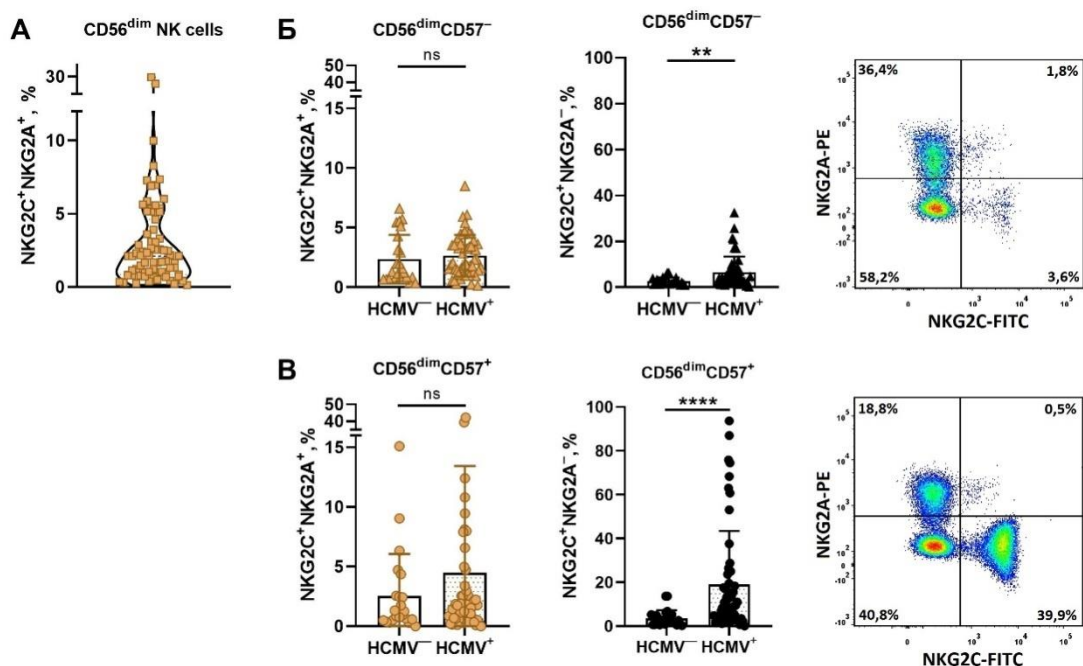


Рисунок 41. Содержание дабл-положительных НК-клеток $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ *ex vivo*. (А) Доля $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ НК-клеток в популяции CD56^{dim} ; (Б) Доля $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ и

NKG2C⁺NKG2A⁻ клеток во фракции CD56^{dim}CD57⁻ в крови HCMV-серопозитивных и -серонегативных доноров, справа представлены репрезентативные цитометрические данные образца, полученного от HCMV⁺ донора; (B) Доля NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ клеток во фракции CD56^{dim}CD57⁺ в крови HCMV-серопозитивных и -серонегативных доноров, справа представлены репрезентативные цитометрические данные образца, полученного от HCMV⁺ донора. Статистическая обработка данных проводится с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, данные представлены в виде среднее $\pm$ SD.

3.5.2. Профиль экспрессии генов NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток указывает на повышенную адгезию, выраженную миграцию и высокий потенциал к антигенпрезентации

Чтобы выявить различия и сходства между клетками NKG2C⁺NKG2A⁺ и адаптивноподобными NKG2C⁺NKG2A⁻, мы провели РНК-секвенирование образцов, собранных от четырех доноров. Доноры обладали индивидуальными наборами дифференциально экспрессированных генов (DEG – differentially expressed genes), однако мы выявили ряд общих черт. В первую очередь, ни в одном из сравнений мы не наблюдали различий между клетками NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ в экспрессии генов, ассоциированных с адаптивным состоянием, в числе которых гены, кодирующие SYK, EAT-2, PLZF, Helios, NKp30 и NKp46. Это наблюдение может свидетельствовать о наличии адаптивных свойств в дабл-позитивных популяциях. Однако был выявлен и ряд генов, экспрессированных с различной интенсивностью в исследованных популяциях.

Клетки CD57⁻NKG2C⁺NKG2A⁺ по сравнению с NKG2A-негативными обладали менее дифференцированным и вместе с тем более активированным состоянием, что было выражено в сниженной экспрессии генов *LILRB1*, *FCG3RA* (CD16), генов, кодирующих ингибирующие рецепторы KIR и CD6. Также наблюдалась повышенная экспрессия *TNFRSF11A*, *CD27*, *RUNX2* и *GZMK* (кодирует гранзим К) (Рис. 42А). В клетках субпопуляции CD57⁻NKG2C⁺NKG2A⁺ как на уровне индивидов, так и в комбинированном анализе наблюдалась повышенная экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию адгезии, межклеточного взаимодействия и активации, в числе этих генов *CD44* и *SELL* (кодирует L-селектин), а также ряд генов, кодирующих хемокиновые рецепторы (*CCR1*, *CCR5*, *CXCR3*) (Рис. 42А). Примечательно, что NK-клетки NKG2C⁺NKG2A⁺ характеризовались повышенной экспрессией МНС класса II (в частности, маркера активации HLA-DR) и регулятора экспрессии МНС-II, *CIITA* (Рис. 42). Повышенная экспрессия *CIITA* была свойственна и более дифференцированным клеткам CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ и была подтверждена комбинированным анализом экспрессии генов во всех CD56^{dim}NKG2C⁺ NK-клетках (Рис.

42Б,В). При этом повышенная экспрессия МНС-II-ассоциированных генов – известная черта адаптивной фракции NK-клеток [222].

Помимо повышенной экспрессии *CIITA*, клетки $CD57^+NKG2C^+$, экспрессирующие $NKG2A$, отличались повышенной экспрессией генов, ассоциированных с повышенным тропизмом к тканям (*SELL* и *RUNX2*) (Рис. 42Б). Также была повышена экспрессия *DAPK2*, что свидетельствует о повышенной метаболической активности и устойчивости к апоптозу. Как и во фракции $CD57^-NKG2C^+$, наблюдалась сниженная экспрессия *CD6*, *KIR2DX1* и *TKTL1*. Однако, в отличие от $CD57^-$ -негативных клеток, в $CD57^+$ -позитивных $NKG2C^+NKG2A^+$ не наблюдалось повышенной экспрессии генов, кодирующих хемокиновые рецепторы, а также среди DEGs менее полно были представлены гены, связанные с презентацией антигенов (Рис. 42Б).

Интегрированный анализ общей фракции $CD56^{dim}NKG2C^+$ позволил охарактеризовать $NKG2A^+$ NK-клетки более широко. Мы выявили, как и ранее, повышенную по сравнению с $NKG2A^-$ -негативными клетками экспрессию *SELL*, *CD44*, *CIITA* и *MHC-II*, сниженную экспрессию *CD6*. Также дополнительно была выявлена повышенная экспрессия *CXCR6* и *TNFRSF9* (кодирует 4-1BB) (Рис. 42В).

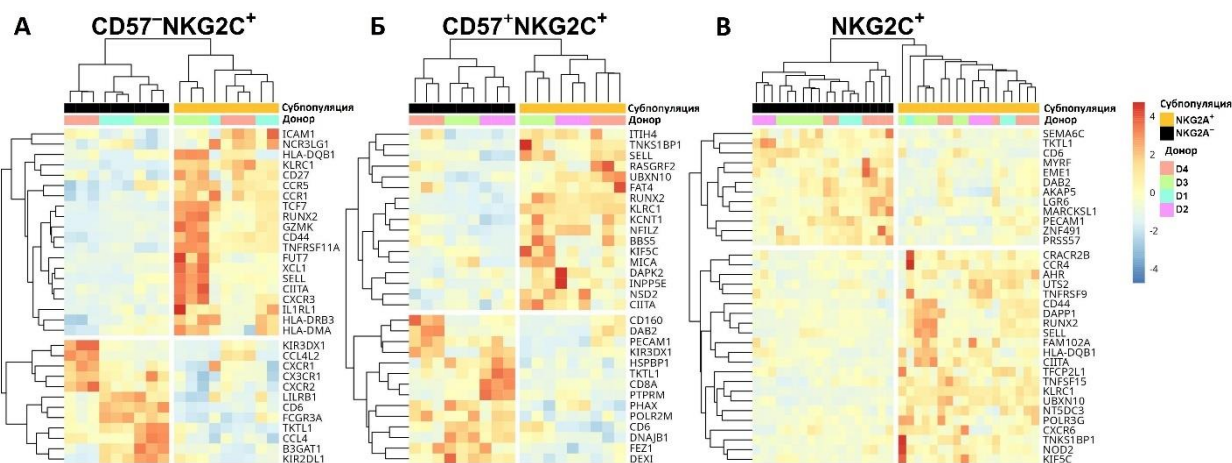


Рисунок 42. Транскрипционный анализ $NKG2A^{+/-}$ NK-клеток, экспрессирующих $NKG2C$, во фракциях $CD57^+$ и $CD57^-$. Независимая иерархическая кластеризация дифференциально экспрессирующихся генов ($LFC > 0,58$, $p < 0,01$) между $NKG2A^+$ (оранжевый) и $NKG2A^-$ (черный) NK-клетками. (А,Б) Каждый столбец – комбинация реплик от трех доноров для (А) $CD57^-NKG2C^+$ NK-клеток и (Б) $CD57^+NKG2C^+$ NK-клеток; (В) Комбинация реплик из (А,Б) для каждой субпопуляции каждого донора. Строки представляют дифференциально экспрессированные гены, тепловая карта отражает уровень экспрессии гена от высокого уровня (красный) до низкого уровня (синий).

Далее мы исследовали поверхностную экспрессию молекул, закодированных генами со сниженной экспрессией (KIR) и с повышенной экспрессией (CD62L (L-селектин), CD44 и HLA-DR) в популяциях NKG2A-позитивных и -негативных клеток CD56^{dim}NKG2C⁺. NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клетки, как CD57-негативные, так и CD57-позитивные, обладали сниженной поверхностной экспрессией KIR2DL2/3 и повышенной экспрессией CD62L, что соответствует данным РНК-секвенирования (Рис. 43А,Б). CD57⁻NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клетки характеризовались как повышенной экспрессией генов, так и повышенной поверхностной экспрессией CD44 и HLA-DR, чего не наблюдалось для CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ клеток (Рис. 43В,Г).

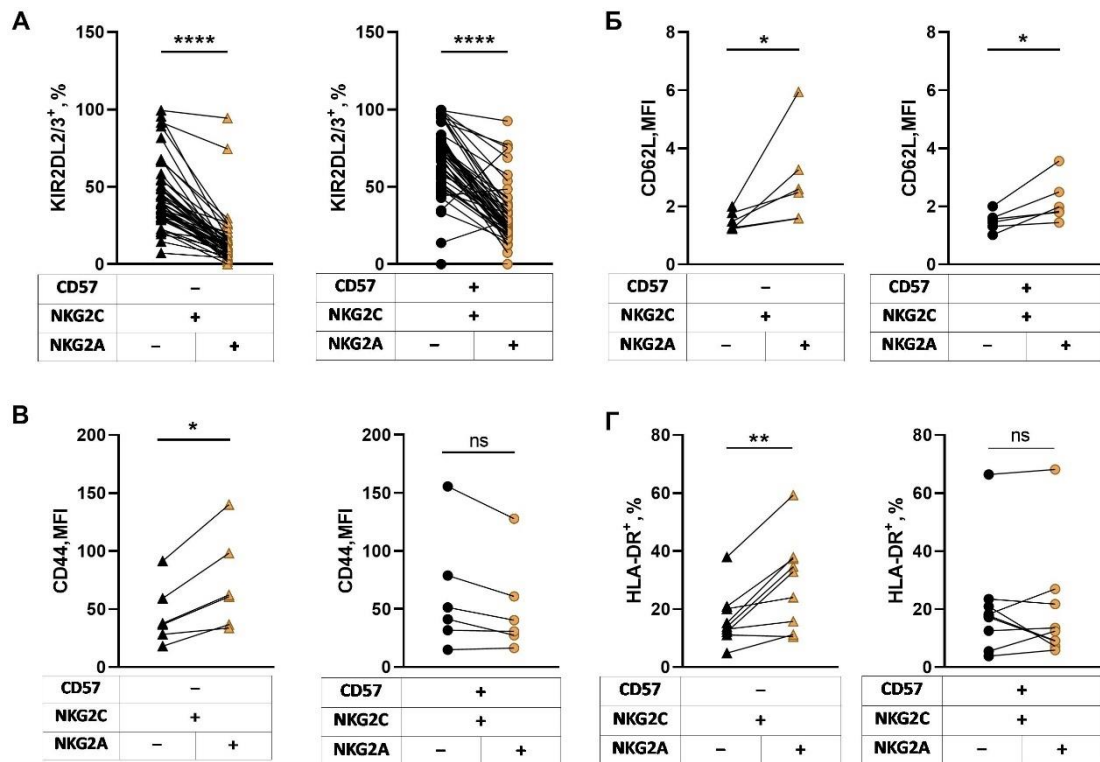


Рисунок 43. Фенотипический анализ NKG2C⁺ NK-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2A. (А-Г) Поверхностная экспрессия рецепторов KIR2DL2/3 (А), CD62L (Б), CD44 (В) и HLA-DR (Г) в субпопуляциях NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ во фракциях CD57⁻ и CD57⁺ NK-клеток. Количество доноров n=48 (Д), n=6 (Б,В) и n=9 (Г). Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

Также мы оценили экспрессию рецептора к IL-2 с повышенной аффинностью (CD25) на поверхности $CD57^{+/-}NKG2C^{+}NKG2A^{+/-}$ NK-клеток и выявили тенденцию к более высокой экспрессии CD25 в популяции $NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ (Рис. 44).

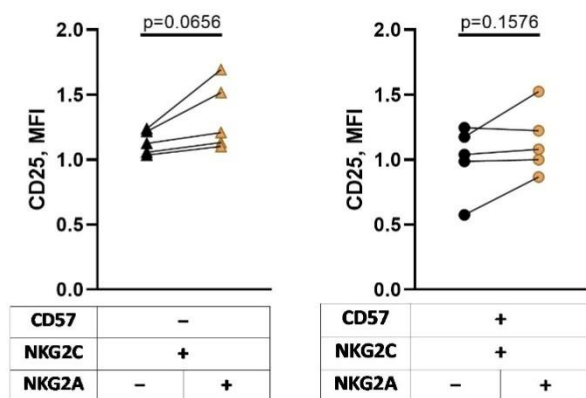


Рисунок 44. Анализ экспрессии рецептора CD25 на поверхности $NKG2C^{+}$ NK-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2A.

Одной из характеристик адаптивных NK-клеток является сниженная экспрессия адаптерной молекулы $Fc\epsilon R1\gamma$. Посредством внутриклеточного окрашивания мы оценили уровень экспрессии данной молекулы в клетках $NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ в сравнении с $NKG2C^{+}NKG2A^{-}$. Дабл-позитивные NK-клетки во фракции $CD57^{-}$ отличались более низким уровнем экспрессии $Fc\epsilon R1\gamma$ по сравнению с клетками $NKG2C^{+}NKG2A^{-}$, чего не наблюдалось во фракции более дифференцированных клеток $CD57^{+}$ (Рис. 45А,В). Наряду с отсутствием различий в экспрессии других маркеров адаптивности, это еще одно свидетельство схожести между $NKG2A$ -позитивной и $NKG2A$ -негативной популяцией во фракции $CD57^{+}$. Более дифференцированные клетки $CD57^{+}$, как $NKG2A$ -позитивные, так и $NKG2A$ -негативные, отличались сниженной экспрессией $Fc\epsilon R1\gamma$ по сравнению с $CD57$ -негативной фракцией (Рис. 45Б,В).

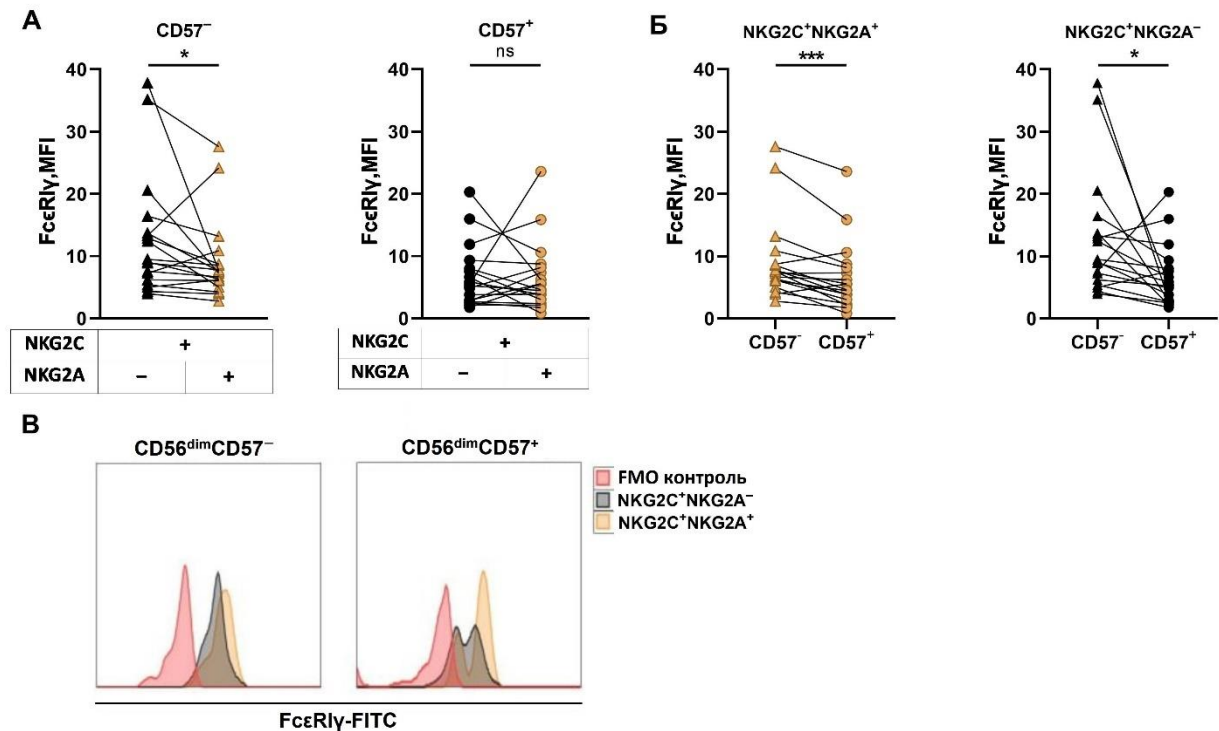


Рисунок 45. Анализ внутриклеточной экспрессии адаптерной молекулы FcεRIγ в NKG2C⁺ NK-клетках с различной экспрессией NKG2A и CD57. (А,Б) Уровень экспрессии FcεRIγ в субпопуляциях NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ во фракциях CD57⁻ и CD57⁺ NK-клеток; (В) Репрезентативные цитометрические данные, отражающие уровень внутриклеточной экспрессии FcεRIγ в субпопуляциях NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ во фракциях CD57⁻ и CD57⁺ NK-клеток. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

Суммируя полученные выше данные, можно охарактеризовать дабл-позитивные NKG2A⁺NKG2C⁺ NK-клетки как фракцию, сохраняющую ряд адаптивных характеристик, но в то же время обладающую меньшей степенью дифференцировки по сравнению с адаптивноподобными клетками NKG2C⁺NKG2A⁻. Кроме того, клетки NKG2C⁺NKG2A⁺ обладают повышенным потенциалом к антиген-презентации, миграции и тропизму к тканям.

3.5.3. NKG2C⁺NKG2C⁺ NK-клетки не уступают адаптивным клеткам в интенсивности ответа на CD16-опосредованную стимуляцию

Адаптивные NK-клетки представляют особый интерес в иммунотерапии опухолей благодаря повышенной ADCC. Мы оценили различия между NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻ NK-клетками в способности отвечать на CD16-опосредованную активацию дегрануляцией и продукцией IFNγ. NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клетки фракции CD57⁺ не отличались от адаптивноподобных по уровню CD16-зависимой дегрануляции и демонстрировали

повышенную CD16-зависимую продукцию $\text{IFN}\gamma$. При этом клетки $\text{CD57}^-\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ уступали NKG2A -негативным по доле CD107a^+ дегранулировавших клеток, отреагировавших на стимуляцию через рецептор антитело-зависимой цитотоксичности CD16 (Рис. 46).

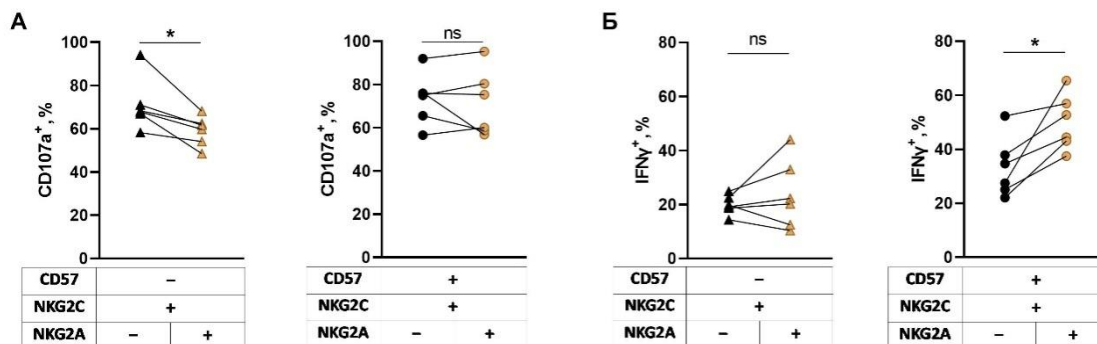


Рисунок 46. Антитело-зависимая дегрануляция (А) и продукция $\text{IFN}\gamma$ (Б) в субпопуляциях $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ и $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^-$ во фракциях CD57 -негативных и CD57 -позитивных НК-клеток. Число доноров $n=6$. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

3.5.4. NKG2A -позитивные клетки обладают повышенным пролиферативным потенциалом

Согласно полученным ранее данным об экспрессии генов и ряда поверхностных молекул, NKG2A -позитивные НК-клетки могут обладать большим потенциалом к межклеточному взаимодействию и более выраженной чувствительностью к цитокиновой стимуляции по сравнению с NKG2A -негативными клетками.

Чтобы оценить пролиферативный потенциал дабл-позитивных НК-клеток *in vitro*, мы получили культуры из 100 NKG2C^+ НК-клеток субпопуляций с различной экспрессией NKG2A и CD57 . Клетки были стимулированы IL-2 в сочетании с фидерными клетками K562-mbIL21, коэффициент экспансии оценивался на 12 день после начала культивирования. НК-клетки NKG2A^+ обладали более высокой пролиферативной активностью по сравнению с NKG2A^- как во фракции менее дифференцированных клеток $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD57}^-$, так и во фракции более дифференцированных $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD57}^+$ (Рис. 47А). Кроме того, NKG2A -позитивные НК-клетки демонстрировали тенденцию к образованию большего числа клональных культур по сравнению с NKG2A -негативными клетками (Рис. 47Б).

