
На правах рукописи

Куст Софья Алексеевна

**ПОЛУЧЕНИЕ, АНАЛИЗ СВОЙСТВ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ
СУБПОПУЛЯЦИИ НК-КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HLA-DR**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

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

Научный руководитель:

Коваленко Елена Ивановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ИБХ РАН

Официальные оппоненты:

Филатов Александр Васильевич, д.б.н., заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, профессор кафедры иммунологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Лупатов Алексей Юрьевич, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» Российской академии наук

Ведущая организация:

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

Защита состоится «20» октября 2021 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

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

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г

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



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

НК-клетки являются одним из важнейших компонентов врожденной иммунной системы за счет своей способности проявлять цитотоксическую активность по отношению к перерожденным и вирус-инфицированным клеткам, а также антибактериальную и антимикотическую активность. Кроме того, натуральные киллеры являются регуляторами как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа за счет гуморальных и контактных взаимодействий с другими клетками иммунной системы. Переход НК-клеток из состояния покоя в состояние активации может сопровождаться запуском пролиферации НК-клеток, увеличением их цитотоксического ответа и продукции цитокинов, повышением экспрессии активирующих рецепторов и других поверхностных маркеров. Кроме этого, показано, что при длительном культивировании под воздействием определенных стимулов увеличивается доля НК-клеток, экспрессирующих HLA-DR – подтип MHC класса II (MHC II).

Впервые появление экспрессии HLA-DR на НК-клетках под действием стимулирующих агентов было зарегистрировано более 30 лет назад в общих лейкоцитарных культурах, и с того времени данная молекула часто использовалась как маркер для регистрации активированных НК-клеток. Однако, большинство исследований данного феномена были исключительно описательными, и лишь в немногих работах были предприняты попытки оценить функциональную значимость молекулы HLA-DR для жизнедеятельности НК-клеток. Основная функция этой молекулы на других клетках связана со способностью презентировать антиген (у макрофагов, В-клеток, дендритных клеток). Опубликовано несколько исследований, демонстрирующих способность HLA-DR⁺ НК-клеток, подобно профессиональным антиген-презентирующим клеткам, стимулировать специфичный Т-клеточный ответ на определенные антигены: столбнячный токсин и аллерген домашнего пылевого клеща Der pI, частицы вируса HSV и выделенные из них пептиды, комплекс частиц вируса HCMV с антителом. Повышение уровня HLA-DR-позитивных НК-клеток в тканях и периферической крови зарегистрировано при некоторых патологических состояниях, таких как иммунодефицит на фоне заражения HIV, инфицирование HCMV, рассеянный склероз, системная красная волчанка, что указывает на физиологическую значимость этой субпопуляции *in vivo*. Во многих перечисленных работах данные о высокой экспрессии HLA-DR сопровождалось сообщениями об увеличенной функциональной активности НК-клеток, однако лишь в единичных случаях рассматривалась связь этих двух фактов. В связи с этим, более углубленное исследование HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток представляется актуальной задачей. Изучение их

фенотипических и функциональных особенностей, связи экспрессии HLA-DR с дифференцировкой и пролиферацией NK-клеток, сравнение HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, выделенных из периферической крови *ex vivo* и полученных после наращивания NK-клеток в стимулирующих условиях *in vitro*, выявление механизма индукции экспрессии данной молекулы в NK-клетках поможет оценить роль HLA-DR-позитивных NK-клеток в иммунном ответе. Все вышеперечисленные аспекты крайне мало описаны либо вовсе отсутствуют в литературе в настоящее время.

NK-клетки играют важную роль в иммунном ответе против микобактерий туберкулеза, взаимодействуя с зараженными моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и различными субпопуляциями Т-клеток. При этом, в тканях легких пациентов с туберкулезом отмечено высокое процентное содержание HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток. Помимо этого, показана экспансия данной субпопуляции и увеличение продукции IFN γ в ответ на стимуляцию BCG (*Bacillus Calmette–Guérin*, бацилла Кальметта-Герена) *in vitro*. За счет увеличенной продукции IFN γ , HLA-DR-экспрессирующая субпопуляция NK-клеток, накапливающаяся в легких, может участвовать в локальном ответе на инфекцию. Кроме того, способность NK-клеток напрямую взаимодействовать с элементами клеточных стенок микобактерий ставит вопрос о возможности распознавания HLA-DR-экспрессирующими NK-клетками микобактериальных антигенов и их последующей презентации CD4⁺ Т-клеткам.

Целью работы являлось изучение механизмов появления, фенотипических и функциональных особенностей HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток человека и их иммунологического ответа на антигены микобактерий.

В рамках данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить фенотип и функциональную активность HLA-DR-позитивных NK-клеток человека, выделенных из периферической крови.
2. Оценить пролиферативную способность, а также изменения фенотипа, функциональной и метаболической активности HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции при наращивании NK-клеток *in vitro* в общей популяции и в виде клональных культур.
3. Исследовать механизм индукции экспрессии HLA-DR на поверхности NK-клеток в условиях активации *in vitro*.
4. Провести сравнительный анализ содержания HLA-DR-позитивных NK-клеток в периферической крови пациентов с диагностированным туберкулезом и здоровых людей.

5. Изучить влияние микобактериальных антигенов на экспрессию НК-клетками молекулы HLA-DR, а также на функциональную активность и фенотип HLA-DR-позитивной субпопуляции *in vitro*.
6. Проверить гипотезу о возможной антиген-презентации HLA-DR-позитивными НК-клетками микобактериальных антигенов CD4⁺ Т-клеткам.

Научная новизна работы

В данной работе описано два пула циркулирующих в периферической крови HLA-DR-позитивных НК-клеток, различающихся по функциональной активности: менее дифференцированные клетки HLA-DR⁺CD56^{bright}, и более зрелые клетки HLA-DR⁺CD56^{dim}CD57⁺. Выявлено, что *in vitro*, среди всех исследованных методов стимуляции, наибольшее увеличение доли HLA-DR-позитивных НК-клеток происходит при использовании разработанной нами методики стимуляции на основе IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21. Показана связь между экспрессией HLA-DR на НК-клетках и продукцией ими IFN γ *ex vivo* и *in vitro*, в том числе положительная корреляционная зависимость между этими двумя параметрами. Выявлено, что при экспансии НК-клеток *in vitro* экспрессия HLA-DR ассоциирована с более интенсивной дегрануляцией по отношению к фидерным клеткам, высокой пролиферативной активностью, более высокой экспрессией рецепторов NKG2D, CD86. Впервые показано, что *in vitro* экспрессия HLA-DR может запускаться не только экзогенным IL-21, но и индуцированным им эндогенным IFN γ . Индукция экспрессии происходит по STAT3- и ERK1/2-зависимому пути через активацию изоформы 3 транскрипционного фактора СИТА.