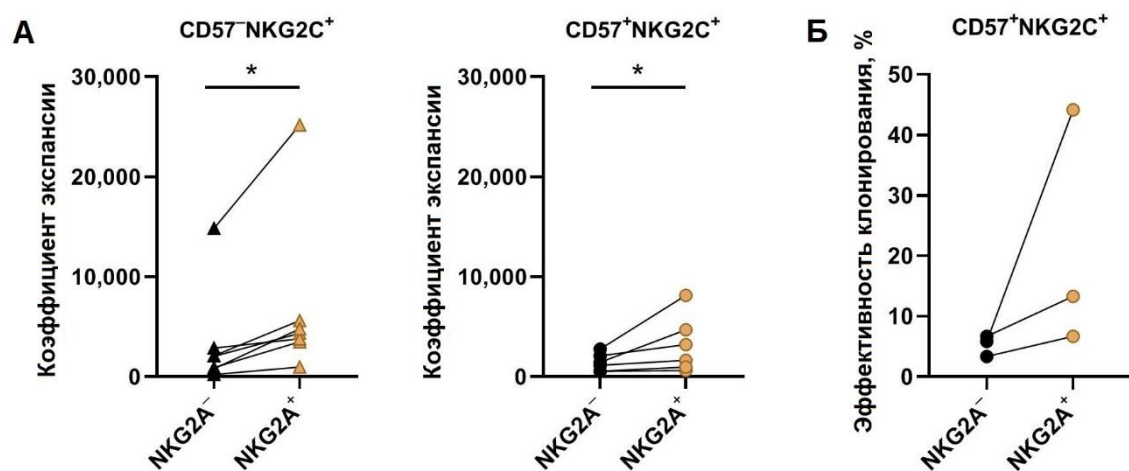


Рисунок 47. Пролиферативная активность CD57^{+/-}NKG2C⁺NKG2A^{+/-} NK-клеток. (А) Коэффициент экспансии CD57^{+/-}NKG2C⁺NKG2A^{+/-} NK-клеток в культурах, полученных из 100 клеток, время культивирования t=12 дней; (Б) Эффективность клонообразования CD57^{+/-}NKG2C⁺NKG2A^{+/-} NK-клеток, коллекции клонов от 3 доноров, время культивирования t=5 недель. NK-клетки стимулировались IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

3.5.5. Интенсивная пролиферация NKG2A⁺ NK-клеток сопровождается потерей экспрессии NKG2C и CD57

Ранее на культурах с различной экспрессией KIR2DL2/3 (далее – KIR2DL2/3) и NKG2C мы показали, что культивирование *in vitro* может сопровождаться потерей экспрессии маркеров сортировки. В самом деле, при интенсивной пролиферации NKG2A-позитивных культур, как CD57⁺, так и CD57⁻, наблюдалась более выраженная потеря экспрессии NKG2C по сравнению с NKG2A-негативными культурами (Рис. 48А,Б). Во фракции более дифференцированных клеток CD57⁺NKG2C⁺ также была выявлена более выраженная потеря клеток с адаптивным фенотипом CD57⁺NKG2C⁺ (Рис. 48Б).

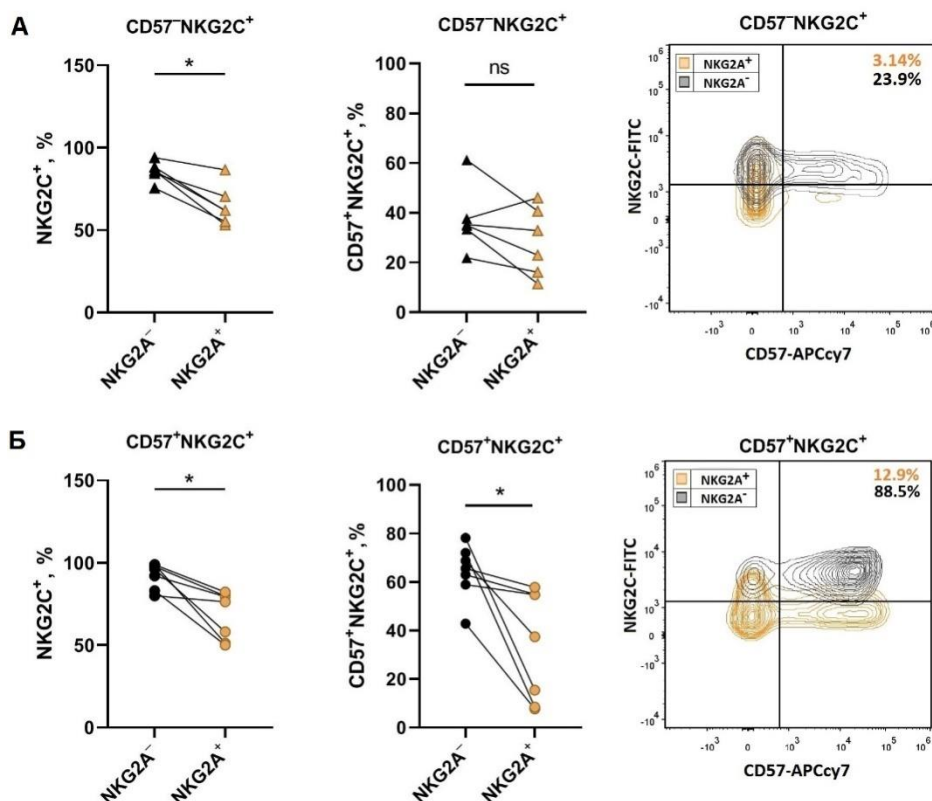


Рисунок 48. Фенотип культур CD57^{+/-}NKG2C⁺NKG2A^{+/-} НК-клеток. (А,Б) Доля клеток NKG2C⁺ и CD57⁺NKG2C⁺ в субпопуляциях NKG2C⁺NKG2A^{+/-} НК-клеток из фракций CD57⁻ (А) и CD57⁺ (Б). Справа представлены репрезентативные цитометрические данные. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона (* p<0,05).

3.5.6. Презентация пептида LFL не приводит к подавлению пролиферации NKG2C⁺NKG2A⁺ НК-клеток и индуцирует активную пролиферацию в культурах, полученных от супердоноров

Ранее мы показали, что презентация пептида LFL НК-клеткам в bulk-культурах и культурах субпопуляций ведет к накоплению клеток с фенотипом KIR⁺NKG2C⁺, в частности, более дифференцированных клеток с адаптивным фенотипом CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺. Кроме того, презентация пептида LFL клеткам низкой степени дифференцировки CD57⁻KIR⁻NKG2C⁺ приводила к повышенной стабильности экспрессии NKG2C. Поэтому мы предположили, что с помощью фидерных клеток, презентующих пептид HCMV, возможно накопление дабл-позитивных клеток NKG2C⁺NKG2A⁺. Однако NKG2A – известный чекпойнт, и при распознавании комплекса HLA-E+пептид может подавлять пролиферативную активность НК-клеток. Чтобы изучить этот вопрос, мы получили LFL-культуры и контрольные культуры из 100 NKG2C-позитивных НК-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2A. Через 12 дней культивирования в LFL-культурах NKG2C⁺NKG2A⁺ из CD57-негативной фракции наблюдалась повышенная пролиферативная активность по сравнению с NKG2C⁺NKG2A⁻

культурами. Ранее то же наблюдалось в контрольных культурах. Тот же паттерн наблюдался в пуле CD57-позитивных NKG2C⁺ NK-клетках, полученных от некоторых доноров (Рис. 49А). При этом в NKG2A-негативных культурах CD57⁺NKG2C⁺ NK-клеток наблюдалась более выраженная пролиферация при презентации им пептида LFL, по сравнению с контрольными культурами. В то же время, презентация пептида не приводила к подавлению пролиферации в NKG2A-позитивных культурах CD57⁺NKG2C⁺ (Рис. 49Б). Индукция активной LFL-зависимой пролиферации CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток наблюдалась в образцах, полученных от нескольких доноров, однако общей тенденции не было выявлено.

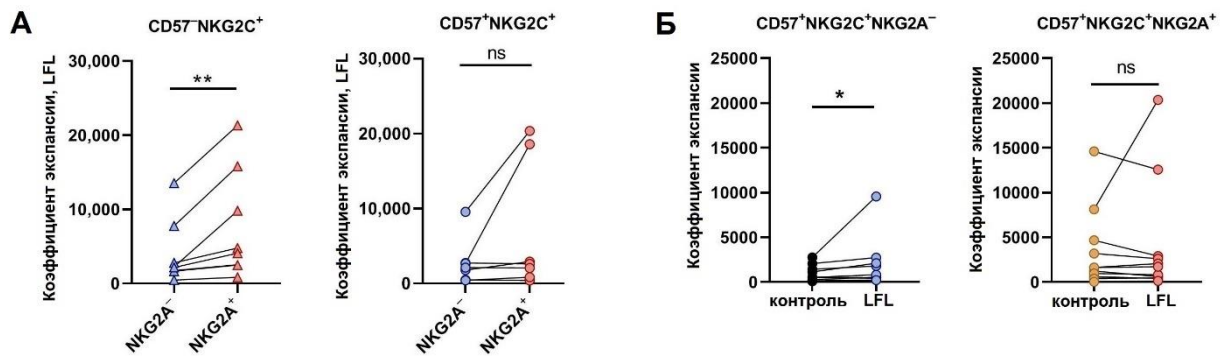


Рисунок 49. Пролиферативная активность культур NKG2C⁺ NK-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2A, полученных при презентации пептида LFL и без нее. (А) Коэффициент экспансии CD57⁻NKG2C⁺ и CD57⁺NKG2C⁺ NK-клеток с различной экспрессией NKG2A в ответ на стимуляцию IL-2 с фидерными клетками, презентующими LFL; (Б) Коэффициент экспансии CD57⁺NKG2C⁺ NK-клеток с различной экспрессией NKG2A в ответ на стимуляцию IL-2 с фидерными клетками, презентующими и не презентующими LFL. Число доноров n=13, время культивирования t=12 дней. Статистическая обработка данных проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

Помимо пептида LFL, мы также презентировали клеткам субпопуляций пептид LLL, который в комплексе с HLA-E распознается рецептором NKG2C с меньшей аффинностью и может обладать сниженным активирующим потенциалом. Культуры, которым презентирован пептид LLL (LLL-культуры) и контрольные культуры NK-клеток из CD57⁻негативной фракции не различались по уровню экспансии. Однако презентация пептида LLL, в отличие от LFL, не приводила к повышенной пролиферации в культурах CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻ и индуцировала снижение пролиферативной активности в культурах CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ (Рис. 50).

Таким образом, активация NK-клеток, коэкспрессирующих NKG2C и NKG2A, фидерными клетками, презентующими LFL, не приводит к подавлению пролиферативной активности.

Тем не менее, в популяции $CD57^+NKG2C^+$ наблюдается подавление пролиферативной активности NKG2A-позитивных клеток при презентации им пептида LLL, комплекс которого с HLA-E распознается НК-клетками с меньшей аффинностью. Успешность преодоления NKG2A-опосредованного ингибирования при презентации НК-клеткам HLA-E, по всей видимости, зависит от аффинности связывания NKG2C с лигандом.

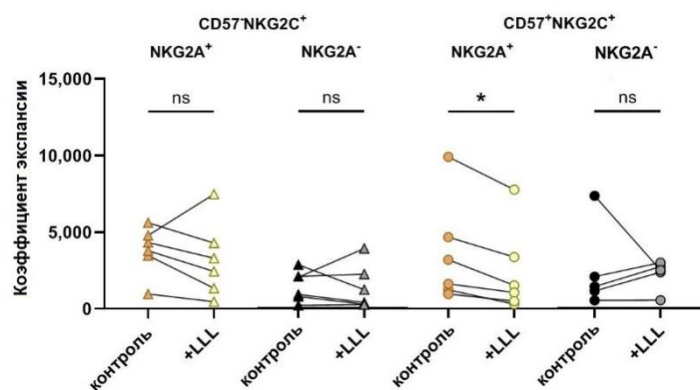


Рисунок 50. Пролиферативная активность культур $NKG2C^+$ НК-клеток с различной экспрессией CD57 и NKG2A, полученных при презентации пептида LLL и без нее.

3.5.7. Пролиферативная активность LFL-культур $NKG2C^+NKG2A^{+/-}$ ассоциирована с экспрессией NKG2A в этих культурах

Мы также оценили взаимосвязь между экспрессией NKG2A в культурах $CD57^+NKG2C^+$ НК-клеток и пролиферативным ответом в присутствии пептида LFL. Наиболее выраженная пролиферация в LFL-культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ НК-клеток была ассоциирована с наименьшей экспрессией NKG2A *de novo*, чего не наблюдалось в контрольных культурах (Рис. 51А). В то же время наиболее выраженная пролиферация $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ НК-клеток при презентации пептида LFL была связана с наибольшей стабильностью экспрессии NKG2A (Рис. 51Б).

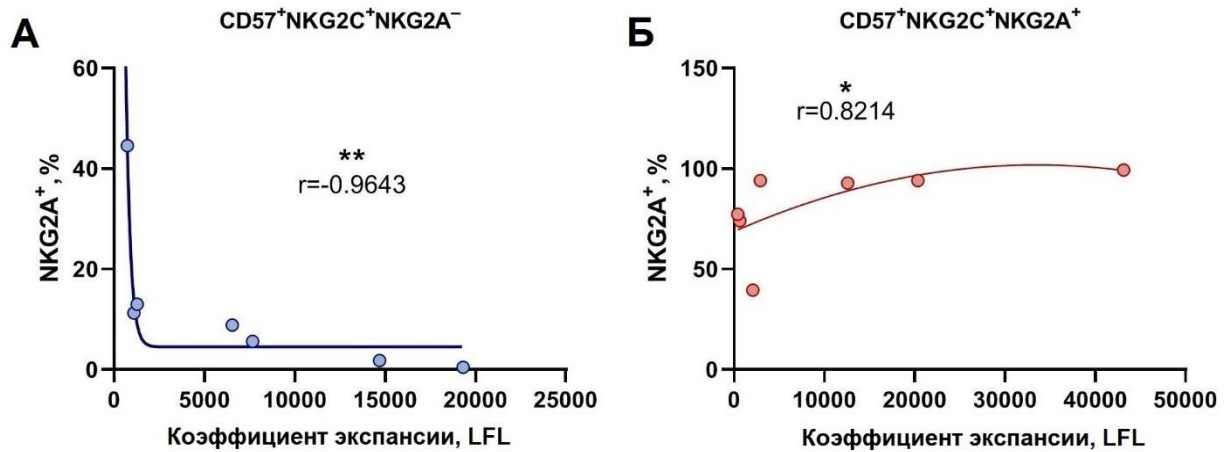


Рисунок 51. Ассоциация между экспрессией NKG2A и пролиферативной активностью LFL-культур $CD57^+NKG2C^+$ NK-клеток с различной экспрессией NKG2A. (А) Корреляция между долей клеток, экспрессирующих NKG2A *de novo* в культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^-$ и коэффициентом экспансии при презентации пептида LFL; (Б) Корреляция между долей NKG2A⁺ клеток в культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ и коэффициентом экспансии при презентации пептида LFL. Корреляционный анализ проводился с помощью корреляции Спирмена.

3.5.8. Активация $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ NK-клеток *in vitro* при презентации пептидов HCMV приводит к изменениям в транскрипционном профиле генов

Чтобы выявить влияние презентации пептидов LLL и LFL на транскрипционный профиль NK-клеток в культурах $NKG2C^+NKG2A^+$ NK-клеток из фракции высокодифференцированных клеток $CD57^+$, мы провели сравнение экспрессии генов в образцах *ex vivo* с образцами культур, накопленных в течение 17 дней при стимуляции IL-2 и фидерными клетками, презентующими комплекс HLA-E+пептид. Пролиферировавшие LFL- и LLL-культуры отличались повышенной экспрессией генов, связанных с клеточным делением, а также генов HLA класса II (Рис. 52А,Б). Наблюдалась повышенная экспрессия генов, кодирующих HLA-DR, СИТА, ряд хемокиновых (CCR1, CCR2, CCR6, CXCR3) и цитокиновых рецепторов (рецепторы к IL-12 и IL-15). Также наблюдалась повышенная экспрессия генов, кодирующих рецепторы натуральной цитотоксичности (NKp30, NKp44) и молекулы, ассоциированные с повышенной цитотоксичностью (перфорин, гранзим К, гранулизин). Примечательно, что в LFL-культурах наблюдалось повышение экспрессии рецептора к IL-2 высокой аффинностью (IL-2RA), чего не наблюдалось в LLL-культурах. Также LFL-культуры, но не LLL-культуры, характеризовались высокой экспрессией *CCL5*, что свойственно для адаптивноподобных клеток из когорты NK3, и высокой экспрессией *KIR2DL1*. В LLL-культурах, в свою очередь,

наблюдалась повышенная экспрессия маркера адаптивности *CD2*, но в то же время повышенная экспрессия адаптерной молекулы *FcεRIγ*.

Культивирование клеток $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ в присутствии пептидов LLL и LFL приводило к снижению экспрессии ряда генов, связанных с функциональной активностью. В их числе гены, кодирующие рецептор антителозависимой цитотоксичности *CD16 (FCGR3A)*, гранзимы Н и М, а также *IFNG*. Это могло отразиться на итоговой функциональной активности полученных культур.

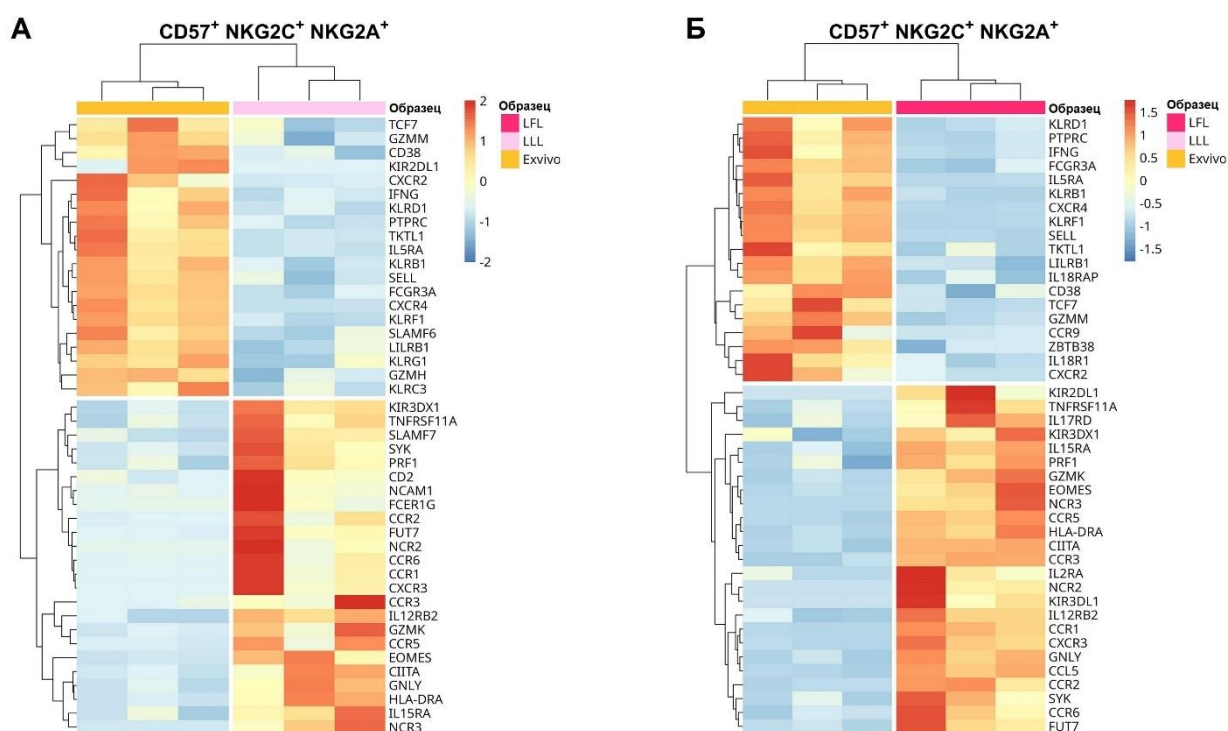


Рисунок 52. Анализ транскрипции генов культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ НК-клеток, которым был презентируем пептид LLL (А) или LFL (Б) в сравнении с клетками $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ *ex vivo*. На диаграмме представлены результаты независимой иерархической кластеризации по дифференциально экспрессированным генам (DEG) ($LFC > 0,58$, $p\text{-adjusted} < 0,01$). Каждый ряд – дифференциально экспрессированный ген, тепловая карта отражает уровень экспрессии генов от высокого (красный) до низкого (синий).

3.5.9. НК-клетки $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$, которым был презентируем пептид LFL, демонстрируют повышенную цитокин-зависимую продукцию $IFN\gamma$

Поскольку культивирование *in vitro* при презентации пептида приводит к снижению экспрессии *IFNG*, мы оценили продукцию $IFN\gamma$ в LFL-культурах и контрольных культурах после цитокиновой стимуляции комбинацией IL-12 и IL-18. Хотя уровень экспрессии гена, кодирующего $IFN\gamma$, был снижен, а LFL-культуры bulk НК-клеток демонстрировали

сниженную продукцию $\text{IFN}\gamma$, в LFL-культурах NKG2A -позитивных клеток фракции $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^+$ наблюдалась повышенная продукция $\text{IFN}\gamma$ (Рис 53А). Кроме того, наблюдалась тенденция к более интенсивной продукции $\text{IFN}\gamma$ в LFL-культурах NKG2A -позитивных $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^+$ NK-клетках, по сравнению с NKG2A -негативными (Рис. 53Б).

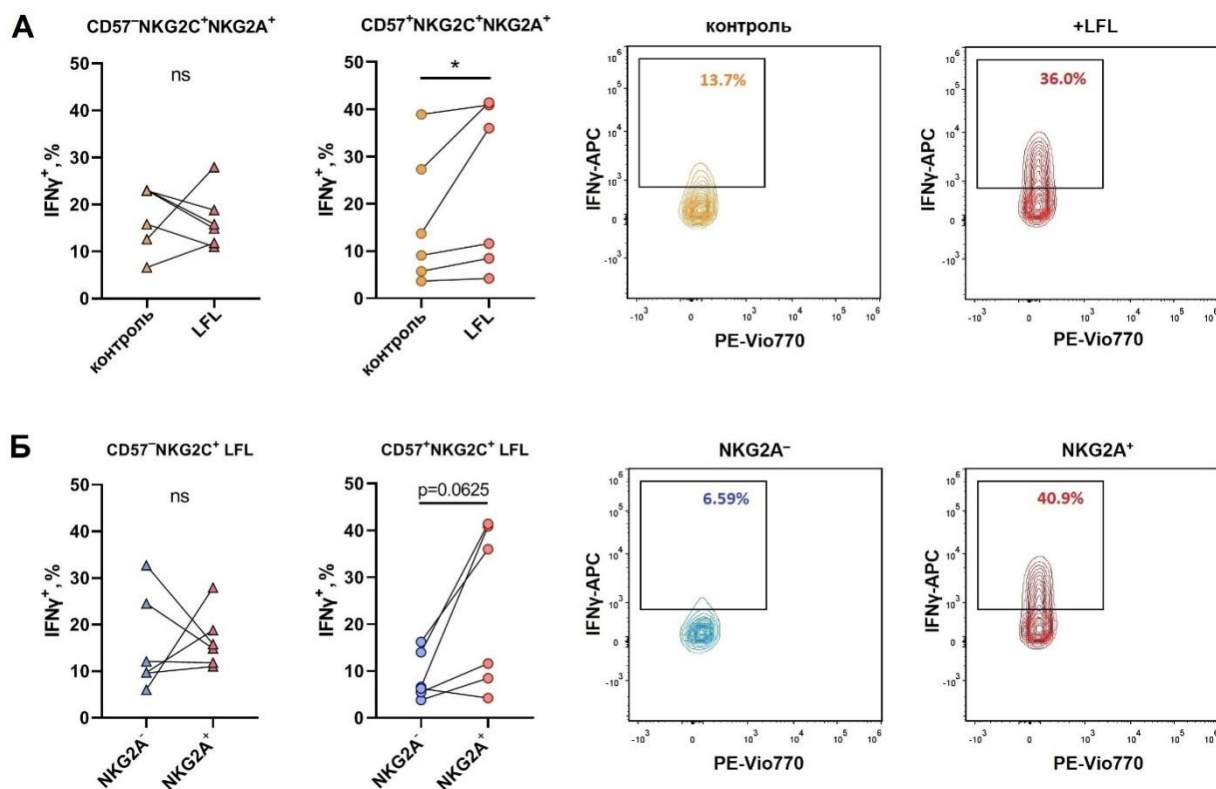


Рисунок 53. Продукция $\text{IFN}\gamma$ NK-клетками $\text{CD57}^{+/-}\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^{+/-}$ в LFL-культурах и в контрольных культурах после цитокиновой стимуляции *in vitro*. (А) Доля $\text{IFN}\gamma$ -продуцирующих клеток в культурах $\text{CD57}^{+/-}\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ NK-клеток, полученных при презентации LFL и без нее, после стимуляции IL-12 и IL-18; (Б) Доля $\text{IFN}\gamma$ -продуцирующих клеток в культурах $\text{CD57}^{+/-}\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^{-/+}$ NK-клеток, полученных при презентации LFL и без нее, после стимуляции IL-12 и IL-18. Справа представлены репрезентативные цитометрические данные. Статистический анализ проводился посредством непараметрического теста Вилкоксона.