Выявлено, что в крови пациентов, больных туберкулезом, доля HLA-DR⁺ НК-клеток повышена по сравнению со здоровыми донорами. По результатам работы *in vitro* показано, что в ответ на стимуляцию разрушенными бактериями *M. tuberculosis* происходит экспансия NKG2A⁺CD57⁻KIR⁻HLA-DR⁺ НК-клеток, интенсивнее продуцирующих IFN γ в ответ на микобактериальные антигены, чем HLA-DR-негативные НК-клетки. Впервые продемонстрировано, что HLA-DR-позитивные НК-клетки способны запускать специфическую активацию CD4⁺ Т-клеток после предварительной инкубации с разрушенными микобактериями, однако с меньшей эффективностью, чем профессиональные антиген-презентирующие клетки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данной работы заключается в расширении знаний о мало описанной в литературе, однако часто встречающейся *in vivo* и *in vitro* субпопуляции НК-клеток, экспрессирующих на своей поверхности молекулу HLA-DR. На протяжении многих лет данная молекула в контексте

изучения NK-клеток использовалась исключительно как маркер их активации, и единичные работы были посвящены изучению различных биологических особенностей HLA-DR-позитивной субпопуляции. Полученные данные о фенотипе, стадиях дифференцировки, функциональной, пролиферативной и метаболической активности HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток человека дополняют имеющиеся представления об иммунологической роли NK-клеток.

Практическая значимость данной работы связана со все возрастающей заинтересованностью в применении NK-клеток в адоптивной иммунотерапии. Наиболее перспективные в данной области методические подходы предполагают использование NK-клеток, предварительно размноженных и активированных *in vitro*. Опираясь на уже опубликованные в литературе и полученные нами данные о появлении экспрессии HLA-DR на NK-клетках при стимуляции, можно утверждать, что существующие на данный момент способы наращивания NK-клеток будут приводить к значительному увеличению доли HLA-DR-экспрессирующих клеток в культуре, что необходимо учитывать при разработке методов получения NK-клеточного терапевтического продукта. Помимо этого, HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки сами по себе могут стать перспективным агентом для использования в иммунотерапии за счет возможности комбинированного использования киллерной и антиген-презентирующей активности. В данной работе предлагается эффективный метод экспансии субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁺ с использованием IL-2 и фидерной клеточной линии K562-mbIL21.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Исследования проведены с помощью современных методов и подходов: проточной цитометрии, клеточной сортировки, РНК-секвенирования, ОТ-ПЦР, иммуноферментного анализа, пролиферативных и цитотоксических тестов, биолюминесцентного анализа. Эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов. Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики в соответствии с числом сравниваемых параметров и нормальным либо ненормальным распределением данных. Научные положения, выводы и практические предложения построены на основе достоверных результатов исследований, подтвержденных первичной документацией.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 174 страницах и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 199 ссылок. Диссертация содержит 28 рисунков и 7 таблиц.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: XXVII, XXVIII, XXIX, XXX и XXXI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2015, 2016, 2017, 2018, 2019, Москва, Россия); всероссийский научный форум с международным участием «Дни иммунологи в Санкт-Петербурге» (2015, 2017, Санкт-Петербург, Россия); международный конгресс International Congress of Immunology (2016, Мельбурн, Австралия); международный симпозиум Natural Killer Cell Symposium (2017, Дюссельдорф, Германия; 2018, Гамбург, Германия); международный конгресс The 5th European Congress of Immunology (2018, Амстердам, Нидерланды); международная конференция 18th Meeting of the Society for Natural Immunity (2019, Люксембург, Люксембург).

По материалам работы опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Литературный обзор

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и включает в себя три раздела. Первый раздел посвящен описанию фенотипических и функциональных особенностей НК-клеток. Во втором разделе представлена имеющаяся информация по HLA-DR-экспрессирующим НК-клеткам в норме и при патологии. Третий раздел посвящен роли НК-клеток в иммунном ответе на микобактерию туберкулеза, и возможности участия HLA-DR-позитивной субпопуляции в этом процессе.

2 Экспериментальная часть

2.1 Экспрессия HLA-DR *in vivo* на НК-клетках различной степени дифференцировки

На первом этапе была проанализирована взаимосвязь между уровнем поверхностной экспрессии HLA-DR в НК-клетках периферической крови и стадиями дифференцировки НК-клеток, которые были определены в соответствии с экспрессией маркеров CD56 и CD57 (рис. 1А): CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻, CD56^{dim}CD57⁺.

Доля HLA-DR-позитивных клеток была значительно выше среди НК-клеток CD56^{bright}, чем CD56^{dim}, у всех обследованных добровольцев (рис. 1Б). Однако у части доноров наблюдалась увеличенная доля HLA-DR-позитивных НК-клеток также в субпопуляциях CD56^{dim}CD57⁺ и CD56^{dim}CD57⁻ (группа 2), по сравнению с другими донорами (группа 1, рис. 1Б). У доноров из группы 2 в

целом наблюдался повышенный уровень общего количества HLA-DR-позитивных НК-клеток в периферической крови (рис. 1В), и большую часть этих клеток составляли НК-клетки из субпопуляции $CD56^{dim}CD57^{+}$ (рис. 1Г).

Повышенная экспрессия HLA-DR на менее зрелых НК-клетках $CD56^{bright}$ может быть связана с прохождением определенного этапа дифференцировки, либо являться результатом взаимодействия с микроокружением в тканях перед тем, как клетки $CD56^{bright}$ попадают в кровоток. Для более зрелых НК-клеток $CD56^{dim}$ появление экспрессии HLA-DR может входить в комплекс реакций при распознавании измененных клеток, в том числе зараженных HCMV.