3.5.10. Культуры $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^+$, которым был презентируван LFL, отличаются повышенной CD16 -опосредованной дегрануляцией

Далее была оценена способность полученных культур дегранулировать в ответ на коинкубацию с клетками-мишенями K562 после стимуляции IL-2, а также в ответ на CD16 -опосредованную стимуляцию. NKG2A -позитивные LFL-культуры и контрольные культуры $\text{CD57}^+\text{NKG2C}^+$ NK-клеток не отличались от NKG2A -негативных по уровню CD107a^+

дегранулировавших клеток, как в ответ на инкубацию с K562 (Рис. 54А), так и в ответ на активацию через рецептор антитело-зависимой цитотоксичности CD16 (Рис. 54Б).

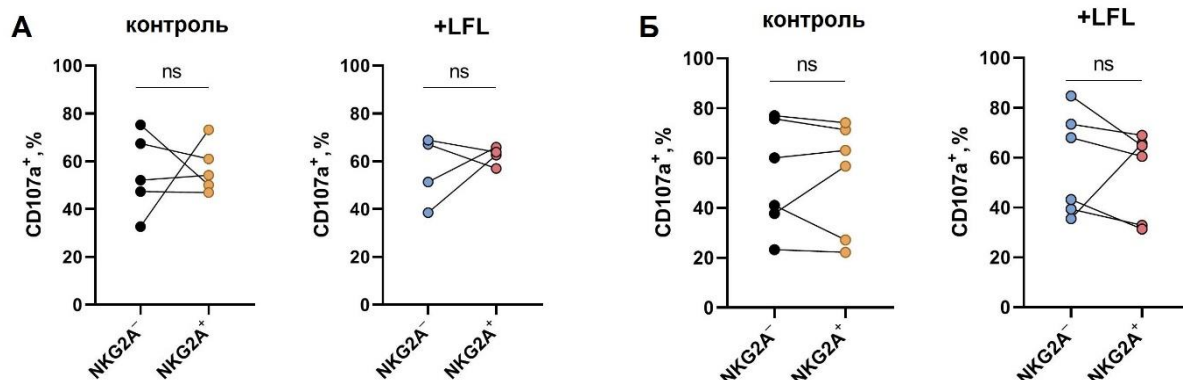


Рисунок 54. Дегрануляционная активность культур $CD57^+NKG2C^+$ НК-клеток с различной экспрессией NKG2A, полученных при презентации LFL или без нее. (А) Доля клеток $CD107a^+$ в LFL-культурах и контрольных культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^{+/-}$ после коинкубации с K562; (Б) Доля клеток $CD107a^+$ в LFL-культурах и контрольных культурах $CD57^+NKG2C^+NKG2A^{+/-}$ после CD16-опосредованной стимуляции. Статистический анализ проводился посредством непараметрического теста Вилкоксона.

Хотя LFL-культуры и контрольные культуры не различались по уровню дегрануляции и продукции $IFN\gamma$ при CD16-опосредованной стимуляции, мы обнаружили различия в CD16-опосредованной функциональной активности между CD57-позитивными и CD57-негативными культурами. LFL-культуры $CD57^+NKG2C^+$ отличались повышенной дегрануляцией по сравнению с LFL-культурами $CD57^-NKG2C^+$ во фракции NKG2A-позитивных клеток (Рис. 55А), та же тенденция наблюдалась и во фракции NKG2A-негативных адаптивно-подобных НК-клеток (Рис. 55Б). В контрольных культурах подобных различий не было выявлено. Также клетки контрольных культур $CD57^+NKG2C^+NKG2A^+$ отличались более высокой CD16-опосредованной продукцией $IFN\gamma$ по сравнению с CD57-негативными клетками $NKG2C^+NKG2A^+$ (Рис. 55В). В LFL-культурах, а также в NKG2A-негативных культурах таких же различий не наблюдалось (Рис. 55Г).

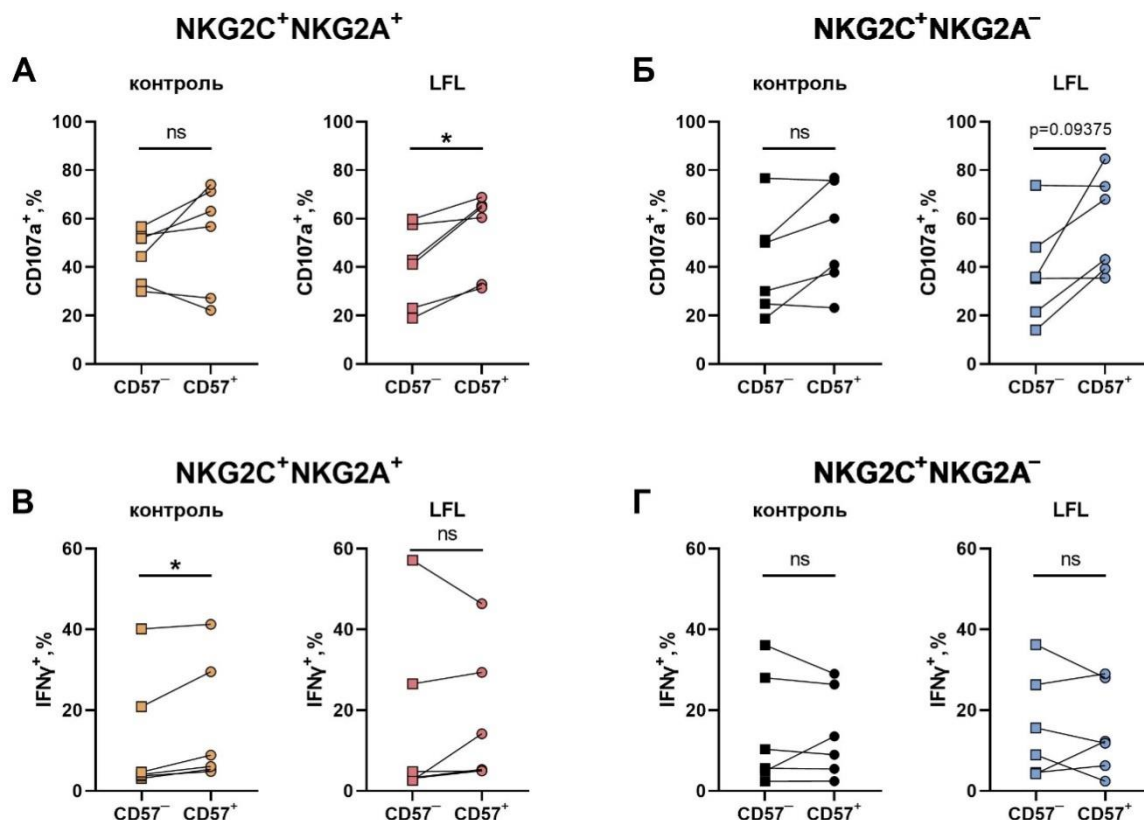


Рисунок 55. CD16-опосредованная функциональная активность культур НК-клеток CD57^{+/-} NKG2C⁺NKG2A^{+/-}, полученных при презентации пептида LFL или без нее. (А) Доля дегранулировавших клеток CD107a⁺ при CD16-опосредованной стимуляции *in vitro* в NKG2C⁺NKG2A⁺ культурах с различной экспрессией CD57; (Б) Доля дегранулировавших клеток CD107a⁺ при CD16-опосредованной стимуляции *in vitro* в NKG2C⁺NKG2A⁻ культурах с различной экспрессией CD57; (В) Доля продуцирующих IFNγ при CD16-опосредованной стимуляции *in vitro* в NKG2C⁺NKG2A⁺ культурах с различной экспрессией CD57; (Г) Доля продуцирующих IFNγ при CD16-опосредованной стимуляции *in vitro* в NKG2C⁺NKG2A⁻ культурах с различной экспрессией CD57. Статистический анализ проводился посредством непараметрического теста Вилкоксона.

3.5.11. CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ НК-клетки, стимулированных LFL или LLL, обладают различиями в профиле экспрессии генов

Чтобы полнее охарактеризовать ответ НК-клеток на презентацию пептида LFL, мы на 17 день после начала культивирования собрали образцы пролифериовавших клеток CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺, полученных от двух доноров с различными профилями пролиферации. LFL-культуры донора 1 обладали большим коэффициентом экспансии по сравнению с LLL-культурами, а NKG2A-позитивные клетки из фракции CD57⁺NKG2C⁺

превосходили NKG2A-негативные по пролиферативной активности (Рис. 56А). При этом между аналогичными культурами донора 3 таких различий не было выявлено, презентация LFL не оказывала влияния на пролиферативную активность CD57⁺NKG2C⁺ NK-клеток (Рис. 56Б).

Комбинированный анализ транскрипции генов обоих доноров позволил выявить только один ген с повышенным уровнем экспрессии – ДНК-связывающий белок RGL2. Среди генов со сниженной экспрессией был ДНК-связывающий белок TOX2, PIM2 – белок, индуцирующий прохождение клетки по клеточному циклу, и *MDX1* (Рис. 56В).

Далее мы выявили различия, характерные для индивидуальных доноров. Между культурами CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺, стимулированных LFL и LLL, полученных от донора 1, было выявлено больше различий в экспрессии генов. В частности, в LFL-культурах была выявлена повышенная экспрессия генов, регулирующих белковый транспорт (*BBS7*, *ARFGEF2*), внутриклеточный сигналинг (*DUSP10*, *SPRY2*), а также генов, кодирующих трансмембранные белки (*SCL*, *PTGER4*) и ингибирующий рецептор KIR3DL1 (Рис. 56Г). Наблюдалась сниженная транскрипция генов, связанных с адгезией (*MUC1/MUC17*), регуляцией репликации, транскрипции и процессинга РНК (*TCF7L2*, *MDX1*, *CNOT3*, *DDX39B*), клеточного сигналинга (*TIAM1*, *PLEKHG3*), гликозилирования (*FUT7*, *CSGALNACT1*) и гена, кодирующего противовоспалительных цитокин IL-10 (Рис. 56Г).

В LFL-культурах CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺, полученных от донора 3, наблюдалась повышенная экспрессия генов, кодирующих ингибирующие рецепторы KIR (*KIR2DL1*, *KIR3DL1*), внутриклеточные белки (*COLQ* и *PSMB3*, которые, как ранее было показано, высоко экспрессированы в HLA-DR⁻NKG2C⁻ NK-клетках). Также была повышена экспрессия генов *RGL2* и гликозилтрансферазы *ST6GALNAC6*. Среди генов со сниженной экспрессией наблюдались *RRN3* и *MRPS6* (Рис. 56Д).

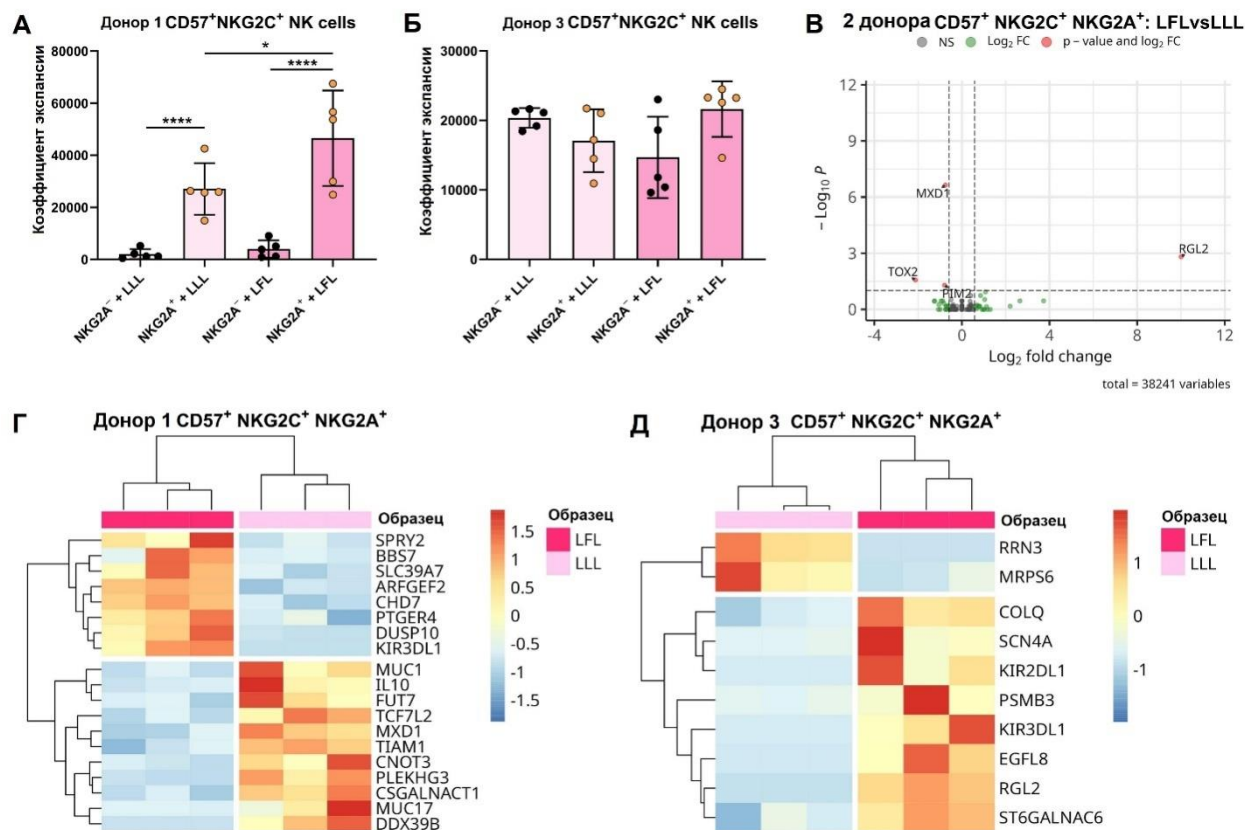


Рисунок 56. Анализ транскрипции генов в культурах CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток, полученных при стимуляции пептидами LFL и LLL. (А,Б) Сравнение коэффициентов экспансии культур CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ и CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻, стимулированных LFL и LLL и полученных от донора 1 (А) и донора 3 (Б); (В) Volcano plot сравнения культур CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺, стимулированных LFL и LLL, полученных от 2 доноров; (Г,Д) Независимая иерархическая кластеризация дифференциально экспрессированных генов (LFC> 0,58, p-adjusted<0,01) между LFL- и LLL-культурами CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток, полученных от донора 1 (Г) и донора 3 (Д). Каждый ряд – дифференциально экспрессированный ген, тепловая карта отражает уровень экспрессии генов от высокого (красный) до низкого (синий). Статистический анализ проводился посредством параметрического теста ANOVA, данные представлены в виде среднее±SD.

Таким образом, мы охарактеризовали уникальную субпопуляцию НК-клеток, коэкспрессирующих NKG2C и NKG2A и показали, что клетки NKG2C⁺NKG2A⁺ делят с адаптивными клетками ряд адаптивных свойств, однако при этом обладают менее зрелым фенотипом. Эти клетки способны более интенсивно пролиферировать, более чувствительны к цитокиновой стимуляции, обладают большим потенциалом к антиген-презентации. При этом клетки NKG2C⁺NKG2A⁺ не уступают адаптивным клеткам в чувствительности к CD16-

опосредованной стимуляции, а презентация им пептида LFL приводит к повышенной цитокин-индуцированной продукции IFN γ . Таким образом, при коэкспрессии с NKG2C ингибирующий рецептор NKG2A может быть не столько чекпойнтом и маркером подавленной активности НК-клеток, сколько маркером особого функционального состояния. Высокий пролиферативный потенциал NKG2C⁺NKG2A⁺ НК-клеток и общие свойства с адаптивными клетками делают эту популяцию перспективной основой для создания противораковых эффекторов, в том числе HLA-E-направленных.

3.6. НК-клетки, модифицированные рецептором CAR, специфически распознающим опухоль-ассоциированную молекулу HER2

Одним из подходов к увеличению противоопухолевой эффективности НК-клеток является их генетическая модификация, в частности, модификация конструкцией, несущей химерный рецептор CAR, способный специфически связываться с опухоль-ассоциированным антигеном. Высокая экспрессия эпидермального фактора роста HER2 свойственна опухолям молочной железы, яичника, кишечника, печени – и ассоциирована с негативным прогнозом и с высоким риском рецидива. В настоящее время ведется разработка различных подходов к терапии HER2-экспрессирующих опухолей, в том числе к получению HER2-CAR-NK-клеток. В качестве HER2-распознающих доменов в составе рецептора CAR могут быть использованы как фрагменты вариабельных доменов антител, так и молекулы-миметики антител, например, богатые анкириновыми повторами соединения DARPIn. В числе HER2-специфичных DARPIn известны молекулы 9-29 и G3, которые обладают специфичностью к I и IV субдоменам HER2 соответственно (Рис. 57А). Сайт распознавания, а также различия в аффинности связывания с HER2 могут оказывать влияние на эффективность элиминации мишеней HER2-CAR-лимфоцитами. Также на чувствительность HER2⁺ опухолей к терапии может влиять плотность экспрессии HER2 на клеточных мембранах мишеней.

Заключительная глава этой работы посвящена получению CAR-NK-клеточных эффекторов со специфичностью к субдоменам I и IV HER2. Конструкцией, несущей рецептор HER2-CAR, опосредующий наиболее выраженную цитотоксическую реакцию, мы модифицировали НК-клетки bulk-культур, а также НК-клетки с различной экспрессией KIR и NKG2C, чтобы установить, влияет ли выбор субпопуляции на эффективность CAR-терапии НК-клетками.

3.6.1. Получение HER2-CAR-NK-клеток с антиген-распознающими доменами, специфичными к домену I и IV HER2

В первую очередь на основе ранее имевшейся конструкции PSCA-CAR были получены конструкции, несущие HER2-направленный рецептор CAR. Для этого последовательность,

кодирующая PSCA-распознающий домен, была вырезана с помощью рестриктаз, на ее место была лигирована одна из двух HER2-распознающих последовательностей: 9-29-HER2 или G3-HER2 (Рис. 57Б). Были накоплены вирусные частицы, несущие конструкции 9-29-HER2-CAR и G3-HER2-CAR, этими частицами были трансдуцированы активированные *in vitro* первичные НК-клетки. На этом этапе были использованы bulk-культуры НК-клеток без разделения на субпопуляции, полученные при стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21. Эффективность трансдукции определялась на 3-5 день после модификации по уровню свечения репортерного белка GFP. НК-клетки были успешно модифицированы обеими конструкциями, эффективность трансдукции 9-29-HER2-CAR и G3-HER2-CAR составила соответственно 5-53% и 9-43% (Рис. 57В). Широкий разброс значений эффективности трансдукции может быть следствием различной чувствительности НК-клеток как к генетической модификации, так и к предварительной стимуляции *in vitro*. Также детектировался выход рецепторов CAR на поверхность клеточной мембраны по экспрессии внеклеточного домена CAR – с-Мус. Мы подтвердили успешный выход рецептора на поверхность клеточной мембраны, ассоциированный с экспрессией GFP (Рис. 57Г).

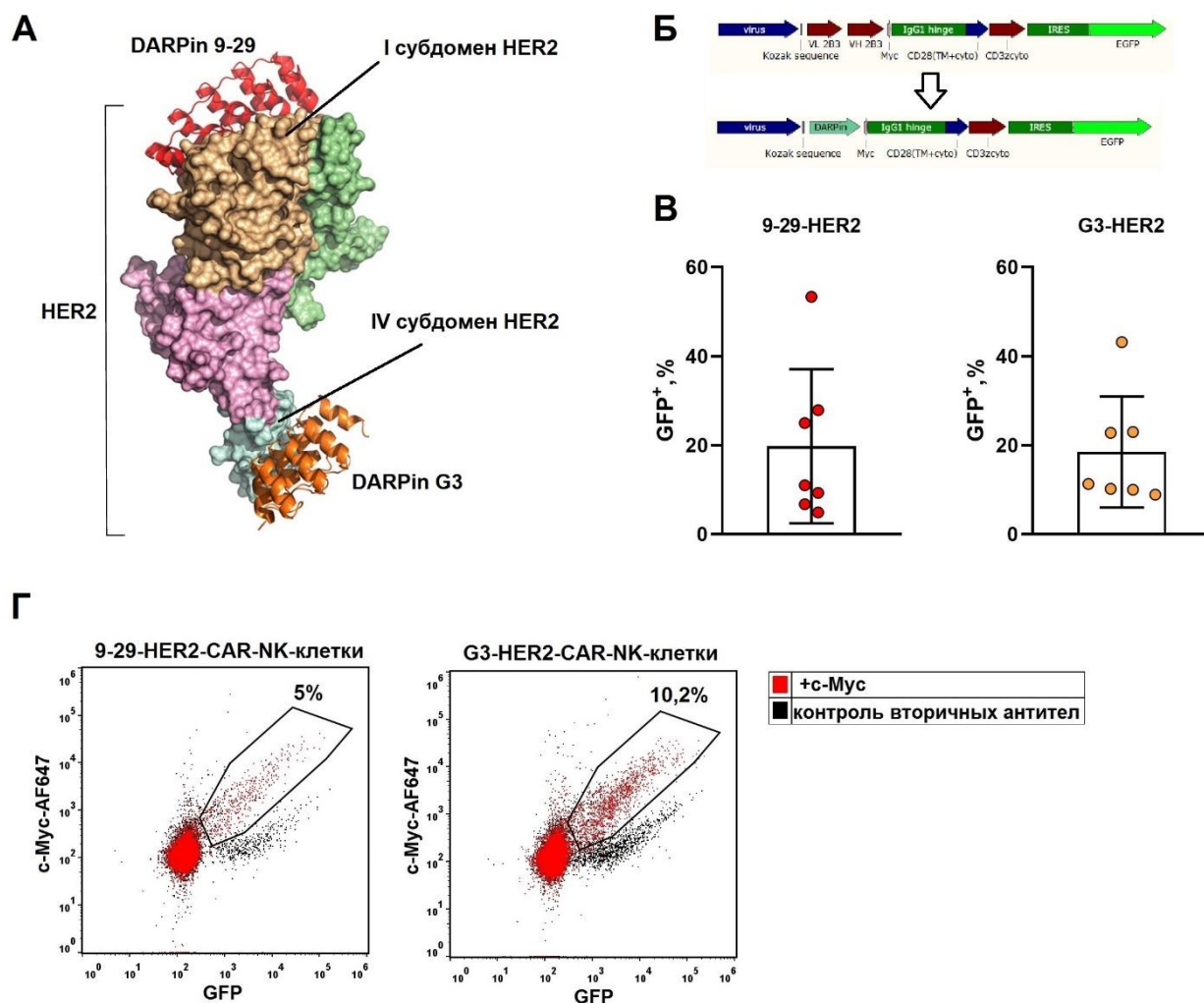


Рисунок 57. Получение HER2-CAR-NK-клеток. (А) Антиген-распознающие домены на основе DARPin 9-29 и G3 и их сайты распознавания на поверхности молекулы HER2 (по Stepanov и др., 2022 [194]); (Б) Схемы последовательностей векторов PSCA-CAR и 9-29/G3-HER2-CAR; (В) Доля GFP⁺ NK-клеток после трансдукции конструкциями 9-29/G3-HER2-CAR; (Г) Детекция экспрессии рецептора CAR на поверхности клеточной мембраны трансдуцированных NK-клеток.