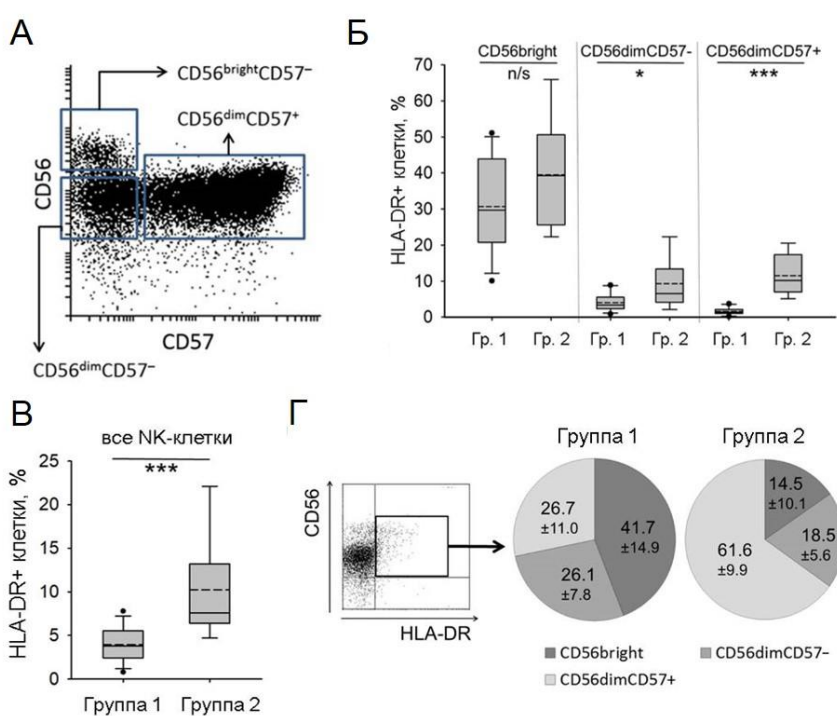


Рис. 1. Анализ экспрессии HLA-DR в свежесыделенных НК-клетках. (А) Субпопуляции НК-клеток на разных стадиях дифференцировки, выбранные для анализа экспрессии HLA-DR. (Б, В) Доля HLA-DR⁺ НК-клеток в субпопуляциях $CD56^{bright}$, $CD56^{dim}CD57^{-}$ и $CD56^{dim}CD57^{+}$ (Б) и в целой популяции НК-клеток (В) у доноров из групп 1 и 2. (Г) Доли НК-клеток на разных стадиях дифференцировки во фракции HLA-DR⁺ у доноров из групп 1 и 2.

2.2 Экспрессия HLA-DR на НК-клетках NKG2C⁺

Была проанализирована доля HLA-DR-позитивных клеток и уровень экспрессии HLA-DR *ex vivo* в субпопуляциях НК-клеток, экспрессирующих рецептор NKG2C, на разных стадиях дифференцировки, в частности, в субпопуляции терминально дифференцированных НК-клеток $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$, проявляющих признаки клеток памяти: повышенный пролиферативный и функциональный ответ при повторной встрече с патогеном. Экспансию NKG2C-экспрессирующих НК-клеток связывают с реакцией организма на инфицирование цитомегаловирусом. Установлено, что в субпопуляциях НК-клеток $CD56^{dim}CD57^{-}NKG2C^{+}$ и $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$ процентная доля HLA-DR-позитивных клеток значительно выше, чем в соответствующих субпопуляциях $NKG2C^{-}$ (рис. 2). Кроме того, клетки $CD56^{dim}CD57^{-}NKG2C^{+}$ и $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$ демонстрировали более

высокую интенсивность экспрессии данного маркера, независимо от HCMV-статуса донора. Можно предположить, что реактивация вируса в организме и развитие соответствующего иммунного ответа приводит к активации и экспансии адаптивных НК-клеток и их менее дифференцированных потенциальных предшественников, ко-экспрессирующих NKG2C и HLA-DR.

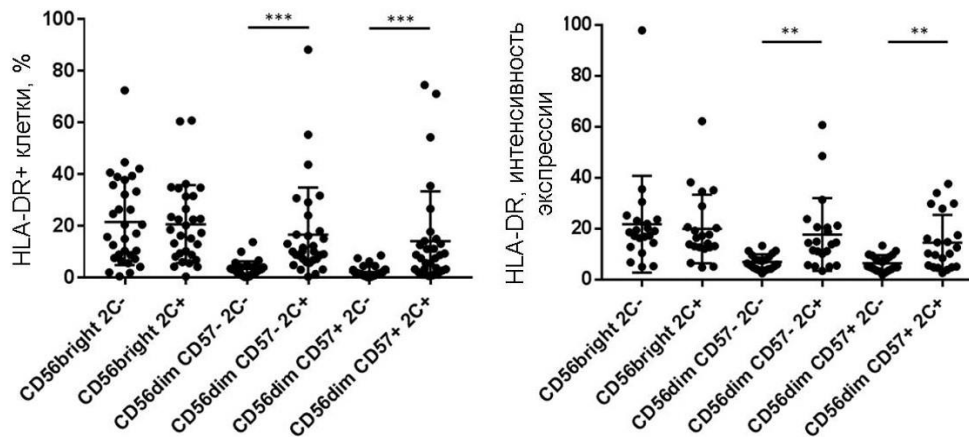


Рис. 8. Доля HLA-DR-позитивных клеток и интенсивность экспрессии HLA-DR в субпопуляциях НК-клеток NKG2C⁺ и NKG2C⁻ на разных стадиях дифференцировки.

2.3 Сравнительное РНК-секвенирование HLA-DR-позитивных и негативных НК-клеток

Для анализа сходств и различий между HLA-DR-экспрессирующими НК-клетками из менее дифференцированной субпопуляции CD56^{bright} и терминально дифференцированной «адаптивной» субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ было проведено РНК-секвенирование образцов предварительно отсортированных свежевыделенных НК-клеток HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺ из соответствующих фракций.

В целом, НК-клетки CD56^{bright}HLA-DR⁺ меньше отличались по дифференциальной экспрессии генов от клеток CD56^{bright}HLA-DR⁻, чем клетки CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ от клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻HLA-DR⁻ (рис. 3). Тем не менее, HLA-DR⁺ НК-клетки из обеих субпопуляций демонстрировали ряд сходных признаков: сниженную экспрессию некоторых генов, связанных с цитотоксичностью, сниженную экспрессию KIR, но увеличенную экспрессию IFN γ по сравнению с соответствующими клетками HLA-DR⁻. При этом, в НК-клетках CD56^{bright}HLA-DR⁺ была увеличена экспрессия ряда генов, указывающих на активную пролиферацию и хоуминг в очаги воспаления (рис. 3). Судя по паттерну экспрессии генов НК-клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺, данные клетки склонны к подвижности и миграции, в том числе, в ткани и лимфоузлы, а также экспрессируют более широкий спектр компонентов антиген-презентирующей системы и больше ингибирующих рецепторов, по сравнению с клетками CD56^{bright}HLA-DR⁺

(рис. 3). Возможно, именно более дифференцированные HLA-DR-позитивные NK-клетки способны контактировать с Т-клетками и, вероятно, осуществлять антиген-презентацию *in vivo*, и наличие широкого спектра ингибирующих рецепторов в таком случае защищает их от аутореактивности при близком контакте. Не исключено, что активно делящиеся и накапливающиеся в очагах воспаления NK-клетки CD56^{bright}HLA-DR⁺ могут впоследствии дифференцироваться в клетки CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ и служить дополнительными активаторами Т-клеточного адаптивного звена.

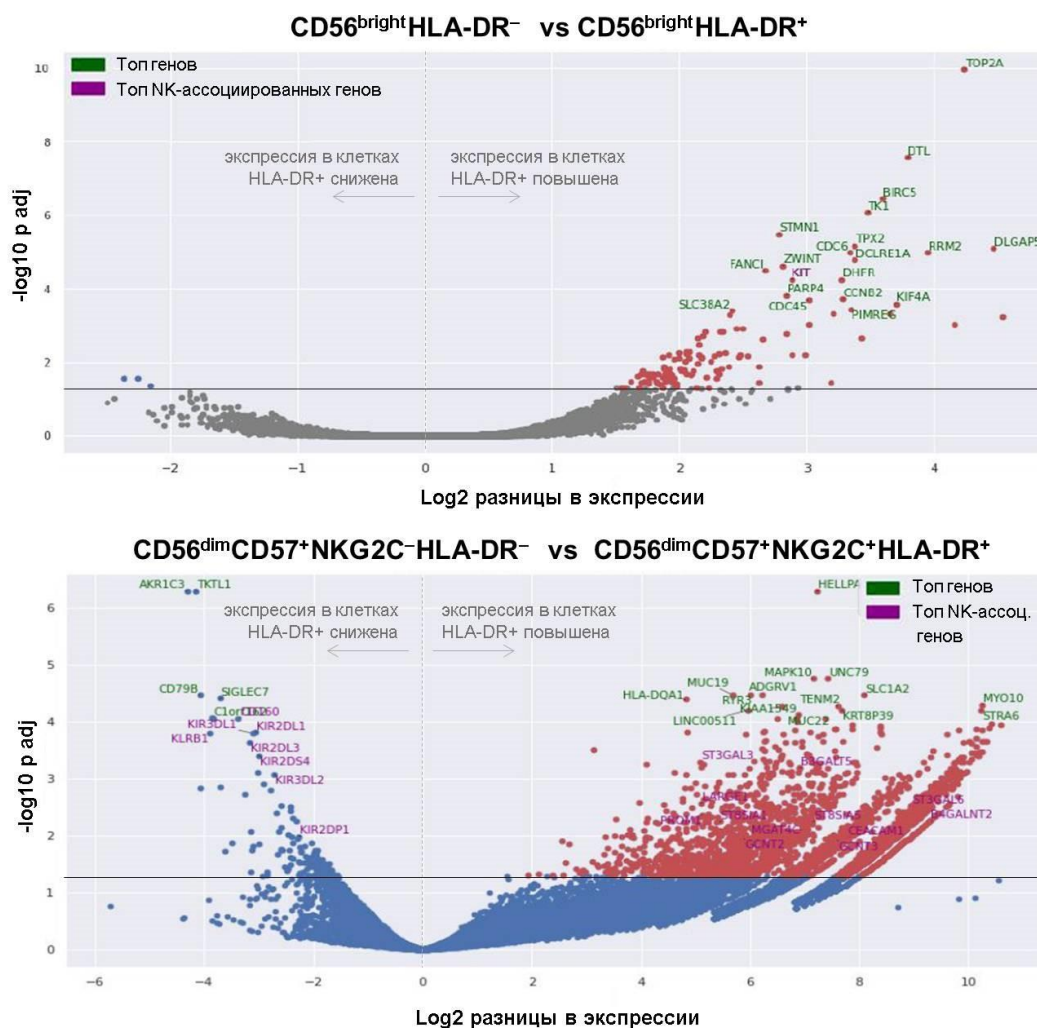


Рис. 3. Сравнительная дифференциальная экспрессия генов между NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ из субпопуляций CD56^{bright} и CD56^{dim}CD57⁺. Черной линией отмечена граница достоверности различий, выше которой располагаются точки со значением $P_{adj} \leq 0,05$.

2.4 Анализ функциональных свойств свежевыделенных HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток

Была проведена оценка способности свежевыделенных из крови здоровых людей HLA-DR-позитивных и негативных NK-клеток продуцировать IFN γ в ответ на стимуляцию IL-12 и IL-15, а также проведен анализ их антитело-зависимой и естественной цитотоксичности после предварительной стимуляции IL-2. NK-клетки CD56^{dim}HLA-DR⁺, обогащенные с помощью

клеточной сортировки, демонстрировали более высокий уровень продукции IFN γ (рис. 4А, Б), но менее эффективную антитело-зависимую дегрануляцию, чем NK-клетки CD56^{dim}HLA-DR⁻ (рис. 4В). Естественная цитотоксическая активность не различалась среди NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ из субпопуляций CD56^{bright} и CD56^{dim}.