3.6.2. HER2-CAR-NK-клетки обладают повышенной цитотоксичностью против 2D- и 3D-культур HER2⁺ опухолей

Далее была оценена цитотоксическая активность HER2-CAR-NK-клеток против 2D- и 3D-культур HER2-экспрессирующих опухолевых линий. В качестве мишеней были выбраны клетки BT-474, SKOV-3 и MCF7, экспрессия HER2 которыми была подтверждена ранее в Главе 1 (Рис. 3Г). Трансдуцированные NK-клетки были отсортированы на фракцию GFP-негативных клеток, не несущих рецептор CAR, и фракцию GFP⁺ клеток, оснащенных рецептором HER2-CAR. Цитотоксическую активность HER2-CAR-NK-клеток против 2D-культур оценивали с помощью кальцеинового теста: клетки-мишени предварительно были

окрашены Calcein-AM, и после коинкубации с NK-клетками была измерена интенсивность флуоресценции молекулы Calcein в супернатанте. 9-29 и G3-HER2-CAR-NK-клетки более эффективно элиминировали клетки BT-474 по сравнению с GFP-негативными NK-клетками (Рис. 58А). При коинкубации с NK-клетками мишеней MCF7 с низкой экспрессией HER2 наблюдалась та же тенденция (Рис. 58Б).

Для изучения эффекторных функций NK-клеток в отношении плотных скоплений опухолевых мишеней, нами были получены 3D-культуры (сфероиды) клеток SKOV-3 (с высокой экспрессией HER2) и MCF7 (с низкой экспрессией HER2). Восприимчивость полученных 3D-культур к цитотоксическому воздействию 9-29 и G3-HER2-CAR-NK-клеток мы оценивали методом проточной цитометрии по доле нежизнеспособных клеток-мишеней, удерживающих краситель SytoxBlue. Поскольку цитотоксическое воздействие NK-клеток может приводить к изменению морфологии мишеней, мы дополнительно отделяли клетки-мишени от эффекторов посредством выделения CD56-негативной популяции. При коинкубации сфероидов SKOV-3 и MCF7 с HER2-CAR-NK-клетками наблюдалась тенденция к более интенсивному накоплению нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток-мишеней (Рис. 58В,Г). Причем в 3D-культурах MCF7 эта тенденция была более выражена.

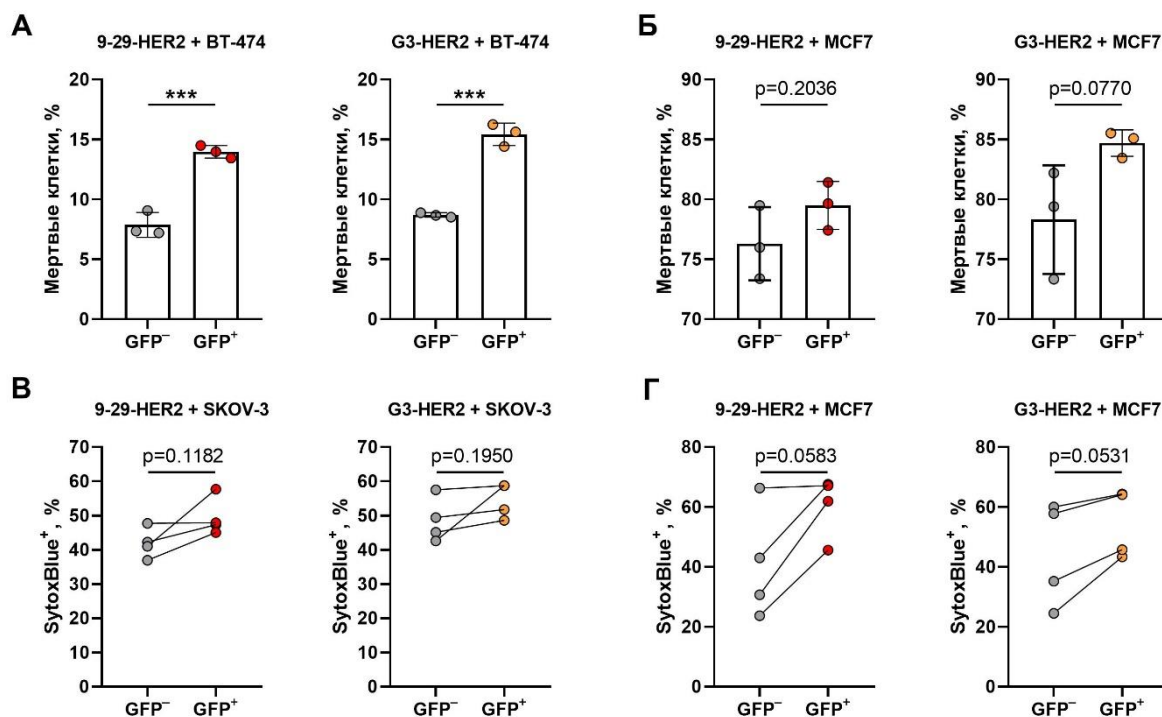


Рисунок 58. Восприимчивость HER2-экспрессирующих мишеней к цитотоксическому воздействию 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клеток. (А,Б) Доля лизированных клеток в 2D-

культурах BT-474 (А) и MCF7 (Б) при коинкубации с модифицированными (GFP⁺) и немодифицированными (GFP⁻) НК-клетками; (В,Г) Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в 3D-культурах SKOV-3 (В) и MCF7 (Г) при коинкубации с модифицированными (GFP⁺) и немодифицированными (GFP⁻) НК-клетками. Статистическая обработка проводилась посредством t-теста Стьюдента (А,Б) и непараметрического теста Вилкоксона (В,Г). Данные представлены в виде среднее±SD.

3.6.3. HER2-CAR-NK-клетки активно дегранулируют при коинкубации с HER2-экспрессирующими мишенями

Помимо влияния НК-клеток на жизнеспособность мишеней мы также оценили способность клеток-мишеней активировать HER2-CAR-эффекторы и индуцировать в них дегрануляцию. Интенсивность дегрануляции НК-клеток после инкубации с 2D-и 3D-культурами HER2⁺ мишеней оценивалась по доле клеток, экспрессирующих на своей поверхности CD107a. Мы показали, что при коинкубации с 2D-культурами SKOV-3 (высокая экспрессия HER2) GFP⁺ НК-клетки дегранулируют в среднем в 2 раза более интенсивно, чем GFP-негативные НК-клетки. Это наблюдение справедливо как для G3-, так и для 9-29-HER2-CAR-NK-эффекторов (Рис. 59А). При инкубации с 2D-культурами MCF7 наблюдалась та же тенденция (Рис. 59Б). Также тенденция к более интенсивной дегрануляции HER2-CAR-NK-клеток по сравнению с GFP⁻ наблюдалась при коинкубации со сфероидными SKOV-3 и MCF7 (Рис. 59В,Г).

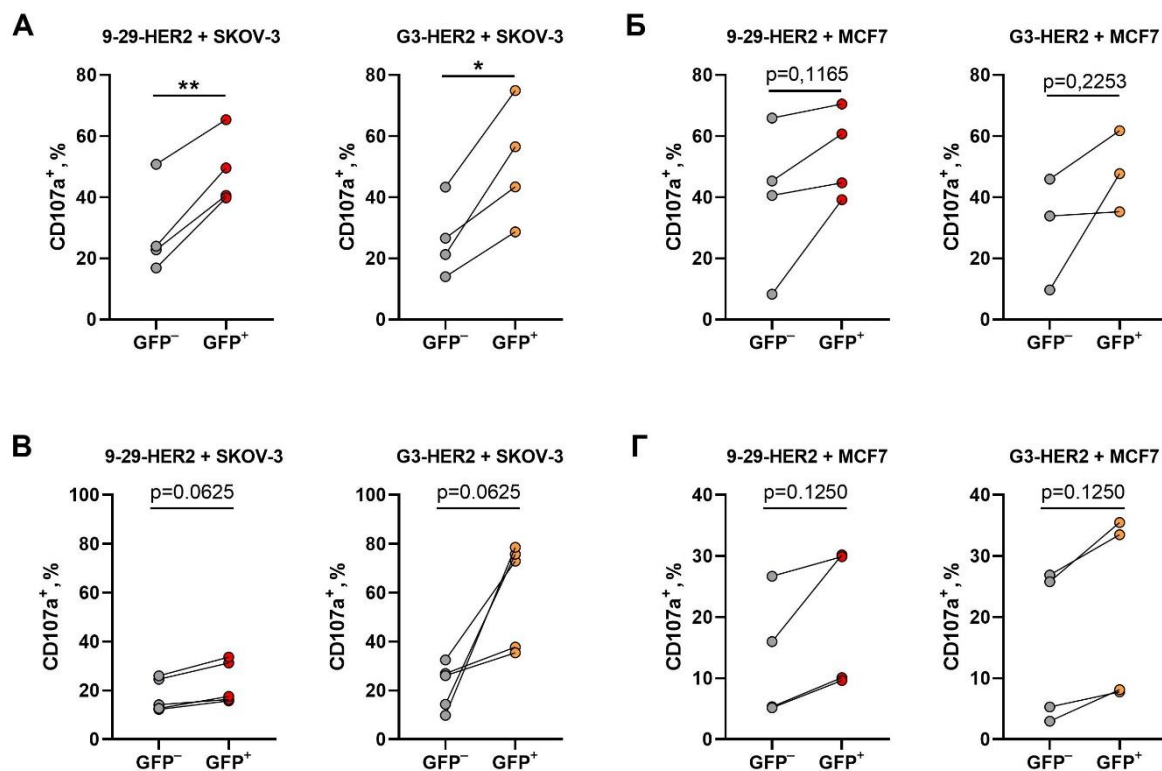


Рисунок 59. Цитотоксическая активность 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клеток против HER2-экспрессирующих мишеней. (А,Б) Доля дегранулировавших $CD107a^+$ НК-клеток трансдуцированных (GFP^+) и нетрансдуцированных (GFP^-) при коинкубации с 2D-культурами SKOV-3 (А) и MCF7 (Б); (В,Г) Доля дегранулировавших $CD107a^+$ НК-клеток трансдуцированных (GFP^+) и нетрансдуцированных (GFP^-) при коинкубации с 3D-культурами SKOV-3 (В) и MCF7 (Г). Статистическая обработка проводилась посредством непараметрического теста Вилкоксона.

3.6.4. HER2-CAR-NK-клетки с антигенраспознающим доменом G3 обладают более выраженной цитотоксичностью

На основании полученных выше данных мы провели сравнение интенсивности цитотоксического воздействия и активации HER2-CAR-NK-клеток с различными антиген-распознающими доменами. G3-HER2-CAR-NK-клетки по сравнению с 9-29-HER2-CAR-NK-клетками обладали более выраженной литической активностью в отношении 2D-культур MCF7, та же тенденция наблюдалась при коинкубации НК-клеток с культурами SKOV-3 (Рис. 60А). Различий между 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клетками по цитотоксическому воздействию на $HER2^+$ 3D-культуры выявлено не было (Рис. 60Б). Также HER2-CAR-NK-клетки с различными антиген-распознающими доменами не различались по дегрануляционной активности в присутствии $HER2^+$ 2D-культур (Рис. 60В). Однако

наблюдалась тенденция к более выраженному снижению внутриклеточного содержания гранзима В в ответ на коинкубацию со сфероидными культурами SKOV-3 и MCF7 в пуле G3-HER2-CAR-NK-клеток по сравнению с 9-29-HER2-CAR-NK-клетками (Рис. 60Г).

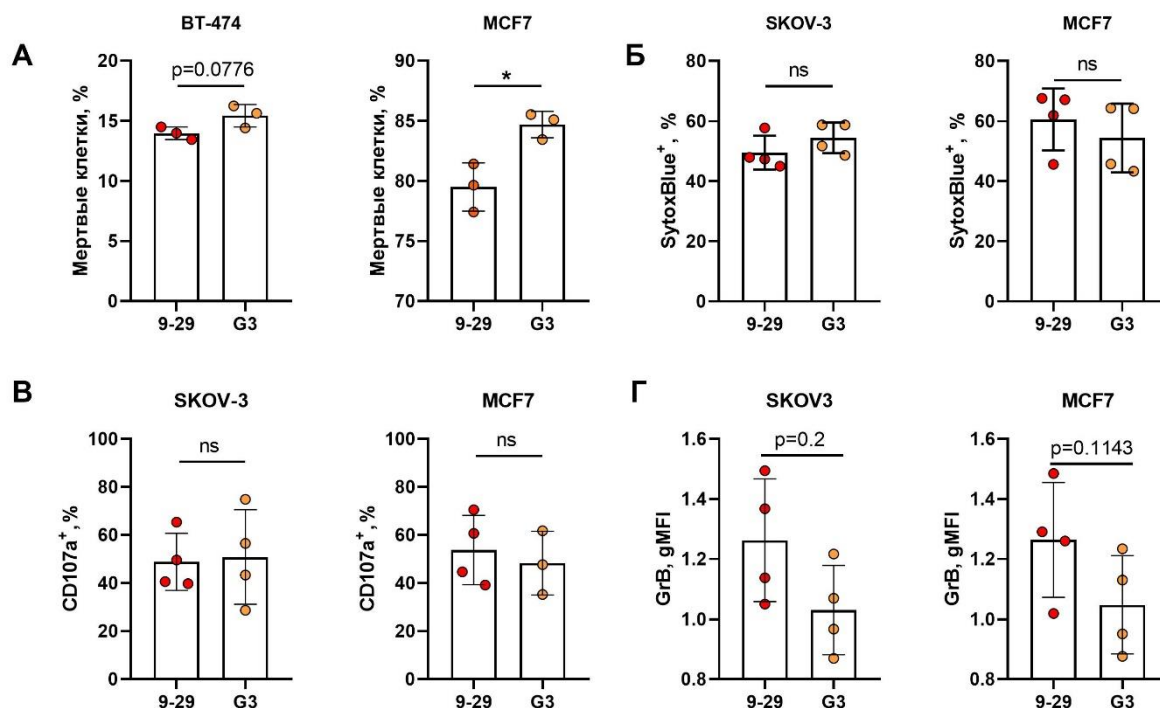


Рисунок 60. Сравнение цитотоксической эффективности 9-29 и G3-HER2-CAR-NK-клеток в отношении HER2-экспрессирующих мишеней. (А) Доля лизированных мертвых клеток в 2D-культурах BT-474 (HER2^{high}) и MCF7 (HER2^{low}) при коинкубации с 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клетками; (Б) Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в 3D-культурах SKOV-3 (HER2^{high}) и MCF7 (HER2^{low}) при коинкубации с 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клетками; (В) Доля дегранулировавших 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клеток в ответ на коинкубацию с 2D-культурами клеток SKOV-3 (HER2^{high}) и MCF7 (HER2^{low}); (Г) Уровень внутриклеточной экспрессии GrB в 9-29- и G3-HER2-CAR-NK-клетках при коинкубации с 3D-культурами клеток SKOV-3 (HER2^{high}) и MCF7 (HER2^{low}). Статистическая обработка выполнена посредством непараметрического теста Манна-Уитни.

Таким образом, мы получили HER2-направленные CAR-NK-клетки и подтвердили их цитотоксическую активность в отношении HER2-экспрессирующих опухолевых культур, как 2D-культур, так и трехмерных агрегатов клеток. Были выявлены признаки высокой HER2-направленной цитотоксичности HER2-CAR-NK-клеток с антигенраспознающим доменом G3,

направленным на IV домен HER2. Наиболее выражен этот эффект был в отношении клеток с низкой экспрессией HER2 (MCF7).

3.6.5. NKG2C-позитивные NK-клетки обладают более высокой чувствительностью к ретровирусной трансдукции по сравнению с NKG2C-негативными

В предыдущих главах мы показали, что NK-клетки, коэкспрессирующие KIR2DL2/3 и NKG2C, обладают повышенной цитотоксической активностью в отношении HLA-E-экспрессирующих опухолевых линий SKOV-3 и MCF7. Экспрессия HLA-E свойственна множеству опухолей, в том числе HER2-позитивных. Распознавание по оси NKG2C-HLA-E в комбинации с CAR-опосредованным распознаванием может приводить к усиленной активации NK-клеточных эффекторов и потенциально приводить к повышению эффективности NK-клеточной терапии.

Чтобы оценить перспективность создания HER2-CAR-эффекторов на основе субпопуляций NK-клеток, в первую очередь мы исследовали чувствительность NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C к ретровирусной трансдукции. Поскольку NK-клетки, модифицированные рецептором G3-HER2-CAR, демонстрировали более выраженную HER2-направленную цитотоксическую активность (Рис. 60), именно конструкция G3-HER2-CAR была выбрана для трансдукции различных субпопуляций NK-клеток. Для последующих экспериментов были получены NK-клетки HCMV-серопозитивного индивида с высокой долей NKG2C⁺ NK-клеток (14%). В качестве ингибирующего рецептора KIR для последующей сортировки был выбран рецептор KIR2DL2/3 (далее - KIR), не способный распознавать HLA-C2, экспонированные на поверхности будущих клеток-мишеней SKOV-3. Согласно данным генотипирования, клетки индивида обладали генотипом HLA-C1/C2, что позволяет предположить, что KIR2DL2/3⁺ NK-клетки, полученные из его крови, прошли лицензирование и обладают высоким цитотоксическим потенциалом. Процентное содержание субпопуляций с различной экспрессией соответствовало ранее полученным результатам (Рис. 12): наиболее многочисленной была субпопуляция наименее дифференцированных клеток KIR⁻NKG2C⁻, наименьшей – популяций клеток, ко-экспрессирующих KIR и NKG2C (Рис. 61A). Посредством клеточной сортировки NK-клетки были разделены на 4 субпопуляции: KIR⁻NKG2C⁻, KIR⁻NKG2C⁺, KIR⁺NKG2C⁻ и KIR⁺NKG2C⁺. Клетки активировались *in vitro* при стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21, и через 7 дней культивирования подвергались трансдукции вирусными частицами, несущими конструкцию рецептора G3-HER2-CAR. Эффективность трансдукции оценивалась по доле NK-клеток, экспрессирующих на своей поверхности с-Мус, один из внеклеточных доменов рецептора HER2-CAR. В

культурах NKG2C-позитивных НК-клеток, по сравнению с NKG2C-негативными наблюдалась большая доля клеток с-Мус⁺, несущих рецептор HER2-CAR (Рис. 61Б). Таким образом, NKG2C-экспрессирующие НК-клетки демонстрировали большую чувствительность к ретровирусной трансдукции.

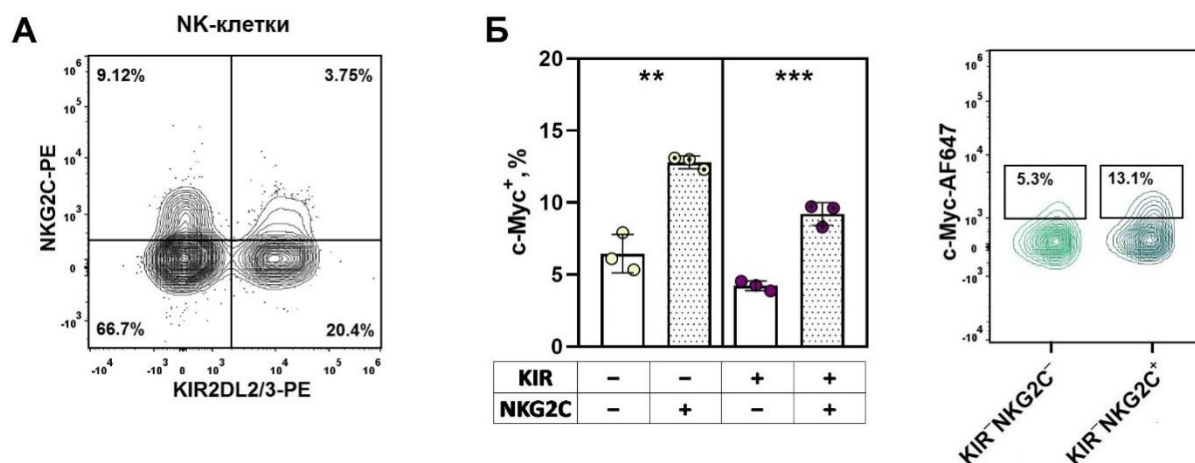


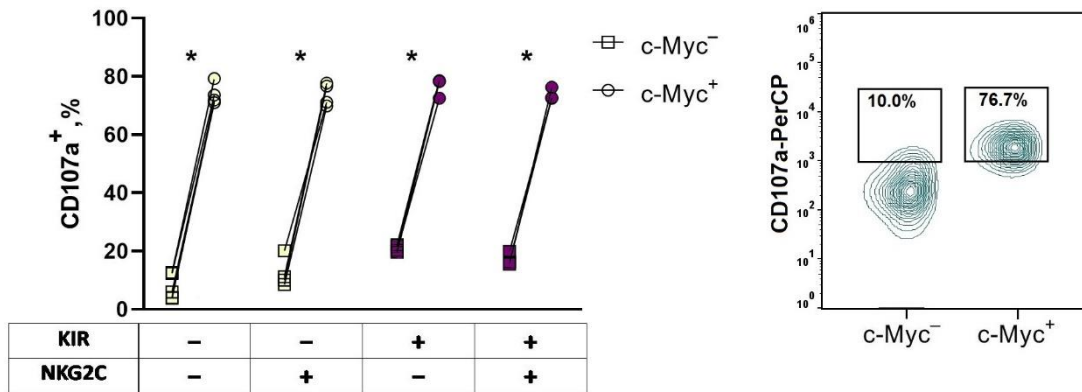
Рисунок 61. Эффективность трансдукции НК-клеток с различной экспрессией KIR2DL2/3 и NKG2C. (А) Распределение субпопуляций с различной экспрессией KIR и NKG2C в пуле НК-клеток индивида перед клеточной сортировкой; (Б) Эффективность трансдукции НК-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C, справа представлены репрезентативные цитометрические данные, отражающие экспрессию с-Мус на поверхности KIR-негативных НК-клеток с различной экспрессией NKG2C после процедуры трансдукции. Данные представлены в виде среднее±SD, статистический анализ проведен посредством t-теста Стьюдента.

3.6.6. HER2-CAR-NK-клетки, полученные на основе NKG2C-позитивных НК-клеток, отличаются повышенной цитотоксичностью в отношении HER2⁺ опухолевых сфероидов

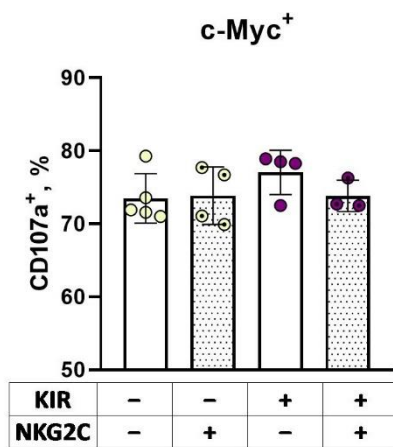
Далее мы оценили цитотоксическую активность культур НК-клеток после трансдукции в них HER2-CAR. НК-клетки с различной экспрессией KIR и NKG2C инкубировали со сфероидами SKOV-3 в течение суток. Цитотоксический потенциал и активацию эффекторов оценивали по доле дегранулировавших CD107a⁺ НК-клеток, а также по доле нежизнеспособных клеток SytoxBlue⁺ в сфероидных культурах SKOV-3 после коинкубации эффекторов с мишенями. Во всех субпопуляциях наблюдалось увеличение доли клеток CD107a⁺ во фракции с-Мус⁺, несущей рецептор CAR, более чем в 4 раза по сравнению с немодифицированными клетками с-Мус⁻ (Рис. 62А). При этом не наблюдалось различий между субпопуляциями НК-клеток по доле дегранулировавших клеток в пуле с-Мус⁺ (Рис. 62Б). Несмотря на это, в сфероидах SKOV-3 после коинкубации с CAR-эффекторами KIR⁺NKG2C⁺ наблюдалась большая доля

нежизнеспособных клеток SytoxBlue⁺, чем при коинкубации с NKG2C-негативными клетками, экспрессирующими KIR (Рис. 62В).