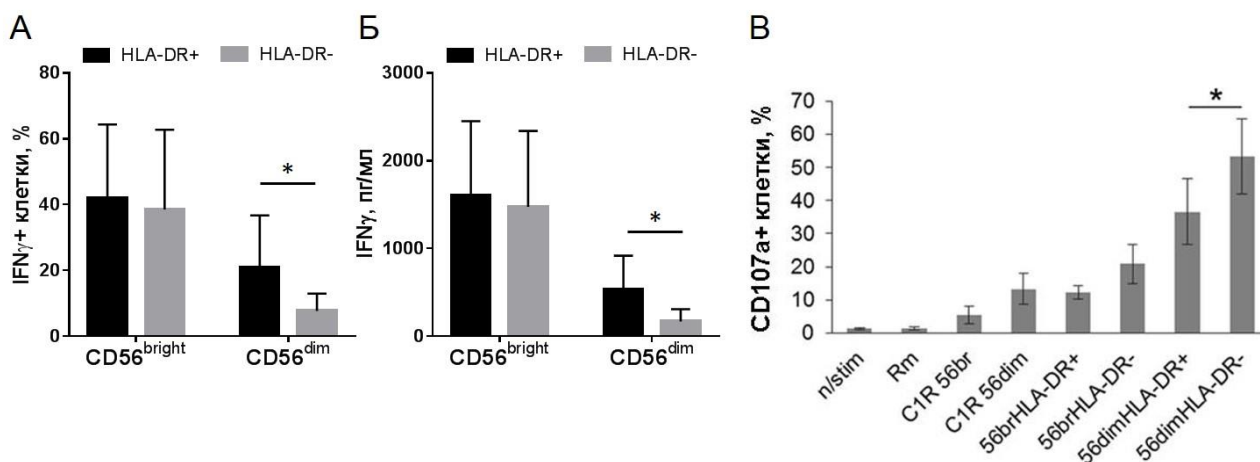


Рис. 4. Функциональная активность предварительно отсортированных NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ из субпопуляций CD56^{bright} и CD56^{dim}. Продукцию IFN γ измеряли с помощью внутриклеточного окрашивания (А) и ИФА (Б) после предварительной стимуляции IL-12+IL-15. (В) Антитело-зависимая цитотоксическая активность субпопуляций NK-клеток CD56^{bright}HLA-DR⁻, CD56^{bright}HLA-DR⁺, CD56^{dim}HLA-DR⁻, CD56^{dim}HLA-DR⁺ по отношению к клеткам C1R после предварительной стимуляции IL-2.

2.5 Экспансия HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток *in vitro*

С целью изучения изменений в экспрессии HLA-DR при длительном культивировании NK-клеток, что актуально при экспансии и подготовке клеток с определенными характеристиками для клинического применения, была проанализирована поверхностная экспрессия HLA-DR на NK-клетках, стимулированных в течение 6 дней следующими факторами: IL-2, фидерные клетки K562, экспрессирующие мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21), немодифицированные фидерные клетки K562, растворимый IL-21 и различные комбинации перечисленных стимулов. Было зарегистрировано увеличение доли HLA-DR-позитивных NK-клеток во всех группах образцов на 3-й и 6-ой день культивирования, а затем доля HLA-DR⁺ клеток оставалась примерно на том же уровне до 9-го дня (рис. 5А, Б). Тем не менее, наиболее значительное увеличение уровня HLA-DR-позитивных клеток вызывала комбинация IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21 (рис. 5Б). Увеличение доли NK-клеток HLA-DR⁺ в образцах с растворимыми цитокинами IL-2, IL-21 и немодифицированными фидерными клетками K562 свидетельствует о том, что появление HLA-DR-экспрессирующих клеток зависит как от взаимодействия с

фидерными клетками, так и от стимуляции ИЛ-21; использование фидерных клеток с мембраносвязанным ИЛ-21, следовательно, позволяет максимально усилить стимуляцию.

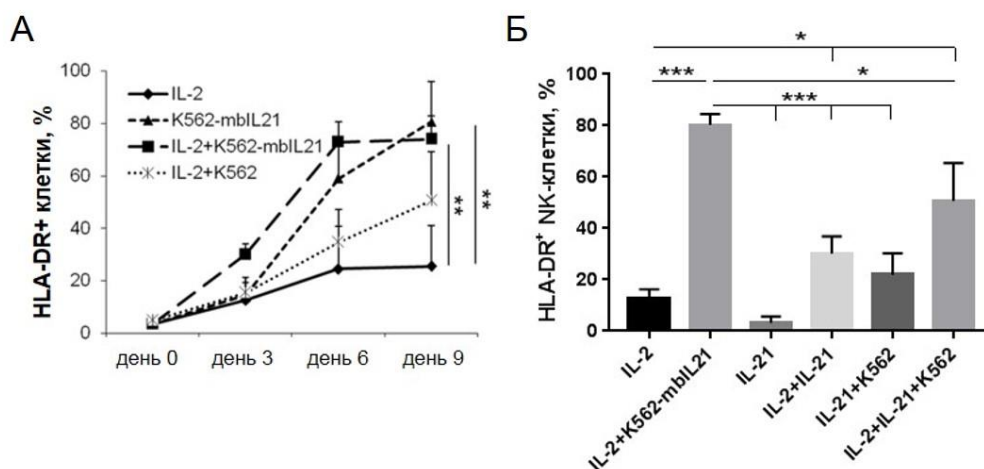


Рис. 5. Увеличение экспрессии HLA-DR на NK-клетках в условиях стимуляции. (А) Динамика экспрессии HLA-DR во время инкубации с указанными стимулами. (Б) Сравнение влияния растворимого и мембраносвязанного ИЛ-21 на экспрессию HLA-DR в NK-клетках. Представлена доля NK-клеток HLA-DR⁺ на 6-ой день инкубации с указанными стимулами.

2.6 Стимуляция ИЛ-2 и/или mbIL-21 индуцирует как экспрессию HLA-DR в HLA-DR-негативных NK-клетках, так и активную пролиферацию HLA-DR-позитивной субпопуляции NK-клеток

С помощью полуколичественной ОТ-ПЦР гена α -субъединицы HLA-DR до и после стимуляции ИЛ-2 либо ИЛ-2+K562-mbIL21, а также путем культивирования предварительно отсортированной субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁻ *in vitro* в течение 6 дней с различными стимулами (рис. 6А) было зарегистрировано появление экспрессии HLA-DR на изначально негативных NK-клетках и ее увеличение в процессе культивирования в условиях стимуляции (рис. 6А, Б). Наблюдаемый эффект был подтвержден на клональных популяциях NK-клеток (рис. 6В), полученных как из общей культуры NK-клеток, так и из отсортированной субпопуляции CD56⁺HLA-DR⁻.

В другой серии экспериментов было показано, что при всех использованных способах стимуляции интенсивность пролиферации клеток HLA-DR⁺ была либо достоверно выше, чем у клеток HLA-DR⁻, либо, по крайней мере, наблюдалась такая тенденция (рис. 6Г). Таким образом, экспрессия HLA-DR тесно связана с пролиферацией NK-клеток, и особенно интенсивная экспансия наблюдается в ответ на стимуляцию фидерными клетками K562-mbIL21.

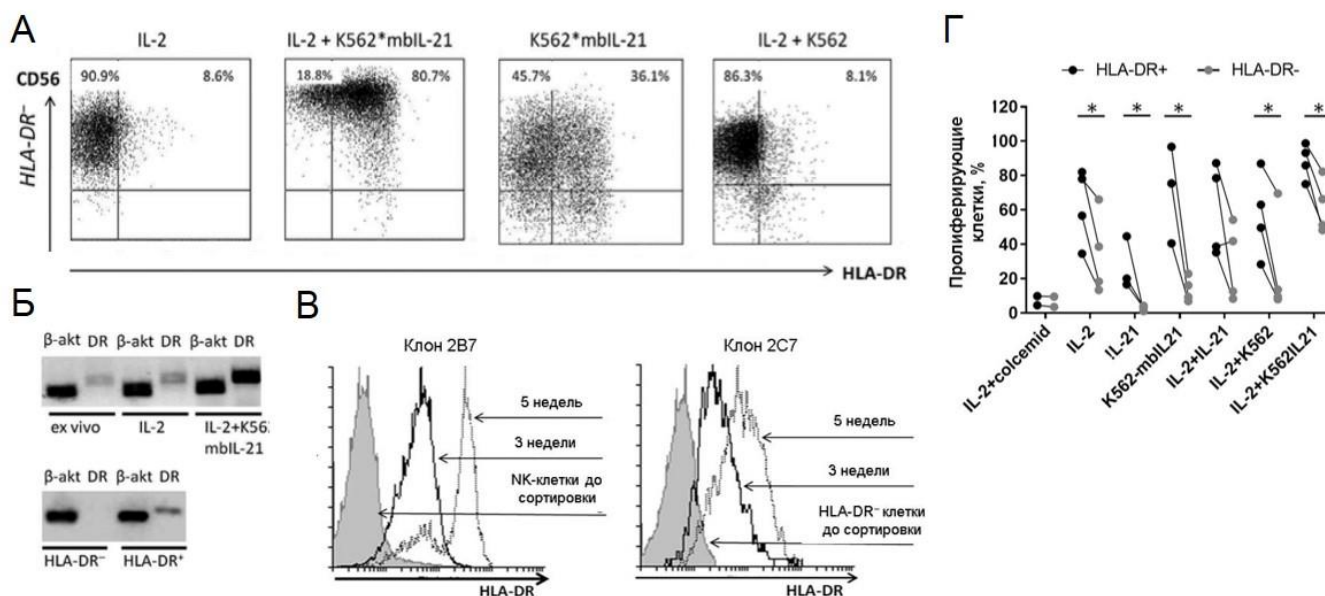


Рис. 6. Стимуляция NK-клеток IL-2 и/или K562-mbIL21 индуцирует экспрессию HLA-DR на HLA-DR-негативных клетках. (А) Экспрессия HLA-DR в субпопуляциях NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с указанными стимулами. (Б) Уровень мРНК α-субъединицы HLA-DR в NK-клетках, свежесыведенных и через 6 дней инкубации с указанными стимулами (верхний ряд), а также в свежесыведенных субпопуляциях HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ непосредственно после сортировки (нижний ряд). (В) Изменения экспрессии HLA-DR в клонах, полученных из несортированных NK-клеток и отсортированной субпопуляции HLA-DR⁻ NK-клеток). (Г) Пролиферация NK-клеток при различных методах стимуляции, измеренная по потере окрашивания CFSE после 7 дней инкубации с указанными стимулами.

2.7 Анализ механизма индукции экспрессии HLA-DR в NK-клетках

Было выявлено, что при стимуляции NK-клеток IL-2 и растворимым IL-21 в течение 6 дней в присутствии растворимой формы рекомбинантного человеческого рецептора к IL-21 (rhIL-21R) блокируется IL-21-обусловленный эффект повышения экспрессии HLA-DR, и процентная доля HLA-DR-экспрессирующих клеток достигает уровня образца с IL-2 (рис. 6А). В присутствии антител к рецептору IFN γ первого типа (anti-IFN γ R1) также было зарегистрировано достоверное снижение доли HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток и интенсивности экспрессии данной молекулы по сравнению с образцами без блокатора (рис. 7А). Данный эффект указывает на то, что, по крайней мере частично, индукция экспрессии HLA-DR в NK-клетках, активированных IL-2 и IL-21, происходит за счет IL-21-зависимого запуска синтеза IFN γ , который, в свою очередь, связывается с собственными рецепторами IFN γ на поверхности NK-клеток (аутоstimуляция) и запускает повышение экспрессии HLA-DR.

Для анализа внутриклеточных сигнальных путей, участвующих в индукции экспрессии HLA-DR, нами были выбраны селективные ингибиторы транскрипционных факторов STAT1, STAT3 и ERK1/2 – флударабина фосфат,

криптотаншинон и FR180204, соответственно, которые добавлялись к НК-клеткам при стимуляции IL-2 и растворимым IL-21 в течение 6 дней. Было выявлено, что блокировка сигнального пути JAK1/3-STAT1, активирующегося в том числе при взаимодействии IFN γ -IFN γ R, не влияет на экспрессию HLA-DR в НК-клетках (рис. 7Б). Возможно, при его блокировке активно задействуются компенсаторные пути, например, Ras/Raf/Mek/ERK1/2. Добавление в систему FR180204, блокатора ERK1/2, показало, что активация сигнального пути Ras/Raf/Mek/ERK1/2, являющегося общим для IFN γ R и IL-21R, необходима для индукции экспрессии HLA-DR (рис. 7Б). Блокировка сигнального пути JAK1/3-STAT3, который является основным при передачи сигнала от IL-21R, также влияла на экспрессию HLA-DR, по крайней мере частично (рис. 7Б). Таким образом, на внутриклеточном уровне запуск экспрессии HLA-DR в НК-клетках при стимуляции IL-2+IL-21 опосредуется транскрипционными факторами ERK1/2 и STAT3, которые, по всей видимости, запускают экспрессию или регулируют активность основного транскрипционного фактора МНС класса II – СИТА.