А



Б



В

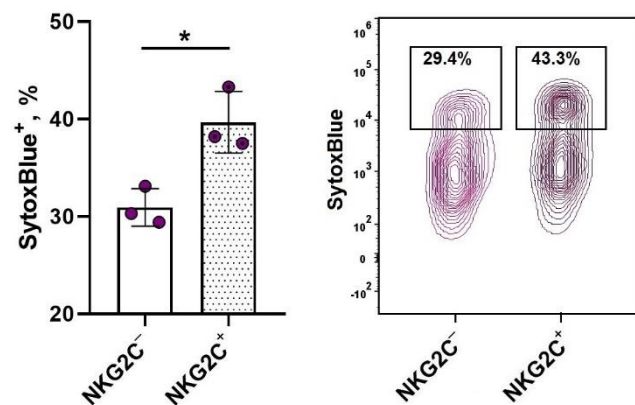


Рисунок 62. HER2-направленная цитотоксическая активность NK-клеток с различной экспрессией KIR2DL2/3 и NKG2C, трансдуцированных геном HER2-CAR. (А) Доля дегранулировавших CD107a⁺ NK-клеток нетрансдуцированных (с-Myc⁻) и трансдуцированных (с-Myc⁺) в субпопуляциях с различной экспрессией KIR и NKG2C при коинкубации со сфероидом SKOV-3, справа представлены репрезентативные данные для субпопуляции KIR⁻ NKG2C⁺; (Б) Доля дегранулировавших CD107a⁺ NK-клеток в пуле трансдуцированных с-Myc⁺ клеток в субпопуляциях с различной экспрессией KIR и NKG2C при коинкубации со сфероидом SKOV-3; (В) Доля нежизнеспособных SytoxBlue⁺ клеток в сфероидах SKOV-3 после коинкубации с KIR⁺ NKG2C^{+/-} NK-клетками, трансдуцированными геном HER2-CAR, справа представлены репрезентативные цитометрические данные. Данные графиков представлены в виде среднее_±SD, статистическая обработка проводилась посредством непараметрических тестов Вилкоксона (А), Краскела-Уоллиса (Б), либо параметрического t-теста Стьюдента (В).

Вооружение эффекторов опухоль-направленными химерными рецепторами – один из многообещающих подходов к повышению успешности клеточной терапии. Мы получили две конструкции, несущие последовательности химерных антигенных рецепторов со специфичностью к I и IV доменам опухоль-ассоциированного маркера HER2 (9-29-HER2-CAR и G3-HER2-CAR соответственно). NK-клетки были успешно модифицированы этими конструкциями, была подтверждена литическая и дегрануляционная активность полученных HER2-CAR-NK-клеток против HER2-экспрессирующих клеток в 2D-культурах, те же тенденции выявлены против 3D-культур. Клетки G3-HER2-CAR-NK, способные специфически распознавать IV субдомен HER2, обладали повышенной цитотоксической активностью в отношении клеток MCF7, что подчеркивает их терапевтический потенциал в отношении клеток с низкой экспрессией HER2. Также нами был изучен потенциал применения NK-клеток с различной экспрессией KIR и NKG2C в качестве основы для создания HER2-CAR-направленных эффекторов. NKG2C-позитивные NK-клетки по сравнению с NKG2C-негативными обладали большей чувствительностью к ретровирусной трансдукции, а также HER2-CAR-NK-клетки на их основе проявляли более выраженную цитотоксическую активность в отношении сфероидов HER2-экспрессирующих опухолевых сфероидов. Таким образом, мы показали, что NKG2C⁺ NK-клетки являются перспективной основой для создания противораковых CAR-эффекторов. Полученные результаты подчеркивают важность разработки подходов к накоплению NKG2C-позитивных NK-клеток, в том числе клеток с адаптивными свойствами.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Оси «рецептор-лиганд», обуславливающие активацию и противоопухолевый цитотоксический ответ НК-клеток различных стадий цитотоксической зрелости, направленный на опухолевые сфероиды

В настоящее время активно разрабатываются подходы к терапии солидных опухолей на основе НК-клеток, как НК-клеток периферической крови аутологичной или аллогенной природы, так и продукты на основе клеточной линии NK-92. Эти эффекторы обладают рядом преимуществ и недостатков, а их терапевтический эффект может зависеть от типа опухоли. Основным преимуществом стабильной клеточной линии NK-92 является неограниченный пролиферативный потенциал, что позволяет успешно накапливать клетки *in vitro* в необходимых количествах, в то время как экспансия и активация периферических НК-клеток крови *in vitro* по-прежнему остаются сложной задачей. В свою очередь, периферические НК-клетки отличаются высокой фенотипической и функциональной гетерогенностью и содержат множество субпопуляций, которые различаются по стадии дифференцировки, «лицензированию» и экспрессии активирующих и ингибирующих рецепторов, что может улучшить цитотоксический ответ на различные опухоли. Хотя клеточная линия NK-92 обладает сильным литическим потенциалом, значительно более высокая экспрессия Eomes в этих клетках по сравнению с НК-клетками CD56^{dim} периферической крови позволяет отнести клетки NK-92 к фенотипу, подобному CD56^{bright} [223]. Прямое сравнение цитотоксических эффекторов этих клеток в эксперименте может в конечном итоге дать новое понимание того, какие из этих клеточных вариантов могут стать основой для получения оптимального терапевтического продукта.

В первой главе данной работы мы исследовали чувствительность сфероидных культур различных опухолевых линий к цитотоксическому действию клеток NK-92 и активированных НК-клеток периферической крови. Используемая в нашей работе 3D-модель позволяет получать множество отдельных опухолевых сфероидов схожего размера, используя агарозные формы, и таким образом анализировать силу НК-клеточной реакции в одинаковых условиях. В качестве основы для создания сфероидов были использованы три HER2-позитивные опухолевые линии: SKOV-3, BT-474 и MCF7. Эти клетки обладали различной восприимчивостью к цитотоксическому воздействию НК-клеток, что может быть обусловлено как растворимыми факторами, которые выделяют НК-клетки, так и контактным взаимодействием с клетками-эффекторами.

На нашей модели мы показали, что клетки линии NK-92 уступают периферическим NK-клеткам в продукции провоспалительных цитокинов TNF, GM-CSF, IFN γ при коинкубации со сфероидом SKOV-3, что может быть свидетельством активации NK-клеток. При этом ни BT-474, ни MCF7 не индуцировали повышенной продукции этих цитокинов ни одним из типов эффекторов.

Растворимые факторы, которые продуцируются клетками иммунной системы, способны индуцировать гибель опухолевых клеток. В частности, известно, что TNF вызывает апоптоз в клетках MCF7 [224], в то время как SKOV-3 и BT-474 устойчивы к воздействию TNF [225]. Более того, TNF способствует созданию провоспалительного микроокружения и благоприятствует активации и дегрануляции зрелых цитотоксических NK-клеток. В то же время роль цитокина GM-CSF в развитии противоопухолевого иммунного ответа неоднозначна. В исследованиях показано, что GM-CSF может оказывать как ингибирующее действие на рост опухоли и метастазирование, так и стимулирующее действие, приводящее к накоплению опухолевых клеток [226]. По-видимому, первичные NK-клетки, но не клетки NK-92, запрограммированы на продукцию GM-CSF после взаимодействия с опухолевыми клетками для привлечения других иммунных клеток *in vivo*.

Одним из наиболее важных цитокинов в контексте изучения противоопухолевого NK-клеточного ответа является IFN γ . Продукция IFN γ важна в ходе иммунного ответа на вирусное или бактериальное заражение, поскольку способствует апоптозу и цитолизу опухолевых клеток [227]. Важно также отметить, что воздействие IFN γ может приводить к повышению экспрессии HLA-E и, как следствие, ингибированию NK-клеточного цитотоксического ответа по оси HLA-E-NKG2A [228]. Многие солидные и гематологические опухоли используют этот механизм для избегания иммунного надзора. Для преодоления ингибирования NKG2A⁺ NK-клеток применяются различные подходы – от блокирующих антител к NKG2A и HLA-E до генного редактирования NK-клеток и нокаута гена, кодирующего NKG2A. Также одним из подходов может стать применение в терапии адаптивноподобных клеток когорты NK3, экспрессирующих активирующий рецептор к HLA-E – NKG2C.

Активация NK-клеток осуществляется при распознавании опухолевых клеток посредством активирующих и ингибирующих рецепторов, взаимодействующих с классическими и неклассическими молекулами МНС класса I, а также со стресс-ассоциированными лигандами. Популяция NK-клеток отличается широким фенотипическим и функциональным разнообразием, которое обусловлено различной экспрессией этих рецепторов. Широкий спектр дифференциально экспрессируемых генов помогает выделить три подтипа (кластера) NK-клеток, обладающих различным противоопухолевым потенциалом: NK1, NK2 и NK3[9].

На примере трех HER2-экспрессирующих опухолевых линий мы проанализировали вовлеченность различных осей «рецептор-лиганд» в цитотоксическую реакцию НК-клеток против клеток опухоли. Были выбраны активирующие рецепторы, экспрессия которых характерна для каждой из трех когорт: повышенная экспрессия NKG2D наблюдается на поверхности клеток NK2, экспрессия CX3CR1 характерна для NK1, а NKG2C маркирует когорту адаптивных НК-клеток NK3 [9].

Мы показали, что коинкубация с различными опухолевыми сфероидными клетками оказывает различное влияние на экспрессию рецептора CX3CR1: наиболее выраженное снижение поверхностной экспрессии наблюдалось при коинкубации со сфероидными клетками BT-474 и MCF7, в которых мы наблюдали CX3CL1-экспрессирующую фракцию. Однако CX3CR1 – рецептор не только к мембраносвязанной форме CX3CL1, но и к растворимой, а для хемокиновых рецепторов свойственно снижение уровня экспрессии при связывании с лигандом [229]. Более того, мы не обнаружили различий в поверхностной экспрессии CX3CR1 между фракциями покоящихся и дегранулировавшихся НК-клеток, независимо от типа сфероидных мишеней. Таким образом, ось CX3CR1-CX3CL1, по-видимому, не играет роли в процессе дегрануляции, а экспрессия CX3CR1 может являться маркером активации и миграционного потенциала НК-клеток и опосредованно указывать на их повышенную цитотоксичность [230,231]. Ранее на мышинной модели меланомы [232] и рака легких [233] с дефицитом CX3CR1 была оценена вовлеченность оси CX3CL1-CX3CR1 в противоопухолевый ответ НК-клеток. Результаты этих исследований подтвердили значительный вклад CX3CR1⁺ НК-клеток в элиминацию CX3CL1-экспрессирующих опухолей.

Снижение уровня экспрессии NKG2D в пуле дегранулирующих CD107a⁺ НК-клеток периферической крови наблюдалось при коинкубации со всеми тремя типами сфероидов, что подтверждает активное участие NKG2D⁺ периферических НК-клеток в цитотоксической реакции против этих опухолевых клеток. Этот эффект был более выражен при инкубации рНК-клеток со сфероидными клетками SKOV-3, чем при инкубации со сфероидными клетками BT-474 или MCF-7. Примечательно, что сфероиды SKOV-3 обладали самыми высокими уровнями экспрессии лигандов NKG2D (MICA/B и ULBP). В ряде исследований показано, что интернализация NKG2D необходима для активации киназы ERK, а также секреции цитолитических гранул и IFN γ , что способствует успешному функционированию НК-клеток [220,234]. В экспериментах на животных моделях *in vivo* показано, что ось NKG2D/NKG2DL задействована в элиминации раковых опухолей и играет важную роль в запуске НК-клеточного иммунного ответа [235]. Антиген-распознающую часть рецептора NKG2D также используют при создании опухолевых направленных химерных рецепторов CAR. Эффективность НК-клеток, модифицированных

рецепторов NKG2D-CAR, подтверждена в отношении различных типов злокачественных новообразований, в том числе против гематологических [236] и солидных опухолей, таких как рак легких [237] и колоректальный рак [238].

Мы также показали, что инкубация NK-клеток с опухолевыми мишенями может приводить к изменению экспрессии ингибирующего рецептора Tim-3, который опосредует подавление NK-клеточной цитотоксичности [239]. В частности, NK-клетки, которые инкубировались с мишенями, которые экспрессируют на своей поверхности лиганды Tim-3, обладали сниженной экспрессией Tim-3 по сравнению с NK-клетками, которым лиганды Tim-3 не были представлены опухолевыми клетками. Известно, что экспрессия Tim-3 зависит от активирующих сигналов и может индуцироваться цитокиновой стимуляцией [239]. Недавно было показано, что при стимуляции NK-клеток активирующими сигналами наблюдается снижение экспрессии Tim-3 [240], что может приводить к повышению цитотоксической эффективности NK-клеток.

Многие опухоли избегают иммунного надзора, экспрессируя HLA-E и подавляя реактивность NK-клеток через рецептор NKG2A. Повышенная экспрессия HLA-E в опухолевой ткани может индуцироваться различными путями. В частности, стимуляция IFN γ , произведенным функционально активными NK-клетками, может приводить к повышению экспрессии HLA-E в опухолях и, как следствие, повышенной резистентности этих опухолей к цитотоксическому воздействию. Подобный механизм был продемонстрирован для множественной миеломы, острого миелоидного лейкоза, колоректального рака и рака яичников [228,241,242]. Также известно, что повышенная экспрессия иммуносупрессорного цитокина IL-10 и недостаточная оксигенация тканей опухоли индуцируют тканевую экспрессию неклассической молекулы HLA, HLA-G [243,244]. Лидерная последовательность HLA-G, идентичная одному из пептидов цитомегаловируса, VMAPRTLFL (LFL), способна связываться с пептид-презентирующей щелью молекулы HLA-E и презентироваться на поверхности опухолевых клеток. Поэтому NKG2C-экспрессирующие NK-клетки представляют особый интерес в контексте преодоления контрольной точки NKG2A-HLA-E. Среди изученных нами сфероидов экспрессия HLA-E была свойственна клеткам SKOV-3 и MCF7. При коинкубации с ними наблюдалось снижение экспрессии рецептора NKG2C в дегранулирующей фракции NK-клеток, что свидетельствует о вовлеченности клеток с фенотипом когорты NK3 в противоопухолевый иммунный ответ.

Важно отметить, что NKG2A⁺ NK-клетки при коэкспрессии с NKG2C обладали высокой дегрануляционной активностью в отношении мишеней HLA-E⁺ несмотря на то, что молекула NKG2A считается чекпойнтом. Предположительно, клетки, коэкспрессирующие NKG2A и

NKG2C, обладают особыми свойствами, отличными от клеток, экспрессирующих один из этих рецепторов в отдельности. В частности, недавно было обнаружено, что у ВИЧ-инфицированных «элитных контроллеров» (пациентов, которые демонстрировали низкий уровень виремии в отсутствие антиретровирусной терапии) наблюдается высокое содержание высокофункциональных NK-клеток с фенотипом $\text{NKG2C}^+\text{NKG2A}^+$ [86]. Следовательно, при коэкспрессии с NKG2C ингибирующий рецептор NKG2A может быть маркером особого функционального состояния NK-клеток с адаптивными свойствами. Мы также показали, что среди дегранулирующих в присутствии опухолевых сфероидов NK-клеток наблюдается повышенная доля клеток KIR2DL2/3^+ . Эти клетки обычно представляют собой фракцию зрелых, обученных NK-клеток, склонных к накоплению литических гранул и способных к естественной цитотоксичности [30].

4.2. NK-клетки, коэкспрессирующие ингибирующие рецепторы KIR2DL2/3 и NKG2C:

пролиферативная активность, стабильность фенотипа, ответ на пептид LFL, HLA-E-направленная цитотоксическая активность

NK-клетки, полученные от «супердоноров» с высокой экспрессией KIR и NKG2C проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении гематологических опухолей, в частности, против острого миелоидного лейкоза [11]. Однако экспрессия KIR характерна для NK-клеток высокой степени дифференцировки, которые обладают сниженной чувствительностью к растворимым стимулам *in vitro*, что затрудняет их накопление. В рамках этой работы мы реализовали два подхода к накоплению клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C: разделение этой популяции на фракции менее дифференцированных и более дифференцированных клеток (CD57^- и CD57^+ , соответственно) и презентацию пептида HCMV в составе HLA-E для стимуляции роста этих клеток. Мы показали, что NK-клетки $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ из фракции менее дифференцированных клеток CD57^- обладают повышенной пролиферативной активностью и высокой стабильностью фенотипа. Известно, что при инфекции HCMV наблюдается клональная или поликлональная экспансия клеток NKG2C^+ , коэкспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR, способные распознавать собственные молекулы HLA-I [245]. Реактивация NK-клеток в ответ на HCMV после аллогенной трансплантации костного мозга также сопровождается поликлональной экспансией клеток, коэкспрессирующих KIR и NKG2C. Подобное активное накопление NK-клеток $\text{KIR}^+\text{NKG2C}^+$ может объясняться стабильной коэкспрессией рецепторов KIR и NKG2C даже в ходе

интенсивной экспансии. Примечательно, что клетки KIR^+NKG2C^+ отличались от KIR^- негативных высокой экспрессией маркера активации HLA-DR, что характерно для NK-клеток с адаптивным фенотипом [23,222,246]. Экспрессия HLA-DR позволяет NK-клеткам вовлекать в иммунный ответ адаптивную ветвь иммунной системы, представляя Т-клеткам пептиды HCMV в составе HLA-DR [136,247]. Однако вместе с тем, мы наблюдали в культурах KIR^+NKG2C^+ более выраженную экспрессию CD57 *de novo*. CD57 – маркер высокой степени дифференцировки, экспрессия которого ассоциирована со сниженным пролиферативным ответом на растворимые стимулы.

В ряде работ показано, что презентация пептида VMAPRTLFL (LFL) в составе HLA-E на поверхности фидерных клеток приводит к накоплению клеток $NKG2C^+$ *in vitro* [19,216], в том числе клеток, экспрессирующих ингибирующие рецепторы KIR [217]. На основе фидерных клеток K562-mbIL21, которые уже зарекомендовали себя как эффективный инструмент для накопления NK-клеток [21], мы методом генетической модификации посредством ретровирусной трансдукции получили фидерные клетки, экспрессирующие HLA-E. Мы показали, что презентация пептида HCMV в контексте HLA-E *in vitro* приводит к накоплению KIR^+NKG2C^+ NK-клеток в культурах. Таким образом, посредством такого подхода к стимуляции возможно имитировать *in vitro* физиологические активирующие сигналы и накапливать NK-клетки с желаемым фенотипом.

Мы выявили ряд ассоциаций между фенотипом NK-клеток *ex vivo*, интенсивностью LFL-опосредованной пролиферации и фенотипическими изменениями в пуле NK-клеток. Более выраженная экспансия bulk-культур NK-клеток, которым был презентируем пептид LFL, был связан с высокой долей активированных $HLA-DR^+$ и $HLA-DR^+CD56^{bright}$ клеток и низким содержанием KIR^+ клеток *ex vivo*. Для KIR^+ NK-клеток характерна высокая степень дифференцировки и сниженная экспрессия цитокиновых рецепторов. В частности, для более зрелых NK-клеток свойственна экспрессия IL-2R β , субъединицу рецептора IL-2 с более низкой аффинностью по сравнению с IL-2R α [142]. С этим может быть связана менее интенсивная пролиферация NK-клеток с большой долей клеток KIR^+ . В то же время известно, что NK-клетки субпопуляции $CD56^{bright}$, несущие на своей поверхности HLA-DR, отличаются высокой экспрессией генов, связанных с пролиферативной активностью и устойчивостью к апоптозу (*BIRC5*), а также большей митохондриальной массой по сравнению с $HLA-DR^-$ негативными клетками [222]. Это объясняет более выраженную пролиферацию *in vitro* NK-клеток, полученных от доноров с высокой долей клеток $HLA-DR^+CD56^{bright}$.

Накопление NK-клеток с фенотипом KIR^+NKG2C^+ может происходить двумя способами: посредством экспансии KIR^+NKG2C^+ NK-клеток или при экспрессии KIR и NKG2C *de novo* в изначально негативных по этим маркерам популяциях.

Мы детектировали экспрессию NKG2C *de novo* в субпопуляции $CD57^-KIR^+NKG2C^-$, при этом более высокая доля $NKG2C^+$ клеток была ассоциирована с высоким содержанием активированных клеток $HLA-DR^+$ *ex vivo*. В NK-клетках экспрессия HLA-DR тесно связана с продукцией $IFN\gamma$, как паракринной, так и аутокринной [222]. Базальный уровень HLA-E, в свою очередь, характерен для здоровых клеток организма, в том числе B-, T- и NK-клеток [248], и $IFN\gamma$ способен индуцировать повышенную экспрессию HLA-E [249,250]. При появлении рецептора NKG2C *de novo* на поверхности NK-клетки в условиях высокой экспрессии HLA-E на окружающих клетках обеспечивается повышенная avidность связывания NKG2C-HLA-E. Это может приводить к повышенной внутриклеточной стимуляции $NKG2C^+$ NK-клетки и ее интенсивной пролиферации. В таком случае важно отметить, что в физиологических условиях HLA-E обычно связывает лидерные последовательности HLA класса I (ЛП). Комплексы HLA-E+ЛП связываются с NKG2C с меньшей аффинностью по сравнению с комплексом HLA-E+LFL и, как следствие, уступают LFL в размере стимулирующего воздействия [216]. Таким образом, экспрессия HLA-E и HLA-DR индуцируется одним стимулом – $IFN\gamma$. Увеличение доли $HLA-DR^+$ NK-клеток *ex vivo* может быть маркером воздействия $IFN\gamma$, который также способствует повышению экспрессии HLA-E *in vitro* и может индуцировать пролиферативную селекцию клеток, экспрессирующих NKG2C *de novo* [250]. Однако механизмы, лежащие в основе индукции экспрессии NKG2C, все еще остаются не проясненными.

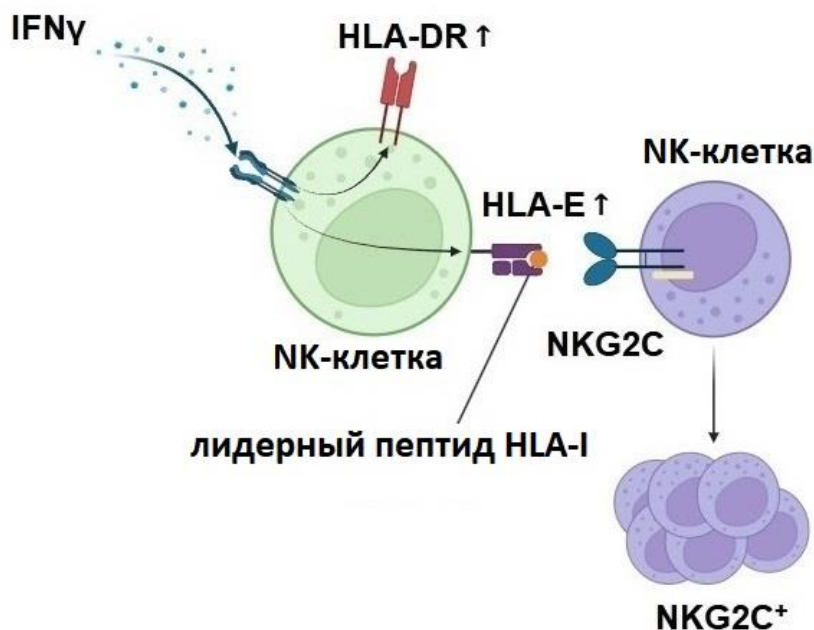


Рисунок 63. Предполагаемый механизм экспансии NKG2C⁺ NK-клеток при стимуляции IFN γ .