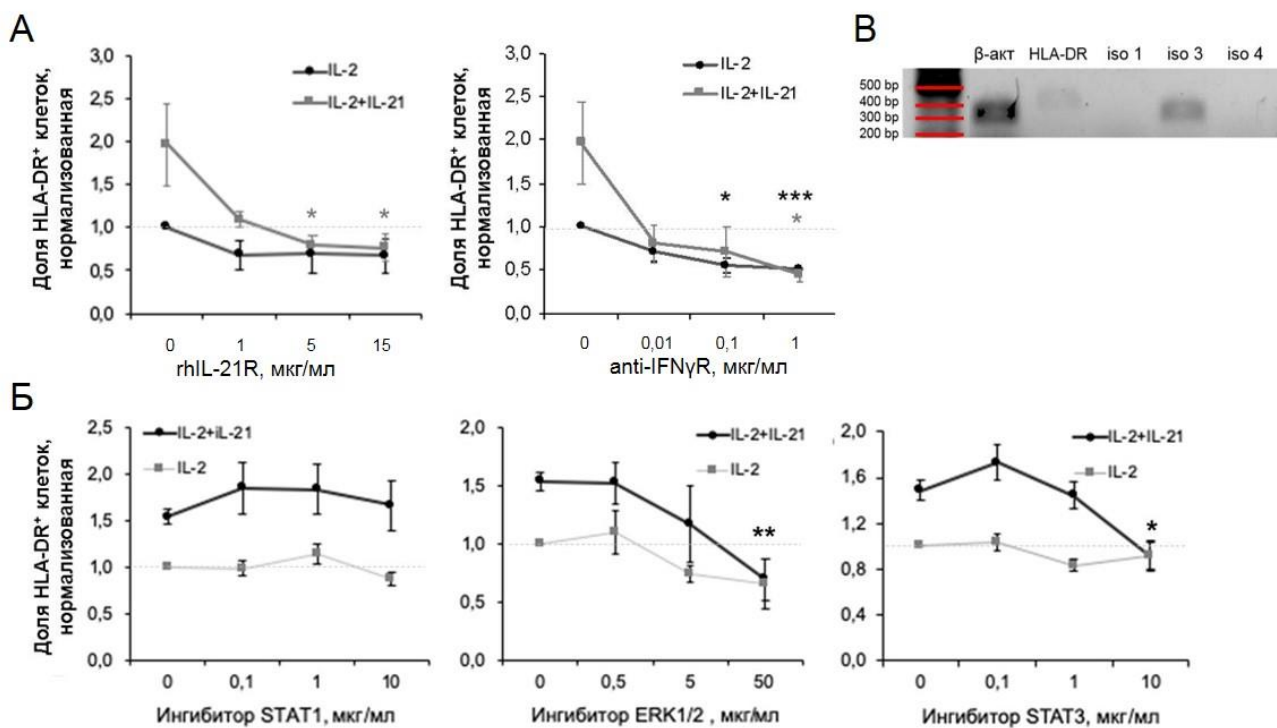


Рис. 7. Анализ механизма индукции экспрессии HLA-DR в НК-клетках. Влияние (А) блокаторов rhIL-21R, anti-IFN γ R1 и (Б) ингибиторов транскрипционных факторов STAT1, ERK1/2 и STAT3 в указанных концентрациях на процентное содержание HLA-DR-позитивных НК-клеток в культуре при стимуляции IL-2±IL-21. Представлены усредненные данные пяти экспериментов, нормализованные на значения в контрольных образцах только с IL-2. (В) Результат ОТ-ПЦР анализа, демонстрирующий экспрессию в НК-клетках изоформы 3 белка СИТА. β -акт - β -актин (положительный контроль).

Подбор праймеров к месту контакта экзонов 1 и 2 изоформ I, III и IV гена СИТА и последующее проведение ОТ-ПЦР анализа позволило определить, что

в НК-клетках экспрессируется изоформа III регулятора СИТА (рис. 7В) – та же изоформа, что и в Т-клетках при активации, что, по-видимому, является следствием их происхождения из общих клеток-предшественников.

2.8 Анализ фенотипа, метаболической и функциональной активности HLA-DR-позитивных НК-клеток, полученных в культуре *in vitro*

Был проведен сравнительный анализ экспрессии ряда фенотипических маркеров на НК-клетках HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ через 3 или 6 дней культивирования со следующими комбинациями стимулов: IL-2+K562-mbIL21, IL-2+K562 или IL-2+IL-21. Среди НК-клеток HLA-DR⁺ была зарегистрирована более высокая доля CD107a-позитивных клеток и более высокий уровень экспрессии рецептора NKG2D по сравнению с НК-клетками HLA-DR⁻ во всех образцах, которые содержали фидерные клетки (рис. 8А). CD107a является маркером дегрануляции НК-клеток, а рецептор NKG2D участвует в активации естественного цитотоксического ответа; таким образом, HLA-DR-позитивные НК-клетки, полученные при стимуляции IL-2+K562-mbIL21 или IL-2+K562, проявляли интенсивную естественную цитотоксичность в отношении обоих типов фидерных клеток в процессе культивирования. Помимо этого, среди