В культурах клеток CD57⁻KIR⁺NKG2C⁻, которым был презентирован пептид LFL, наблюдалась повышенная цитокин-зависимая экспрессия IFN γ . Эти культуры не отличались от контрольных культур более высокой экспрессией NKG2C, однако презентация пептида HCMV могла индуцировать модификацию локуса *IFNG*, свойственную адаптивному состоянию NK-клеток [251]. Та же тенденция наблюдалась в популяции NK-клеток CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺, но не в популяции более дифференцированных клеток CD57⁺KIR⁺. Эти различия в ответе могут быть обусловлены низкой экспрессией рецепторов к цитокинам IL-12 и IL-18, характерной для более зрелых клеток CD57⁺ [9].

Одной из важных задач этой работы стала оценка влияния презентации пептида HCMV (LFL) на HLA-E-направленную цитотоксическую активность KIR⁺NKG2C⁺ NK-клеток. NK-клетки более поздней стадии зрелости с фенотипом CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺ отличались большей цитотоксичностью в отношении MCF7, в то время как клетки CD57⁻KIR⁺NKG2C⁺ с большим успехом элиминировали сфероиды SKOV3. Это может быть обусловлено участием в цитотоксическом ответе и формировании иммунологических синапсов других активирующих рецепторов, помимо NKG2C. В ходе этой работы мы продемонстрировали, что клетки SKOV-3 индуцируют активацию NKG2D-экспрессирующих клеток, менее дифференцированных, тогда как MCF7 активировали NK-клетки с более зрелым фенотипом, обладающие экспрессией CX3CR1 [9].

Презентация пептида LFL *in vitro* фидерными клетками приводила к накоплению NK-клеток с адаптивным фенотипом. Однако есть дополнительные подходы к усилению LFL-

опосредованной стимуляции, в частности, дополнительная стимуляция провоспалительными интерлейкинами IL-12 и IL-18 [19,20]. В ряде исследований было показано, что стимуляция IL-12 способствует временной экспрессии NKG2A в NKG2C⁺ NK-клетках [20,252] и приводит к увеличению доли NKG2A⁺ клеток в кровотоке [253]. В ходе выполнения этой работы мы выявили связь между высоким содержанием NKG2A⁺ NK-клеток *ex vivo* и более выраженной LFL-опосредованной экспансией адаптивных клеток CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺, а также повышенным цитокин-опосредованным функциональным ответом KIR⁺NKG2C⁺ NK-клеток. CD57-негативные клетки обладали повышенной продукцией IFN γ , тогда как клетки CD57⁺ демонстрировали более выраженную дегрануляционную активность в ответ на инкубацию с K562. Таким образом, повышенный уровень NKG2A-позитивных клеток может быть связан с выраженной чувствительностью NK-клеток к стимуляции цитокинами и, как следствие, с более выраженной пролиферацией *in vitro*. Поскольку NKG2A является молекулой-чекпойнтом, такие фенотипические свойства могут повлиять на цитотоксический потенциал NK-клеток. Ранее мы не наблюдали подавления дегрануляционной активности клеток NKG2C⁺NKG2A⁺ при коинкубации с HLA-E⁺ мишенями, поэтому мы предположили, что при коэкспрессии с NKG2C ингибирующий рецептор NKG2A может проявлять свойства, отличные от чекпойнта, и провели ряд экспериментов для изучения свойств этой субпопуляции.

4.3. NK-клетки, коэкспрессирующие NKG2A и NKG2C: пролиферативная активность, сходство с адаптивными NK-клетками, ответ на пептид LFL

Ранее было показано, что субпопуляция NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток представлена в периферической крови небольшой фракцией [254], хотя в некоторых условиях *in vivo* или *in vitro* ее размер может увеличиваться [86,255,256]. У некоторых людей наблюдается экспансия NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клеток в периферической крови. В частности, был описан случай, когда NK-клетки с таким фенотипом составляли до 95% всех NK-клеток, при этом не было выявлено признаков лимфомы, аутоиммунного заболевания или острой инфекции [255]. Мы также охарактеризовали популяцию NKG2C⁺NKG2A⁺ как преимущественно малочисленную, поскольку в среднем эти клетки составляли около 3% NK-клеток в CD57-негативной фракции, и несколько большую долю (около 5%) во фракции более зрелых клеток CD57⁺ у HCMV-серопозитивных индивидов.

Предполагая, что клетки NKG2C⁺NKG2A⁺ могут обладать адаптивными свойствами, мы провели исследование транскриптома NKG2C⁺ популяций NK-клеток с различной экспрессией NKG2A и CD57. Между субпопуляциями NKG2C⁺NKG2A⁺ и NKG2C⁺NKG2A⁻

мы не выявили различий в экспрессии генов, ассоциированных с адаптивным состоянием, таких как, *PLZF*, *IKZF2*, *FCERIG*, *SYK*, *CD2*, *EAT2*, *NCR3* и *NCR1*. В субпопуляции $CD57^+NKG2A^+NKG2C^+$ по сравнению с аналогичной субпопуляцией $NKG2A^-$ мы детектировали повышенную CD16-индуцированную продукцию $IFN\gamma$. По уровню CD16-опосредованной дегрануляции клетки $CD57^+NKG2A^+NKG2C^+$ не уступали клеткам с адаптивным фенотипом. Эти наблюдения свидетельствуют о наличии адаптивных свойств у клеток, коэкспрессирующих $NKG2C$ и $NKG2A$.

Интересно, что $NKG2C^+NKG2A^+$ NK-клетки во фракции $CD56^{dim}CD57^-$ обладали более низкой экспрессией адаптерной цепи $Fc\epsilon R1\gamma$ и более высокой экспрессией $CD44$ по сравнению с адаптивными клетками. Эти свойства могут быть маркерами как менее зрелого состояния, так и маркерами NK-клеток со свойствами клеток памяти [9,23,257]. Однако клетки $CD57^-NKG2C^+NKG2A^+$ обладали также сниженной CD16-опосредованной дегрануляцией, что согласуется с пониженной экспрессией *FCG3A* и скорее свидетельствует в пользу меньшей степени дифференцированности этих клеток, чем подтверждает сходство с адаптивными NK-клетками.

Вместе с тем, клетки $NKG2C^+NKG2A^+$, обладали рядом свойств, отличных от клеток адаптивной группы. NK-клетки $NKG2C^+NKG2A^+$, как и клетки $NKG2C^+NKG2A^-$, обладают свойствами кластера адаптивных клеток NK3, при этом сочетая их с характеристиками кластера NK2. Например, для этих клеток характерна повышенная экспрессия *GZMK*, *KLRC1*, *CD44*, *SELL*, *IL7R* и *CXCR3*, что свойственно менее дифференцированным клеткам. Мы показали, что клетки $NKG2C^+NKG2A^+$ обладают повышенной экспрессией генов, ассоциированных с активацией и презентацией антигенов, таких как HLA-DR. Высокая экспрессия HLA-DR характерна для HCMV-специфичных адаптивных клеток с фенотипом $CD57^+NKG2C^+$ [246,247,258] и может быть связана с повышенной митохондриальной активностью [222]. Вне зависимости от экспрессии $CD57$, NK-клетки $NKG2C^+NKG2A^+$, по сравнению с $NKG2A$ -негативными клетками, обладали меньшим содержанием KIR^+ цитотоксических клеток и более высоким уровнем экспрессии молекулы адгезии $CD62L$, что указывает на их меньшую зрелость и повышенный миграционный потенциал [30,259,260].

Зрелые NK-клетки $NKG2A^+$ и $NKG2A^-$ из фракции $CD57^+NKG2C^+$ в целом не различались по уровню экспрессии рецепторов хемокинов и цитокинов, в то время как транскрипционный профиль NK-клеток $CD57^-NKG2C^+NKG2A^+$ свидетельствовал об усиленном тропизме этих клеток к очагам воспаления за счет повышенной экспрессии *CCR1*, *CCR5* и *CXCR3*.

Таким образом, клетки $NKG2C^+NKG2A^+$ можно охарактеризовать как фракцию с адаптивными характеристиками, притом менее зрелую и обладающую повышенной

миграцией, высокой метаболической активностью и специфическими функциональными особенностями. Это может указывать на значительный противовирусный и противоопухолевый потенциал NK-клеток с фенотипом $CD57^{+/-}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$.

Также мы показали, что для клеток $NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ по сравнению с $NKG2A$ -негативными, характерна более высокая пролиферативная активность при стимуляции $IL-2+K562-mbIL21$. При этом экспансия не приводила к изменению экспрессии большинства генов, связанных с адаптивным состоянием. Однако наблюдалось повышение экспрессии генов рецепторов естественной цитотоксичности (кодирующих $NKp30$, $NKp44$), хемокиновых рецепторов ($CCR1$, $CCR2$, $CCR6$, $CXCR3$), перфорины, гранзима В. После экспансии наблюдалось снижение экспрессии ряда генов, включая *FCGR3A*. Ранее мы показывали, что длительное культивирование *in vitro* приводит к снижению экспрессии $CD16$ в NK-клетках [143].

Также был изучен ответ $NKG2C^{+}$ NK-клеток с различной экспрессией $NKG2A$ и $CD57$ на презентацию им пептида HCMV *in vitro*. Презентация LFL $CD57$ -негативным клеткам не приводила к изменениям в интенсивности пролиферации или функциональной активности, тогда как клетки $CD57$ -позитивных субпопуляций демонстрировали LFL-опосредованные ответы. $NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ NK-клетки некоторых доноров были способны отвечать на презентацию LFL выраженной экспансией, а в масштабах всей выборки обладали повышенной цитокин-зависимой продукцией $IFN\gamma$ при стимуляции $IL-12+IL-18$. Это может быть следствием эпигенетической реорганизации локуса *IFNG*, типичной для адаптивных NK-клеток [251], не характерной для менее зрелых $CD57^{-}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ NK-клеток. Ранее сообщалось, что презентация пептидов в HLA-E может приводить к увеличению экспрессии $IFN\gamma$ в субпопуляции $NKG2C^{+}$ NK-клеток [15,19].

Наконец, мы исследовали экспрессию генов в культурах $CD57^{+}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ NK-клеток, которые были получены при презентации им пептида, и сравнивали с экспрессией генов в аналогичных контрольных культурах. Клетки, которым был презентируем пептид, отличались повышенной экспрессией маркеров высокой стадии дифференцировки, и факторов, увеличивающих выживаемость клеток, по сравнению с контрольными клетками. У обоих изученных доноров наблюдалась интенсивная транскрипция генов, кодирующих ингибирующие рецепторы KIR, а комбинированный анализ показал увеличение числа транскриптов *RGL2*. Экспрессия *RGL* ассоциирована с повышенной пролиферативной активностью опухолевых клеток [261,262] и устойчивостью к апоптозу [263]. Примечательно, что у обоих доноров было выявлено повышенное содержание транскриптов гена *KIR2DL1* при презентации клеткам $CD57^{+}NKG2C^{+}NKG2A^{+}$ пептида LFL. В ряде исследований показано,

что контакт NK-клеток HCMV-серопозитивного индивида с зараженными HCMV мишенями приводит к накоплению NK-клеток с фенотипом KIR2DL1⁺ [264].

Уникальность субпопуляции NK-клеток NKG2C⁺NKG2A⁺ заключается в потенциальной двойственности ее функций. Аффинность связывания NKG2A с HLA-E превышает аффинность связывания NKG2C-HLA-E [87,265]. В некоторых случаях взаимодействие NKG2A с HLA-E/пептидом может привести к смещению баланса сигналов в сторону активации NKG2C⁺ NK-клеток. Баланс сигналов может зависеть от множества факторов, в том числе от плотности экспрессии HLA-E и от представленного в HLA-E пептида. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, мы выявили уникальную субпопуляцию NK-клеток NKG2C⁺NKG2A⁺CD57⁺, которые сочетают в себе признаки адаптивных NK-клеток с признаками более ранних стадий дифференцировки. Чувствительность к растворимым стимулам, высокая экспрессия факторов адгезии, выраженный потенциал к CD16-опосредованному ответу – все эти свойства делают NKG2C⁺NKG2A⁺ NK-клетки интересным объектом исследования в контексте изучения противовирусного и противоопухолевого ответа NK-клеток. Полученные данные обогащают понимание механизмов, лежащих в основе формирования NK-клеточных адаптивных реакций, в том числе в основе антиген-зависимого формирования популяционного состава NK-клеток.

4.4. CAR-NK-клетки с повышенным тропизмом к HER2-экспрессирующим опухолям

В ходе работы нами были получены HER2-направленные CAR-NK-клетки. В качестве антиген-распознающего домена применялись молекулы-миметики антител DARPIn 9-29 и G3. Эти молекулы распознают примембранный домен IV и дистальный домен I молекулы HER2, соответственно, при этом DARPIn G3 обладает более высокой аффинностью связывания и меньшими размерами по сравнению с DARPIn 9-29. В экспериментах на CAR-T-клетках показано, что G3-CAR-T-клетки способствуют более выраженному уменьшению опухоли с высокой экспрессией HER2 *in vivo* в сравнении с 9-29-CAR-T-клетками [266]. Тем не менее, неизвестно, как ведут себя такие CAR-T-клетки в отношении опухолей со сниженной экспрессией HER2, а также в настоящее время не описано получение соответствующих CAR-NK-клеток с рецепторами CAR на основе DARPIn G3 и 9-29. Потенциально CAR-эффекторы с антиген-распознающими доменами 9-29 и G3 могут обладать различной противоопухолевой эффективностью. Доступность сайта связывания, размеры рецепторов и аффинность могут оказывать влияние как на вероятность распознавания, так и на длительность взаимодействия CAR-NK-клетки с опухолевой клеткой. В случае высокой плотности экспрессии антигена

различия HER2-распознающих доменов G3 и 9-29 в молекуле CAR могут не проявляться, однако при низком уровне экспрессии HER2 на опухолевых мишенях могут иметь решающее значение.

Полученные нами HER2-CAR-NK-клетки были способны успешно элиминировать мишени с высокой экспрессией HER2, SKOV-3 и BT-474. Та же тенденция наблюдалась при цитотоксической реакции против MCF7, линии с низкой экспрессией HER2. Мы также показали, что G3-HER2-CAR-NK-клетки обладают более высоким цитотоксическим потенциалом при коинкубации с MCF7, для которых характерна низкая экспрессия HER2. Это может быть связано с более высокой аффинностью связывания DARPIn G3 с мишенью и, как следствие, более продолжительным контактом NK-клетки с клетками MCF7. Известно, что в случае распознавания антигенов Т-клетками посредством рецепторов TCR, плотность экспрессии лигандов TCR определяет тип ответа Т-клеток на стимул [267]. Это может быть лизис мишени, активация пролиферации Т-клеток или продукции цитокинов Т-клетками, при этом для лизиса мишени требуется меньшая плотность молекулы-мишени. На CD20-CAR-T клетках и CAR-T-клетках, специфических к гликопротеину OTS8, показано, что для активации их литической активности достаточно 200 молекул антигена на поверхности клетки-мишени [268,269]. Для активации продукции цитокинов CD20-CAR-T клетками требуется плотность антигена в 10 раз больше. В то же время было показано, что для рецепторов CAR с другой специфичностью могут требоваться более высокие плотности экспрессии антигенов. Также для продукции IL-2 требуется более высокая плотность экспрессии антигена на поверхности опухолевых клеток, чем для продукции IFN γ , как минимум 60 000 молекул на клетку [270]. Подобные механизмы могут реализоваться и в ходе цитотоксического ответа CAR-NK-клеток в отношении опухолевых мишеней. Таким образом, от плотности экспрессии антигена на поверхности опухолевых клеток зависит не только литическая активность клеток-эффекторов, но и их потенциальная регуляторная функция и пролиферативная активность.

Помимо bulk-культур NK-клеток, мы также модифицировали рецептором HER2-CAR NK-клетки субпопуляций с различной экспрессией KIR и NKG2C. Было показано, что NKG2C-позитивные NK-клетки обладают большей чувствительностью к ретровирусной трансдукции, а KIR⁺NKG2C⁺ HER2-CAR-NK-клетки с большей эффективностью элиминируют HER2⁺ SKOV-3 опухолевые сфероиды. Клетки, экспрессирующие KIR, преимущественно относятся к группам NK1 и NK3, которые отличаются высоким содержанием гранзимов и перфорина [9]. Кроме того, наличие активирующего рецептора NKG2C позволяет повысить их цитотоксический потенциал в отношении HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток [271]

[272]. Дополнительная модификация рецепторами CAR, нацеленными на опухоль-специфичный антиген потенциально увеличивает эффективность цитотоксических агентов, ко-экспрессирующих KIR и NKG2C. Таким образом, модификация NK-клеток с фенотипом KIR^+NKG2C^+ приводит к повышению цитотоксического потенциала HER2-направленных эффекторов.

ВЫВОДЫ

1. В модели сфероидов выявлены оси взаимодействия трех опухолевых клеточных линий с НК-клетками, включающие лиганд-рецепторные NKG2D-лиганды/NKG2D, галектин-9/Tim-3 и CX3CL1/CXCR1. Установлено, что NKG2C⁺ НК-клетки принимают участие в распознавании HLA-E-экспрессирующих опухолевых клеток в 3D-культурах.
2. Получены фидерные клетки K562-21E, экспрессирующие HLA-E. Презентация пептида HCMV - VMAPRTLFL (LFL), этими клетками приводит к накоплению НК-клеток с адаптивным фенотипом CD57⁺KIR⁺NKG2C⁺NKG2A⁻ и способствует повышению их цитотоксической активности в отношении HLA-E-экспрессирующих опухолевых сфероидов.
3. НК-клетки CD57⁺KIR2DL2/3⁺NKG2C⁺, которым был презентируем пептид HCMV, обладают повышенной пролиферативной активностью и выраженной HLA-E-направленной цитотоксичностью.
4. Субпопуляция НК-клеток, экспрессирующих как активирующий NKG2C, так и ингибирующий NKG2A рецепторы, распознающие HLA-E, обладает повышенной пролиферативной активностью, сохраняя транскриптомный профиль, ассоциированный с адаптивным состоянием и повышенный потенциал к антитело-зависимой функциональной активности. Высокодифференцированные CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁺ НК-клетки под действием пептида LFL приобретают пептид-специфический транскриптомный профиль и увеличенную способность продуцировать IFN γ .
5. Интенсивная пролиферация НК-клеток *in vitro* в ответ на пептид HCMV связана с высоким уровнем экспрессии NKG2A и HLA-DR и низким уровнем KIR2DL2/3 *ex vivo*. Культуры CD57⁺NKG2C⁺ НК-клеток, экспрессирующие KIR2DL2/3, демонстрируют более выраженную LFL-зависимую экспансию при высокой доле NKG2A и KIR2DL2/3 *ex vivo*. Экспрессия NKG2C *de novo* наиболее выражена в субпопуляциях KIR⁺ НК-клеток и во фракции менее дифференцированных клеток и ассоциирована с высокой долей HLA-DR⁺ клеток *ex vivo*.
6. Получены НК-клетки, модифицированные геном HER2-CAR, обладающие повышенной цитотоксической активностью в отношении HER2-экспрессирующих мишеней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на широкий спектр современных подходов к лечению, солидные опухоли по сей день приводят к летальным исходам. Одним из современных развивающихся подходов к элиминации таких опухолей является таргетная клеточная терапия опухоль-специфичными CAR-NK-клетками. Инфильтрация РМЖ низкодифференцированными NK-клетками CD56^{bright} ассоциирована с негативным прогнозом. В связи с этим, одним из направлений в совершенствовании NK-клеточной терапии является выбор более зрелых клеток CD56^{dim} в качестве основы для создания CAR-NK-эффекторов. Наиболее перспективной когортой с выраженной противораковой цитотоксичностью и высокой продолжительностью жизни в субпопуляции CD56^{dim} являются адаптивные NK-клетки с фенотипом CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺NKG2A⁻. В связи с низкой чувствительностью клеток этой когорты к растворимым стимулам, необходимо внедрение новых подходов к накоплению высокодифференцированных NK-клеток *in vitro*. Одним из таких подходов является стимуляция фидерными клетками K562, презентирующими пептид HCMV в составе лиганда NKG2C - HLA-E. Культивирование NK-клеток при стимуляции K562-HLA-E+пептид приводит к накоплению фракции адаптивноподобных NK-клеток CD57⁺NKG2C⁺ с высоким цитотоксическим потенциалом против гематологических опухолей. Однако неизвестно, будет ли сохранен этот потенциал при применении этих клеток в отношении солидных опухолей, в частности, HER2-экспрессирующих опухолей молочной железы. Также открытым остается вопрос о восприимчивости к такой стимуляции NK-клеток, модифицированных рецептором HER2-CAR. Тем не менее, применение HLA-E-экспрессирующих фидерных клеток для накопления высокотоксичных адаптивно-подобных NK-клеток открывает новые горизонты в вопросе усовершенствования подходов к терапии опухолей молочной железы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выполнение настоящей диссертационной работы стало возможным благодаря помощи и поддержке коллег и наставников. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю и руководителю группы изучения НК-клеток, к.б.н. Е.И. Коваленко, за многогранное научное руководство, ценные дискуссии и постоянную поддержку исследовательских инициатив. Автор глубоко признателен всему коллективу группы за методологическое сопровождение и совместный анализ экспериментальных данных. Искренние слова благодарности адресованы руководителю лаборатории клеточных взаимодействий д.б.н. А.М. Сапожникову и всему лабораторному коллективу за обеспечение продуктивной рабочей среды. За неоценимую помощь в освоении специальных методов автор благодарит к.б.н. М.А. Шевченко (конфокальная микроскопия), а также сотрудников лаборатории — за готовность прийти на помощь при проведении экспериментов, обработке данных и написании статей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CAR (Chimeric Antigen Receptor) – химерный антигенный рецептор.

CEACAM1 (Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1) – молекула клеточной адгезии, связанная с раково-эмбриональным антигеном 1.

EBV (Epstein-Barr Virus) – вирус Эпштейна-Барр.

FBS (Fetal Bovine Serum) – эмбриональная телячья сыворотка.

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

HCMV (Human Cytomegalovirus) – цитомегаловирус человека.

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) – рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа.

HIV (Human Immunodeficiency Virus) – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).

HLA (Human Leukocyte Antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген (главный комплекс гистосовместимости человека).

IFN γ (Interferon-gamma) – интерферон-гамма.

IL (Interleukin) – интерлейкин.

ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) – иммунорецепторный тирозин-содержащий активационный мотив.

ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) – иммунорецепторный тирозин-содержащий ингибиторный мотив.

KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor) – киллерный иммуноглобулиноподобный рецептор.

LFL (VMAPRTLFL) – синтетический нонапептид, соответствующий лидерной последовательности белка UL40 цитомегаловируса.

LLL (VMAPRTLFL) – синтетический нонапептид, соответствующий лидерной последовательности молекул HLA класса I.

MICA/B (MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A/B) – полипептидные последовательности A и B, родственные молекулам MHC класса I.

mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) – мишень рапамицина млекопитающих, комплекс 1 (ключевой регулятор клеточного метаболизма и роста).

NADH, NAD⁺ (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная и окисленная формы соответственно).

NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) – молекула адгезии нервных клеток (также известна как маркер CD56).

NCR (Natural Cytotoxicity Receptor) – рецептор естественной цитотоксичности.

NOD-SCID-IL2gnull / NSG (Non-obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency / IL-2 receptor gamma chain null) – линия глубоко иммунодефицитных лабораторных мышей, лишенных T-, B- и NK-клеток.

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток.

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) – коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома-2.

SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1) – фактор, продуцируемый стромальными клетками, 1 (также известен как хемокин CXCL12).

TCR (T-Cell Receptor) – T-клеточный рецептор.

TGFb / TGF- β (Transforming Growth Factor beta) – трансформирующий ростовой фактор-бета.

TME (Tumor Microenvironment) – опухолевое микроокружение.

TNF (Tumor Necrosis Factor) – фактор некроза опухоли.

ULBP (UL16-Binding Protein) – UL16-связывающий белок (лиганд для активирующего рецептора NKG2D).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmed N. и др. HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified Virus-Specific T Cells for Progressive Glioblastoma: A Phase 1 Dose-Escalation Trial // *JAMA Oncol.* 2017. Т. 3, № 8. С. 1094–1101.
2. Xia W. и др. Engineering a HER2-CAR-NK Cell Secreting Soluble Programmed Cell Death Protein with Superior Antitumor Efficacy // *Int J Mol Sci.* 2023. Т. 24, № 7. С. 6843.
3. Schönfeld K. и др. Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor // *Mol Ther.* 2015. Т. 23, № 2. С. 330–338.
4. Ruggeri L. и др. Exploitation of alloreactive NK cells in adoptive immunotherapy of cancer // *Curr Opin Immunol.* 2005. Т. 17, № 2. С. 211–217.
5. Mehta R. S., Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer // *Front Immunol.* 2018. Т. 9. С. 283.
6. Morgan R. A. и др. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2 // *Mol Ther.* 2010. Т. 18, № 4. С. 843–851.
7. Liu E. и др. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity // *Leukemia.* 2018. Т. 32, № 2. С. 520–531.
8. Shimasaki N. и др. A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies // *Cytotherapy.* 2012. Т. 14, № 7. С. 830–840.
9. Rebuffet L. и др. High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity // *Nat Immunol.* 2024. Т. 25, № 8. С. 1474–1488.
10. Lopez-Vergès S. и др. Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. Т. 108, № 36. С. 14725–14732.
11. Haroun-Izquierdo A. и др. Adaptive single-KIR+NKG2C⁺ NK cells expanded from select superdonors show potent missing-self reactivity and efficiently control HLA-mismatched acute myeloid leukemia // *J Immunother Cancer.* 2022. Т. 10, № 11. С. e005577.
12. Russo A. и др. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications // *Blood.* 2018. Т. 131, № 2. С. 247–262.
13. Cichocki F. и др. CD56dimCD57+NKG2C⁺ NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT // *Leukemia.* 2016. Т. 30, № 2. С. 456–463.
14. Cichocki F. и др. Adaptive NK cell reconstitution is associated with better clinical outcomes // *JCI Insight.* 2019. Т. 4, № 2. С. e125553.
15. Huisman B. D. и др. High-throughput characterization of HLA-E-presented CD94/NKG2x ligands reveals peptides which modulate NK cell activation // *Nat Commun.* 2023. Т. 14, № 1. С. 4809.
16. Lo Monaco E. и др. Human leukocyte antigen E contributes to protect tumor cells from lysis by natural killer cells // *Neoplasia.* New York, N.Y., 2011. Т. 13, № 9. С. 822–830.
17. Sætersmoen M. и др. Targeting HLA-E-overexpressing cancers with a NKG2A/C switch receptor // *Med.* New York, N.Y., 2025. Т. 6, № 2. С. 100521.
18. Fisher J. G. и др. Disruption of the NKG2A:HLA-E Immune Checkpoint Axis to Enhance NK Cell Activation against Cancer // *Vaccines (Basel).* 2022. Т. 10, № 12. С. 1993.
19. Hammer Q. и др. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells // *Nat Immunol.* 2018. Т. 19, № 5. С. 453–463.
20. Rölle A. и др. IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C⁺ NK cell expansion // *J Clin Invest.* 2014. Т. 124, № 12. С. 5305–5316.

21. Streltsova M. A. и др. Recurrent Stimulation of Natural Killer Cell Clones with K562 Expressing Membrane-Bound Interleukin-21 Affects Their Phenotype, Interferon- γ Production, and Lifespan // *Int J Mol Sci*. 2019. Т. 20, № 2. С. 443.
22. Streltsova M. A. и др. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of «senescent» NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A // *PLoS One*. 2018. Т. 13, № 12. С. e0208469.
23. Kobyzeva P. A. и др. CD56dim CD57- NKG2C+ NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57+ NKG2C+ memory-like NK cells // *J Leukoc Biol*. 2020. Т. 108, № 4. С. 1379–1395.
24. Hofer T. P. и др. slan-defined subsets of CD16-positive monocytes: impact of granulomatous inflammation and M-CSF receptor mutation // *Blood*. 2015. Т. 126, № 24. С. 2601–2610.
25. Lanier L. L. и др. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule // *J Exp Med*. 1989. Т. 169, № 6. С. 2233–2238.
26. Brenchley J. M. и др. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells // *Blood*. 2003. Т. 101, № 7. С. 2711–2720.
27. Melsen J. E. и др. Human Circulating and Tissue-Resident CD56(bright) Natural Killer Cell Populations // *Front Immunol*. 2016. Т. 7. С. 262.
28. Anfossi N. и др. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I // *Immunity*. 2006. Т. 25, № 2. С. 331–342.
29. Björkström N. K. и др. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education // *Blood*. 2010. Т. 116, № 19. С. 3853–3864.
30. Goodridge J. P. и др. Remodeling of secretory lysosomes during education tunes functional potential in NK cells // *Nat Commun*. 2019. Т. 10, № 1. С. 514.
31. Lopez-Vergès S. и др. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset // *Blood*. 2010. Т. 116, № 19. С. 3865–3874.
32. Dybkaer K. и др. Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression signatures indicative of novel molecular signaling pathways // *BMC Genomics*. 2007. Т. 8. С. 230.
33. Edsparr K. и др. Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT // *J Immunother*. Hagerstown, Md. : 1997, 2010. Т. 33, № 5. С. 475–481.
34. Gasteiger G. и др. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells // *J Exp Med*. 2013. Т. 210, № 6. С. 1167–1178.
35. Kim M. и др. Multi-cellular natural killer (NK) cell clusters enhance NK cell activation through localizing IL-2 within the cluster // *Sci Rep*. 2017. Т. 7. С. 40623.
36. de Rham C. и др. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors // *Arthritis Res Ther*. 2007. Т. 9, № 6. С. R125.
37. Skak K., Frederiksen K. S., Lundsgaard D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression // *Immunology*. 2008. Т. 123, № 4. С. 575–583.
38. Romee R. и др. Cytokine activation induces human memory-like NK cells // *Blood*. 2012. Т. 120, № 24. С. 4751–4760.
39. Foltz J. A. и др. Cytokines drive the formation of memory-like NK cell subsets via epigenetic rewiring and transcriptional regulation // *Sci Immunol*. 2024. Т. 9, № 96. С. eadk4893.
40. Gang M. и др. CAR-modified memory-like NK cells exhibit potent responses to NK-resistant lymphomas // *Blood*. 2020. Т. 136, № 20. С. 2308–2318.
41. Terrén I. и др. IL-12/15/18-induced cell death and mitochondrial dynamics of human NK cells // *Front Immunol*. 2023. Т. 14. С. 1211839.

42. Castriconi R. и др. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Т. 100, № 7. С. 4120–4125.
43. Wang Z. и др. IL-10 Enhances Human Natural Killer Cell Effector Functions via Metabolic Reprogramming Regulated by mTORC1 Signaling // *Front Immunol*. 2021. Т. 12. С. 619195.
44. Mayol K. и др. Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking // *Blood*. 2011. Т. 118, № 18. С. 4863–4871.
45. Bernardini G. и др. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets // *Blood*. 2008. Т. 111, № 7. С. 3626–3634.
46. Jamali A. и др. Highly Efficient Generation of Transgenically Augmented CAR NK Cells Overexpressing CXCR4 // *Front Immunol*. 2020. Т. 11. С. 2028.
47. Levy E. и др. Enhanced Bone Marrow Homing of Natural Killer Cells Following mRNA Transfection With Gain-of-Function Variant CXCR4R334X // *Front Immunol*. 2019. Т. 10. С. 1262.
48. Pesce S. и др. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor // *Front Immunol*. 2016. Т. 7. С. 414.
49. Dutton E. E. и др. Peripheral lymph nodes contain migratory and resident innate lymphoid cell populations // *Sci Immunol*. 2019. Т. 4, № 35. С. eaau8082.
50. Morohashi H. и др. Expression of both types of human interleukin-8 receptors on mature neutrophils, monocytes, and natural killer cells // *J Leukoc Biol*. 1995. Т. 57, № 1. С. 180–187.
51. Campanella G. S. V. и др. CXCR3 and heparin binding sites of the chemokine IP-10 (CXCL10) // *J Biol Chem*. 2003. Т. 278, № 19. С. 17066–17074.
52. Wennerberg E. и др. CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo // *Cancer Immunol Immunother*. 2015. Т. 64, № 2. С. 225–235.
53. Wendel M. и др. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands // *Cancer Res*. 2008. Т. 68, № 20. С. 8437–8445.
54. Nishimura M. и др. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2002. Т. 168, № 12. С. 6173–6180.
55. Bottino C. и др. Receptors for HLA class I molecules in human NK cells // *Semin Immunol*. 1995. Т. 7, № 2. С. 67–73.
56. Campbell K. S. и др. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C // *J Exp Med*. 1996. Т. 184, № 1. С. 93–100.
57. Fauriat C. и др. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition // *Blood*. 2010. Т. 115, № 11. С. 2167–2176.
58. Vitale M. и др. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis // *J Exp Med*. 1998. Т. 187, № 12. С. 2065–2072.
59. Luczo J. M., Ronzulli S. L., Tompkins S. M. Influenza A Virus Hemagglutinin and Other Pathogen Glycoprotein Interactions with NK Cell Natural Cytotoxicity Receptors NKp46, NKp44, and NKp30 // *Viruses*. 2021. Т. 13, № 2. С. 156.
60. Brandt C. S. и др. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans // *J Exp Med*. 2009. Т. 206, № 7. С. 1495–1503.
61. Binici J., Koch J. BAG-6, a jack of all trades in health and disease // *Cell Mol Life Sci*. 2014. Т. 71, № 10. С. 1829–1837.
62. Arnon T. I. и др. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus // *Nat Immunol*. 2005. Т. 6, № 5. С. 515–523.
63. Shemesh A. и др. Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints // *Cancer Immunol Immunother*. 2018. Т. 67, № 12. С. 1871–1883.

64. Wang W. и др. Tumor-released Galectin-3, a soluble inhibitory ligand of human NKp30, plays an important role in tumor escape from NK cell attack // *J Biol Chem*. 2014. Т. 289, № 48. С. 33311–33319.
65. Hershkovitz O. и др. NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells // *J Immunol. Baltimore, Md.* : 1950, 2009. Т. 183, № 4. С. 2610–2621.
66. Esin S. и др. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria // *Infect Immun*. 2008. Т. 76, № 4. С. 1719–1727.
67. Horton N. C., Mathew S. O., Mathew P. A. Novel interaction between proliferating cell nuclear antigen and HLA I on the surface of tumor cells inhibits NK cell function through NKp44 // *PLoS One*. 2013. Т. 8, № 3. С. e59552.
68. Hershkovitz O. и др. Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44 // *Biochemistry*. 2007. Т. 46, № 25. С. 7426–7436.
69. Baychelier F. и др. Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44 // *Blood*. 2013. Т. 122, № 17. С. 2935–2942.
70. Walwyn-Brown K. и др. Human NK Cells Lyse Th2-Polarizing Dendritic Cells via NKp30 and DNAM-1 // *J Immunol. Baltimore, Md.* : 1950, 2018. Т. 201, № 7. С. 2028–2041.
71. Thorén F. B. и др. Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism // *J Immunol. Baltimore, Md.* : 1950, 2012. Т. 188, № 4. С. 1668–1674.
72. Wu J. и др. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10 // *Science. New York, N.Y.*, 1999. Т. 285, № 5428. С. 730–732.
73. Wei H. и др. Targeting NKG2D/NKG2DL axis in cancer immunotherapy: mechanisms and therapeutic applications // *J Transl Med*. 2026. Т. 24, № 1. С. 126.
74. Charpak-Amikam Y. и др. The activating receptor NKG2D is an anti-fungal pattern recognition receptor // *Nat Commun*. 2024. Т. 15, № 1. С. 8664.
75. Lee N. и др. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. Т. 95, № 9. С. 5199–5204.
76. Braud V. M. и др. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C // *Nature*. 1998. Т. 391, № 6669. С. 795–799.
77. Hoare H. L. и др. Subtle changes in peptide conformation profoundly affect recognition of the non-classical MHC class I molecule HLA-E by the CD94-NKG2 natural killer cell receptors // *J Mol Biol*. 2008. Т. 377, № 5. С. 1297–1303.
78. Pfeifer C. и др. Natural Killer Cell Education Is Associated With a Distinct Glycolytic Profile // *Front Immunol*. 2018. Т. 9. С. 3020.
79. Hammer Q. и др. SARS-CoV-2 Nsp13 encodes for an HLA-E-stabilizing peptide that abrogates inhibition of NKG2A-expressing NK cells // *Cell Rep*. 2022. Т. 38, № 10. С. 110503.
80. Yang Y. и др. HLA-E Binding Peptide as a Potential Therapeutic Candidate for High-Risk Multiple Myeloma // *Front Oncol*. 2021. Т. 11. С. 670673.
81. Salomé B. и др. NKG2A and HLA-E define an alternative immune checkpoint axis in bladder cancer // *Cancer Cell*. 2022. Т. 40, № 9. С. 1027-1043.e9.
82. López-Botet M., Vilches C., Muntasell A. The CD94/NKG2A-HLA-E Axis as a Target in Cancer Immunotherapy: A Critical Perspective // *Clin Cancer Res*. 2026. Т. 32, № 6. С. 1013–1019.
83. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases // *Front Immunol*. 2022. Т. 13. С. 960852.
84. Nattermann J. и др. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytolysis mediated by natural killer cells // *Am J Pathol*. 2005. Т. 166, № 2. С. 443–453.

85. Tomasec P. и др. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40 // *Science*. New York, N.Y., 2000. T. 287, № 5455. С. 1031.
86. Sánchez-Gaona N. и др. NKG2C and NKG2A coexpression defines a highly functional antiviral NK population in spontaneous HIV control // *JCI Insight*. 2024. T. 9, № 20. С. e182660.
87. Kaiser B. K. и др. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2005. T. 174, № 5. С. 2878–2884.
88. Orbelyan G. A. и др. Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12 // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2014. T. 193, № 2. С. 610–616.
89. Cheray M. и др. KLRC3, a Natural Killer receptor gene, is a key factor involved in glioblastoma tumourigenesis and aggressiveness // *J Cell Mol Med*. 2017. T. 21, № 2. С. 244–253.
90. Brostjan C. и др. Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones // *J Immunol Methods*. 2002. T. 264, № 1–2. С. 109–119.
91. Dukovska D. и др. NKG2H-Expressing T Cells Negatively Regulate Immune Responses // *Front Immunol*. 2018. T. 9. С. 390.
92. Wroblewski E. E., Parham P., Guethlein L. A. Two to Tango: Co-evolution of Hominid Natural Killer Cell Receptors and MHC // *Front Immunol*. 2019. T. 10. С. 177.
93. Philippon C. и др. Allelic variation of KIR and HLA tunes the cytolytic payload and determines functional hierarchy of NK cell repertoires // *Blood Adv*. 2023. T. 7, № 16. С. 4492–4504.
94. Korbel D. S. и др. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype predicts the capacity of human KIR-positive CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2009. T. 182, № 10. С. 6426–6434.
95. Pende D. и др. Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation // *Front Immunol*. 2019. T. 10. С. 1179.
96. van der Ploeg K. и др. Modulation of Human Leukocyte Antigen-C by Human Cytomegalovirus Stimulates KIR2DS1 Recognition by Natural Killer Cells // *Front Immunol*. 2017. T. 8. С. 298.
97. Malnati M. S. и др. Activating Killer Immunoglobulin Receptors and HLA-C: a successful combination providing HIV-1 control // *Sci Rep*. 2017. T. 7. С. 42470.
98. Ustiuzhanina M. O. и др. The Antigen-Specific Response of NK Cells to SARS-CoV-2 Correlates With KIR2DS4 Expression // *J Med Virol*. 2024. T. 96, № 11. С. e70057.
99. Sim M. J. W. и др. Human NK cell receptor KIR2DS4 detects a conserved bacterial epitope presented by HLA-C // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019. T. 116, № 26. С. 12964–12973.
100. Kamishikiryo J., Maenaka K. HLA-G molecule // *Curr Pharm Des*. 2009. T. 15, № 28. С. 3318–3324.
101. Wang S. и др. Harnessing the potential of HLA-G in cancer therapy: advances, challenges, and prospects // *J Transl Med*. 2024. T. 22, № 1. С. 130.
102. Caumartin J. и др. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells // *EMBO J*. 2007. T. 26, № 5. С. 1423–1433.
103. Moretta A. и др. Inhibitory and activatory receptors for HLA class I molecules in human natural killer cells // *Chem Immunol*. 1996. T. 64. С. 77–87.
104. Cassidy S. A., Cheent K. S., Khakoo S. I. Effects of Peptide on NK cell-mediated MHC I recognition // *Front Immunol*. 2014. T. 5. С. 133.
105. Fernandez N. C. и др. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules // *Blood*. 2005. T. 105, № 11. С. 4416–4423.

106. Zhang Y., Huang B. The Development and Diversity of ILCs, NK Cells and Their Relevance in Health and Diseases // *Adv Exp Med Biol*. 2017. T. 1024. C. 225–244.
107. van den Bosch G. и др. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells // *Clin Exp Immunol*. 1995. T. 101, № 3. C. 515–520.
108. Cohen R. и др. NK cells promote cardiac cell death and regulate myelopoiesis in myocardial infarction // *Nat Commun*. 2026. T. 17, № 1. C. 4699.
109. Jud A. и др. Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- γ // *Oncotarget*. 2017. T. 8, № 4. C. 6130–6141.
110. Santana-Hernández S. и др. NK cell-triggered CCL5/IFN γ -CXCL9/10 axis underlies the clinical efficacy of neoadjuvant anti-HER2 antibodies in breast cancer // *J Exp Clin Cancer Res*. 2024. T. 43, № 1. C. 10.
111. He M. и др. Construction of self-driving anti- α FR CAR-engineered NK cells based on IFN- γ and TNF- α synergistically induced high expression of CXCL10 // *Neoplasia*. New York, N.Y., 2024. T. 58. C. 101065.
112. Barberini F. и др. Combined IFN- γ and TNF- α treatment enhances the susceptibility of breast cancer cells and spheroids to Natural Killer cell-mediated killing // *Cell Death Dis*. 2025. T. 16, № 1. C. 729.
113. Lin Q. и др. IFN- γ -dependent NK cell activation is essential to metastasis suppression by engineered Salmonella // *Nat Commun*. 2021. T. 12, № 1. C. 2537.
114. Caron G. и др. Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity // *Eur J Immunol*. 1999. T. 29, № 11. C. 3588–3595.
115. Chiche L. и др. The role of natural killer cells in sepsis // *J Biomed Biotechnol*. 2011. T. 2011. C. 986491.
116. Mocellin S. и др. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis // *Genes Immun*. 2004. T. 5, № 8. C. 621–630.
117. Jensen I. J. и др. NK Cell-Derived IL-10 Supports Host Survival during Sepsis // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2021. T. 206, № 6. C. 1171–1180.
118. Marcon F. и др. NK cells in pancreatic cancer demonstrate impaired cytotoxicity and a regulatory IL-10 phenotype // *Oncoimmunology*. 2020. T. 9, № 1. C. 1845424.
119. Ostapchuk Y. O. и др. Peripheral blood NK cells expressing HLA-G, IL-10 and TGF- β in healthy donors and breast cancer patients // *Cell Immunol*. 2015. T. 298, № 1–2. C. 37–46.
120. Lanier L. L., Ruitenberg J. J., Phillips J. H. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 1988. T. 141, № 10. C. 3478–3485.
121. Prager I., Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity // *J Leukoc Biol*. 2019. T. 105, № 6. C. 1319–1329.
122. Zamai L. и др. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells // *J Exp Med*. 1998. T. 188, № 12. C. 2375–2380.
123. Screpanti V. и др. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells // *Mol Immunol*. 2005. T. 42, № 4. C. 495–499.
124. Moroso V. и др. Liver grafts contain a unique subset of natural killer cells that are transferred into the recipient after liver transplantation // *Liver Transpl*. 2010. T. 16, № 7. C. 895–908.
125. Gwalani L. A., Orange J. S. Single Degranulations in NK Cells Can Mediate Target Cell Killing // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2018. T. 200, № 9. C. 3231–3243.
126. Srpán K. и др. Shedding of CD16 disassembles the NK cell immune synapse and boosts serial engagement of target cells // *J Cell Biol*. 2018. T. 217, № 9. C. 3267–3283.
127. Romee R. и др. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) // *Blood*. 2013. T. 121, № 18. C. 3599–3608.

128. Burgess S. J. и др. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications // *Immunol Res.* 2008. Т. 40, № 1. С. 18–34.
129. Borrego F. и др. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes // *J Immunol.* Baltimore, Md. : 1950, 2002. Т. 169, № 11. С. 6102–6111.
130. Borrego F. и др. NK cell CD94/NKG2A inhibitory receptors are internalized and recycle independently of inhibitory signaling processes // *J Immunol.* Baltimore, Md. : 1950, 2002. Т. 169, № 11. С. 6102–6111.
131. Phillips J. H., Le A. M., Lanier L. L. Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens // *J Exp Med.* 1984. Т. 159, № 4. С. 993–1008.
132. De Lerna Barbaro A. и др. Methylation of CIITA promoter IV causes loss of HLA-II inducibility by IFN-gamma in promyelocytic cells // *Int Immunol.* 2008. Т. 20, № 11. С. 1457–1466.
133. Erokhina S. A. и др. HLA-DR+ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity // *Immunol Cell Biol.* 2018. Т. 96, № 2. С. 212–228.
134. Burt B. M. и др. Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function // *Hum Immunol.* 2008. Т. 69, № 8. С. 469–474.
135. Kust S. A. и др. HLA-DR-Positive NK Cells Expand in Response to Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Mediate Mycobacteria-Induced T Cell Activation // *Front Immunol.* 2021. Т. 12. С. 662128.
136. Loyon R. и др. IL-21-Induced MHC Class II+ NK Cells Promote the Expansion of Human Uncommitted CD4+ Central Memory T Cells in a Macrophage Migration Inhibitory Factor-Dependent Manner // *J Immunol.* Baltimore, Md. : 1950, 2016. Т. 197, № 1. С. 85–96.
137. Ziegler S. и др. CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells // *Sci Rep.* 2017. Т. 7, № 1. С. 6138.
138. Heilig L. и др. CD56-mediated activation of human natural killer cells is triggered by *Aspergillus fumigatus* galactosaminogalactan // *PLoS Pathog.* 2024. Т. 20, № 6. С. e1012315.
139. Takasaki S. и др. CD56 directly interacts in the process of NCAM-positive target cell-killing by NK cells // *Cell Biol Int.* 2000. Т. 24, № 2. С. 101–108.
140. Gunesch J. T. и др. CD56 regulates human NK cell cytotoxicity through Pyk2 // *Elife.* 2020. Т. 9. С. e57346.
141. Martinez A. L. и др. CD56/NCAM mediates cell migration of human NK cells by promoting integrin-mediated adhesion turnover // *Mol Biol Cell.* 2024. Т. 35, № 5. С. ar64.
142. Cooper M. A., Fehniger T. A., Caligiuri M. A. The biology of human natural killer-cell subsets // *Trends Immunol.* 2001. Т. 22, № 11. С. 633–640.
143. Streltsova M. A. и др. Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of «senescent» NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A // *PLoS One.* 2018. Т. 13, № 12. С. e0208469.
144. Wu Z. и др. Human cytomegalovirus-induced NKG2C(hi) CD57(hi) natural killer cells are effectors dependent on humoral antiviral immunity // *J Virol.* 2013. Т. 87, № 13. С. 7717–7725.
145. Stegmann K. A. и др. CXCR6 marks a novel subset of T-bet(lo)Eomes(hi) natural killer cells residing in human liver // *Sci Rep.* 2016. Т. 6. С. 26157.
146. Harmon C. и др. Tissue-resident Eomes(hi) T-bet(lo) CD56(bright) NK cells with reduced proinflammatory potential are enriched in the adult human liver // *Eur J Immunol.* 2016. Т. 46, № 9. С. 2111–2120.
147. Carlino C. и др. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy // *Blood.* 2008. Т. 111, № 6. С. 3108–3115.

148. Campbell J. J. и др. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire // *J Immunol.* Baltimore, Md. : 1950, 2001. Т. 166, № 11. С. 6477–6482.
149. Nielsen N. и др. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A // *PLoS One.* 2012. Т. 7, № 2. С. e31959.
150. Poli A. и др. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset // *Immunology.* 2009. Т. 126, № 4. С. 458–465.
151. Donado C. A. и др. Granzyme K activates the entire complement cascade // *Nature.* 2025. Т. 641, № 8061. С. 211–221.
152. Schlums H. и др. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function // *Immunity.* 2015. Т. 42, № 3. С. 443–456.
153. O’Sullivan T. E., Sun J. C., Lanier L. L. Natural Killer Cell Memory // *Immunity.* 2015. Т. 43, № 4. С. 634–645.
154. Mamessier E. и др. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity // *J Clin Invest.* 2011. Т. 121, № 9. С. 3609–3622.
155. Viel S. и др. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway // *Sci Signal.* 2016. Т. 9, № 415. С. ra19.
156. Viel S. и др. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway // *Sci Signal.* 2016. Т. 9, № 415. С. ra19.
157. Duan S. и др. Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape // *Mol Cancer.* 2019. Т. 18, № 1. С. 29.
158. Amo L. и др. Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells // *Cancer Lett.* 2015. Т. 368, № 1. С. 26–35.
159. Müller B., Fischer B., Kreutz W. An acidic microenvironment impairs the generation of non-major histocompatibility complex-restricted killer cells // *Immunology.* 2000. Т. 99, № 3. С. 375–384.
160. Gallo M. и др. Lactic dehydrogenase and cancer: an overview // *Front Biosci (Landmark Ed).* Landmark edition, 2015. Т. 20, № 8. С. 1234–1249.
161. Thacker G. и др. Immature natural killer cells promote progression of triple-negative breast cancer // *Sci Transl Med.* 2023. Т. 15, № 686. С. eabl4414.
162. de Jonge K. и др. Circulating CD56bright NK cells inversely correlate with survival of melanoma patients // *Sci Rep.* 2019. Т. 9, № 1. С. 4487.
163. Khan M. A. A. K. и др. Reduced HLA-I Transcript Levels and Increased Abundance of a CD56dim NK Cell Signature Are Associated with Improved Survival in Lower-Grade Gliomas // *Cancers (Basel).* 2025. Т. 17, № 9. С. 1570.
164. Rezaeifard S. и др. Tumor infiltrating NK cell (TINK) subsets and functional molecules in patients with breast cancer // *Mol Immunol.* 2021. Т. 136. С. 161–167.
165. Khan M. A. A. K. и др. Reduced HLA-I Transcript Levels and Increased Abundance of a CD56dim NK Cell Signature Are Associated with Improved Survival in Lower-Grade Gliomas // *Cancers (Basel).* 2025. Т. 17, № 9. С. 1570.
166. Khan M. A. A. K. и др. Transcriptional signature of CD56bright NK cells predicts favourable prognosis in bladder cancer // *Front Immunol.* 2024. Т. 15. С. 1474652.
167. de Kruijf E. M. и др. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study // *BMC Cancer.* 2012. Т. 12. С. 24.
168. Deng W. и др. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection // *Science.* New York, N.Y., 2015. Т. 348, № 6230. С. 136–139.
169. Breunig C. и др. MicroRNA-519a-3p mediates apoptosis resistance in breast cancer cells and their escape from recognition by natural killer cells // *Cell Death Dis.* 2017. Т. 8, № 8. С. e2973.

170. Frazao A. и др. CD16+NKG2Ahigh Natural Killer Cells Infiltrate Breast Cancer-Draining Lymph Nodes // *Cancer Immunol Res.* 2019. Т. 7, № 2. С. 208–218.
171. Duro-Sánchez S., Alonso M. R., Arribas J. Immunotherapies against HER2-Positive Breast Cancer // *Cancers (Basel).* 2023. Т. 15, № 4. С. 1069.
172. Kerbaui L. N. и др. Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30+ Malignancies // *Clin Cancer Res.* 2021. Т. 27, № 13. С. 3744–3756.
173. Stefańczyk S. A. и др. Fc-optimized CD276 antibody enhances NK cell activation against non-small cell lung cancer // *Front Immunol.* 2025. Т. 16. С. 1624751.
174. Hagelstein I. и др. Preclinical Evaluation of a B7-H3 Targeting Antibody Enhancing NK Cell-Mediated Cytotoxicity for Ovarian Cancer Treatment // *Immunotargets Ther.* 2025. Т. 14. С. 735–753.
175. Park J.-E. и др. Anti-tumor effects of NK cells and anti-PD-L1 antibody with antibody-dependent cellular cytotoxicity in PD-L1-positive cancer cell lines // *J Immunother Cancer.* 2020. Т. 8, № 2. С. e000873.
176. Xie Z. и др. A trivalent anti-erbB2/anti-CD16 bispecific antibody retargeting NK cells against human breast cancer cells // *Biochem Biophys Res Commun.* 2003. Т. 311, № 2. С. 307–312.
177. Gauthier L. и др. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity // *Cell.* 2019. Т. 177, № 7. С. 1701-1713.e16.
178. Gauthier L. и др. Control of acute myeloid leukemia by a trifunctional NKp46-CD16a-NK cell engager targeting CD123 // *Nat Biotechnol.* 2023. Т. 41, № 9. С. 1296–1306.
179. Klausz K. и др. Multifunctional NK Cell-Engaging Antibodies Targeting EGFR and NKp30 Elicit Efficient Tumor Cell Killing and Proinflammatory Cytokine Release // *J Immunol.* Baltimore, Md. : 1950, 2022. Т. 209, № 9. С. 1724–1735.
180. Lutz S. и др. Novel NKG2D-directed bispecific antibodies enhance antibody-mediated killing of malignant B cells by NK cells and T cells // *Front Immunol.* 2023. Т. 14. С. 1227572.
181. Karampatzakis A. и др. Antibody Afucosylation Augments CD16-Mediated Serial Killing and IFN γ Secretion by Human Natural Killer Cells // *Front Immunol.* 2021. Т. 12. С. 641521.
182. Iraqi M. и др. Blocking the PCNA/NKp44 Checkpoint to Stimulate NK Cell Responses to Multiple Myeloma // *Int J Mol Sci.* 2022. Т. 23, № 9. С. 4717.
183. André P. и др. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells // *Cell.* 2018. Т. 175, № 7. С. 1731-1743.e13.
184. Bexte T. и др. CRISPR/Cas9 editing of NKG2A improves the efficacy of primary CD33-directed chimeric antigen receptor natural killer cells // *Nat Commun.* 2024. Т. 15, № 1. С. 8439.
185. Gong Y. и др. NKG2A genetic deletion promotes human primary NK cell anti-tumor responses better than an anti-NKG2A monoclonal antibody // *Mol Ther.* 2024. Т. 32, № 8. С. 2711–2727.
186. Knochelmann H. M. и др. CAR T Cells in Solid Tumors: Blueprints for Building Effective Therapies // *Front Immunol.* 2018. Т. 9. С. 1740.
187. Szöör Á. и др. Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies // *Cancer Lett.* 2020. Т. 484. С. 1–8.
188. Liu X., Zhang N., Shi H. Driving better and safer HER2-specific CARs for cancer therapy // *Oncotarget.* 2017. Т. 8, № 37. С. 62730–62741.
189. Arcangeli S. и др. Next-Generation Manufacturing Protocols Enriching TSCM CAR T Cells Can Overcome Disease-Specific T Cell Defects in Cancer Patients // *Front Immunol.* 2020. Т. 11. С. 1217.
190. Singh A. K., McGuirk J. P. CAR T cells: continuation in a revolution of immunotherapy // *Lancet Oncol.* 2020. Т. 21, № 3. С. e168–e178.

191. Montero A. и др. Postmastectomy radiation therapy in early breast cancer: Utility or futility? // *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020. Т. 147. С. 102887.
192. Yang Y. и др. Cbl induced ubiquitination of HER2 mediate immune escape from HER2-targeted CAR-T // *J Biochem Mol Toxicol*. 2023. Т. 37, № 10. С. e23446.
193. Priceman S. J. и др. Regional Delivery of Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells Effectively Targets HER2+ Breast Cancer Metastasis to the Brain // *Clin Cancer Res*. 2018. Т. 24, № 1. С. 95–105.
194. Stepanov A. V. и др. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022. Т. 119, № 46. С. e2210562119.
195. Siegler E. и др. Designed Ankyrin Repeat Proteins as Her2 Targeting Domains in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells // *Hum Gene Ther*. 2017. Т. 28, № 9. С. 726–736.
196. Portillo A. L. и др. Expanded human NK cells armed with CAR uncouple potent anti-tumor activity from off-tumor toxicity against solid tumors // *iScience*. 2021. Т. 24, № 6. С. 102619.
197. Niu Z. и др. Challenges in the Development of NK-92 Cells as an Effective Universal Off-the-Shelf Cellular Therapeutic // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2024. Т. 213, № 9. С. 1318–1328.
198. Luevano M. и др. The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation // *Hum Immunol*. 2012. Т. 73, № 3. С. 248–257.
199. Carson W. E. и др. Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells // *Eur J Immunol*. 2001. Т. 31, № 10. С. 3016–3025.
200. Nakazawa T. и др. An efficient feeder-free and chemically-defined expansion strategy for highly purified natural killer cells derived from human cord blood // *Regen Ther*. 2023. Т. 24. С. 32–42.
201. Lee I. и др. Feeder-Free Expanded and Cryopreserved NK Cells Retain Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity against HER2-Positive Tumors // *J Microbiol Biotechnol*. 2025. Т. 35. С. e2507016.
202. Kubo N. и др. A Feeder Cell-Free System for Chimeric Antigen Receptor Gene Transduction Into Natural Killer Cells // *Bio Protoc*. 2026. Т. 16, № 8. С. e5669.
203. Khanal S., Baer A., Bhattarai N. Feeder cell-free production of CAR-NK cells via activation of PKC and calcium signaling pathways // *Cytotherapy*. 2025. Т. 27, № 8. С. 1013–1022.
204. Oyer J. L. и др. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015. Т. 21, № 4. С. 632–639.
205. Johnson C. D. L. и др. Feeder-Cell-Free and Serum-Free Expansion of Natural Killer Cells Using Cloudz Microspheres, G-Rex6M, and Human Platelet Lysate // *Front Immunol*. 2022. Т. 13. С. 803380.
206. Giordano C. и др. CD94-driven in vitro expansion of highly functional adaptive NKG2C+ NKG2A- CD57+ NK cells from CMV+ healthy donors // *Front Immunol*. 2025. Т. 16. С. 1481745.
207. Thangaraj J. L. и др. Expansion of cytotoxic natural killer cells in multiple myeloma patients using K562 cells expressing OX40 ligand and membrane-bound IL-18 and IL-21 // *Cancer Immunol Immunother*. 2022. Т. 71, № 3. С. 613–625.
208. Zhao X.-Y. и др. Expanded clinical-grade membrane-bound IL-21/4-1BBL NK cell products exhibit activity against acute myeloid leukemia in vivo // *Eur J Immunol*. 2020. Т. 50, № 9. С. 1374–1385.
209. Gong W. и др. Ex vivo expansion of natural killer cells with high cytotoxicity by K562 cells modified to co-express major histocompatibility complex class I chain-related protein A, 4-1BB ligand, and interleukin-15 // *Tissue Antigens*. 2010. Т. 76, № 6. С. 467–475.
210. Denman C. J. и др. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells // *PLoS One*. 2012. Т. 7, № 1. С. e30264.

211. Bennstein S. B. и др. Differentiation of cord blood-derived Innate Lymphoid Cells 1 into KIR+NKG2A- natural killer cells in a human stem cell niche // *Stem Cells Transl Med.* 2026. Т. 15, № 5. С. szag034.
212. Rose M. J. J. и др. Killer Ig-like receptor ligand mismatch directs NK cell expansion in vitro // *J Immunol. Baltimore, Md. : 1950, 2009.* Т. 183, № 7. С. 4502–4508.
213. Sakagawa H. и др. Clinical-scale expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells requiring single-peptide stimulation and feeder cells but not additional antigen-presenting cells // *Transfusion.* 2006. Т. 46, № 4. С. 516–522.
214. He W. и др. Intracellular trafficking of HLA-E and its regulation // *J Exp Med.* 2023. Т. 220, № 8. С. e20221941.
215. Llano M. и др. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer // *Eur J Immunol.* 1998. Т. 28, № 9. С. 2854–2863.
216. Rölle A. и др. Distinct HLA-E Peptide Complexes Modify Antibody-Driven Effector Functions of Adaptive NK Cells // *Cell Rep.* 2018. Т. 24, № 8. С. 1967-1976.e4.
217. Phan M.-T. T. и др. Selective Expansion of NKG2C+ Adaptive NK Cells Using K562 Cells Expressing HLA-E // *Int J Mol Sci.* 2022. Т. 23, № 16. С. 9426.
218. Liu W. Evaluating Human Natural Killer Cells Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Using Plate-bound Anti-CD16 Antibodies // *Bio Protoc.* 2022. Т. 12, № 1. С. e4285.
219. Sogomonyan A. S. и др. 3D Models of Cellular Spheroids As a Universal Tool for Studying the Cytotoxic Properties of Anticancer Compounds In Vitro // *Acta Naturae.* 2022. Т. 14, № 1. С. 92–100.
220. Quatrini L. и др. Ubiquitin-dependent endocytosis of NKG2D-DAP10 receptor complexes activates signaling and functions in human NK cells // *Sci Signal.* 2015. Т. 8, № 400. С. ra108.
221. Masilamani M. и др. Endocytosis and intracellular trafficking of human natural killer cell receptors // *Traffic. Copenhagen, Denmark, 2009.* Т. 10, № 12. С. 1735–1744.
222. Kust S. A. и др. HLA-DR Expression in Natural Killer Cells Marks Distinct Functional States, Depending on Cell Differentiation Stage // *Int J Mol Sci.* 2024. Т. 25, № 9. С. 4609.
223. Gunesch J. T. и др. Genome-wide analyses and functional profiling of human NK cell lines // *Mol Immunol.* 2019. Т. 115. С. 64–75.
224. Rozen F., Zhang J., Pollak M. Antiproliferative action of tumor necrosis factor-alpha on MCF-7 breastcancer cells is associated with increased insulin-like growth factor binding protein-3 accumulation // *Int J Oncol.* 1998. Т. 13, № 4. С. 865–869.
225. Zhou B. P. и др. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway // *J Biol Chem.* 2000. Т. 275, № 11. С. 8027–8031.
226. Hong I.-S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types // *Exp Mol Med.* 2016. Т. 48, № 7. С. e242.
227. Zheng H. и др. IFN- γ in ovarian tumor microenvironment upregulates HLA-E expression and predicts a poor prognosis // *J Ovarian Res.* 2023. Т. 16, № 1. С. 229.
228. Nguyen S. и др. HLA-E upregulation on IFN-gamma-activated AML blasts impairs CD94/NKG2A-dependent NK cytotoxicity after haplo-mismatched hematopoietic SCT // *Bone Marrow Transplant.* 2009. Т. 43, № 9. С. 693–699.
229. Neel N. F. и др. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005. Т. 16, № 6. С. 637–658.
230. Hamann I. и др. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells // *Immunology.* 2011. Т. 133, № 1. С. 62–73.
231. Infante-Duarte C. и др. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients // *FASEB J.* 2005. Т. 19, № 13. С. 1902–1904.

232. Yu Y.-R. A. и др. Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice // *Int J Cancer*. 2007. Т. 121, № 2. С. 316–322.
233. Kee J.-Y. и др. Antitumor immune activity by chemokine CX3CL1 in an orthotopic implantation of lung cancer model in vivo // *Mol Clin Oncol*. 2013. Т. 1, № 1. С. 35–40.
234. Molfetta R. и др. c-Cbl regulates MICA- but not ULBP2-induced NKG2D down-modulation in human NK cells // *Eur J Immunol*. 2014. Т. 44, № 9. С. 2761–2770.
235. Tan G., Spillane K. M., Maher J. The Role and Regulation of the NKG2D/NKG2D Ligand System in Cancer // *Biology (Basel)*. 2023. Т. 12, № 8. С. 1079.
236. Leivas A. и др. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma // *Blood Cancer J*. 2021. Т. 11, № 8. С. 146.
237. Zhang Y. и др. Co-expression of IL-21-Enhanced NKG2D CAR-NK cell therapy for lung cancer // *BMC Cancer*. 2024. Т. 24, № 1. С. 119.
238. Xiao L. и др. Adoptive Transfer of NKG2D CAR mRNA-Engineered Natural Killer Cells in Colorectal Cancer Patients // *Mol Ther*. 2019. Т. 27, № 6. С. 1114–1125.
239. Ndhlovu L. C. и др. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity // *Blood*. 2012. Т. 119, № 16. С. 3734–3743.
240. Dao T. N. и др. TIM-3 Expression Is Downregulated on Human NK Cells in Response to Cancer Targets in Synergy with Activation // *Cancers (Basel)*. 2020. Т. 12, № 9. С. 2417.
241. Ismael A. и др. CREB1 promotes expression of immune checkpoint HLA-E leading to immune escape in multiple myeloma // *Leukemia*. 2024. Т. 38, № 8. С. 1777–1786.
242. Levy E. M. и др. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer // *Int J Oncol*. 2008. Т. 32, № 3. С. 633–641.
243. Moreau P. и др. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes // *Int Immunol*. 1999. Т. 11, № 5. С. 803–811.
244. Mouillot G. и др. Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells // *Hum Immunol*. 2007. Т. 68, № 4. С. 277–285.
245. Béziat V. и др. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs // *Blood*. 2013. Т. 121, № 14. С. 2678–2688.
246. Kovalenko E. I. и др. Identification of Human Memory-Like NK Cells // *Curr Protoc Cytom*. 2017. Т. 79. С. 9.50.1-9.50.11.
247. Costa-García M. и др. Human Cytomegalovirus Antigen Presentation by HLA-DR+ NKG2C+ Adaptive NK Cells Specifically Activates Polyfunctional Effector Memory CD4+ T Lymphocytes // *Front Immunol*. 2019. Т. 10. С. 687.
248. Coupel S. и др. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation // *Blood*. 2007. Т. 109, № 7. С. 2806–2814.
249. LeibundGut-Landmann S. и др. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes // *Eur J Immunol*. 2004. Т. 34, № 6. С. 1513–1525.
250. Gustafson K. S., Ginder G. D. Interferon-gamma induction of the human leukocyte antigen-E gene is mediated through binding of a complex containing STAT1alpha to a distinct interferon-gamma-responsive element // *J Biol Chem*. 1996. Т. 271, № 33. С. 20035–20046.
251. Luetke-Eversloh M. и др. Human cytomegalovirus drives epigenetic imprinting of the IFNG locus in NKG2Chi natural killer cells // *PLoS Pathog*. 2014. Т. 10, № 10. С. e1004441.
252. Sáez-Borderías A. и др. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function // *J Immunol. Baltimore, Md.* : 1950, 2009. Т. 182, № 2. С. 829–836.
253. Draghi M. и др. Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I // *Blood*. 2005. Т. 105, № 5. С. 2028–2035.
254. Kusumi M. и др. Expression patterns of lectin-like natural killer receptors, inhibitory CD94/NKG2A, and activating CD94/NKG2C on decidual CD56bright natural killer cells

- differ from those on peripheral CD56dim natural killer cells // *J Reprod Immunol*. 2006. T. 70, № 1–2. С. 33–42.
255. Béziat V. и др. Human NKG2A overrides NKG2C effector functions to prevent autoreactivity of NK cells // *Blood*. 2011. T. 117, № 16. С. 4394–4396.
 256. Sáez-Borderías A. и др. IL-12-dependent inducible expression of the CD94/NKG2A inhibitory receptor regulates CD94/NKG2C+ NK cell function // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2009. T. 182, № 2. С. 829–836.
 257. Zhang T. и др. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR γ deficiency // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2013. T. 190, № 4. С. 1402–1406.
 258. Erokhina S. A. и др. HLA-DR+ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity // *Immunol Cell Biol*. 2018. T. 96, № 2. С. 212–228.
 259. Goodison S., Urquidi V., Tarin D. CD44 cell adhesion molecules // *Mol Pathol*. 1999. T. 52, № 4. С. 189–196.
 260. Kishimoto T. K., Jutila M. A., Butcher E. C. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. T. 87, № 6. С. 2244–2248.
 261. Sun M.-S. и др. RGL2 Drives the Metastatic Progression of Colorectal Cancer via Preventing the Protein Degradation of β -Catenin and KRAS // *Cancers (Basel)*. 2021. T. 13, № 8. С. 1763.
 262. Cheng Q. и др. RGL2 as an age-dependent factor regulates colon cancer progression // *Comput Struct Biotechnol J*. 2021. T. 19. С. 2190–2201.
 263. Scotland R. L. и др. The ral exchange factor rgl2 promotes cardiomyocyte survival and inhibits cardiac fibrosis // *PLoS One*. 2013. T. 8, № 9. С. e73599.
 264. Charoudeh H. N. и др. Modulation of the natural killer cell KIR repertoire by cytomegalovirus infection // *Eur J Immunol*. 2013. T. 43, № 2. С. 480–487.
 265. Valés-Gómez M. и др. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E // *EMBO J*. 1999. T. 18, № 15. С. 4250–4260.
 266. Siegler E. и др. Designed Ankyrin Repeat Proteins as Her2 Targeting Domains in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells // *Hum Gene Ther*. 2017. T. 28, № 9. С. 726–736.
 267. Au-Yeung B. B. и др. A sharp T-cell antigen receptor signaling threshold for T-cell proliferation // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. T. 111, № 35. С. E3679–3688.
 268. Watanabe K. и др. Target antigen density governs the efficacy of anti-CD20-CD28-CD3 ζ chimeric antigen receptor-modified effector CD8+ T cells // *J Immunol*. Baltimore, Md. : 1950, 2015. T. 194, № 3. С. 911–920.
 269. Stone J. D. и др. A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs) // *Oncoimmunology*. 2012. T. 1, № 6. С. 863–873.
 270. Walker A. J. и др. Tumor Antigen and Receptor Densities Regulate Efficacy of a Chimeric Antigen Receptor Targeting Anaplastic Lymphoma Kinase // *Mol Ther*. 2017. T. 25, № 9. С. 2189–2201.
 271. de Dios O. и др. NKG2C/KLRC2 tumor cell expression enhances immunotherapeutic efficacy against glioblastoma // *J Immunother Cancer*. 2024. T. 12, № 8. С. e009210.
 272. Sun Y. и др. Adaptive NK Cells Exhibit Tumor-Specific Immune Memory and Cytotoxicity in Ovarian Cancer // *Cancer Immunol Res*. 2025. T. 13, № 7. С. 1080–1097.