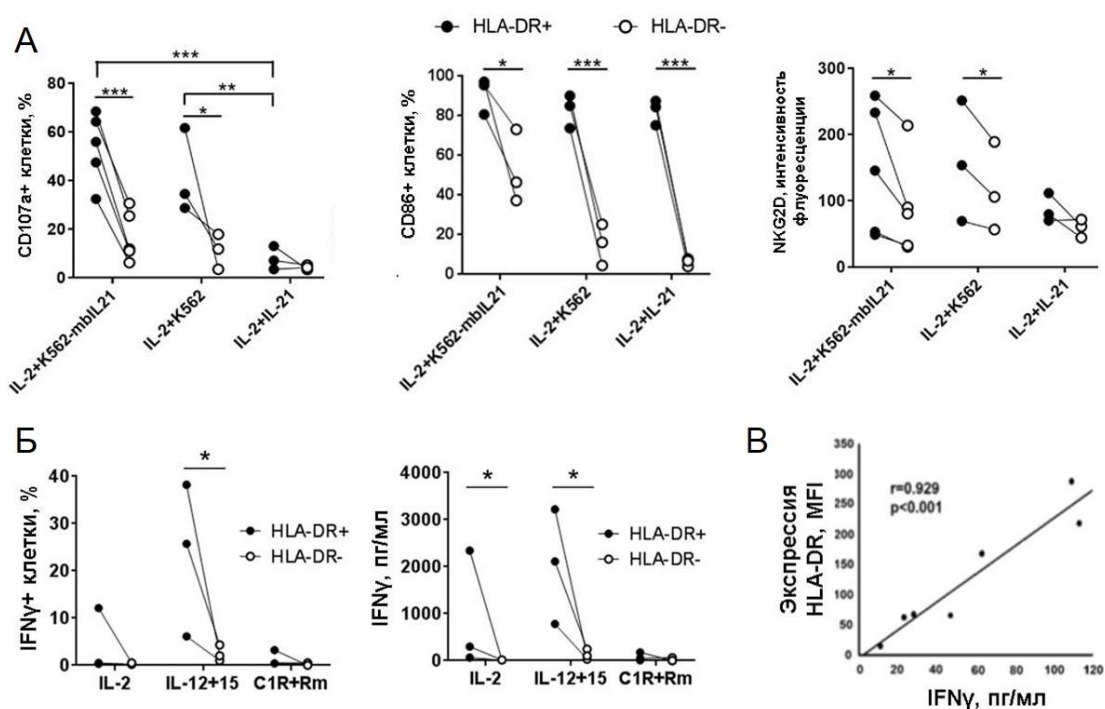


Рис. 8. Анализ фенотипа, метаболической и функциональной активности HLA-DR-позитивных НК-клеток, полученных *in vitro*. (А) Процент НК-клеток, экспрессирующих CD107a, CD86 и интенсивность экспрессии NKG2D, измеренные после 3- или 6-дневной стимуляции IL-2+K562-mbIL-21, IL-2+K562 или IL-2+IL-21 в субпопуляциях HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻. (Б) Продукция IFN γ , измеренная методом внутриклеточного окрашивания и ИФА, в HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных НК-клетках, полученных после 4 дней стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 *in vitro* и ре-стимулированных указанными стимулами. (В) Корреляционная зависимость между экспрессией HLA-DR и продукцией IFN γ в клонах НК-клеток, полученных при стимуляции IL-2+K562-mbIL21.

HLA-DR-позитивных NK-клеток была значительно повышена доля клеток CD86⁺ при всех используемых вариантах стимуляции (рис. 8А), что свидетельствует о приобретении HLA-DR⁺ NK-клетками, полученными при стимуляции *in vitro*, дополнительных ко-стимулирующих молекул, необходимых для потенциальной реализации антигенпрезентации.

Функциональные тесты показали, что HLA-DR-позитивные NK-клетки, полученные после 4-х дней стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21, лучше продуцируют IFN γ , чем HLA-DR-негативные, у всех обследованных доноров (рис. 8Б). При анализе IFN γ -продуцирующей активности клонов NK-клеток, полученных в условиях стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21, было выявлено, что все клональные популяции NK-клеток продуцировали данный цитокин. При этом, количество синтезированного клоном IFN γ находилось в прямой корреляционной зависимости от уровня экспрессии HLA-DR на клетках данного клона (рис. 8Б).

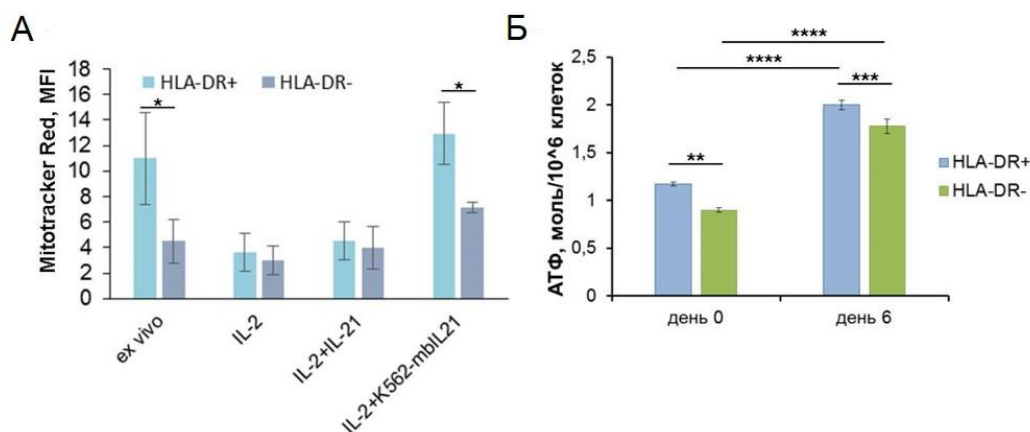


Рис. 9. Сравнение метаболической активности HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ NK-клеток. (А) Объем митохондриальной массы и (Б) содержание АТФ в HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ субпопуляциях непосредственно после выделения и через 6 дней культивирования с указанными стимулами.

При анализе метаболических характеристик было выявлено, что объем митохондриальной массы у HLA-DR-позитивных NK-клеток был выше, чем у HLA-DR-негативных, как *ex vivo*, так и после стимуляции NK-клеток IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 в течение 6 дней (рис. 9А). Продукция АТФ в NK-клетках HLA-DR⁺ также была достоверно выше, чем в клетках HLA-DR⁻ как непосредственно после выделения, так и после 6 дней культивирования с IL-2+IL-21 (рис. 9Б). Кроме того, продукция АТФ в обеих субпопуляциях увеличивалась на 6-й день активации по сравнению с продукцией *ex vivo*. Полученные данные свидетельствуют об увеличенной метаболической активности HLA-DR-позитивной субпопуляции NK-клеток.

2.9 HLA-DR-позитивные НК-клетки в крови пациентов, больных туберкулезом

Выявлено, что доля HLA-DR-экспрессирующих клеток среди всех НК-клеток ($CD56^+CD3^-$, рис. 10А), а также NKT-подобных клеток ($CD56^+CD3^+$, рис. 10Б) в среднем у больных туберкулезом достоверно выше, чем у здоровых доноров. У больных туберкулезом также наблюдалось пониженное содержание HLA-DR⁺ клеток во фракции $CD3^-CD56^-$ (у здоровых доноров данную фракцию в основном представляют В-клетки) (рис. 10В) и сниженная доля Т-клеток $CD3^+CD56^-$ (рис. 10Г), что в целом указывает на угнетенное состояние адаптивной иммунной системы. Можно предположить, что в данных условиях HLA-DR-позитивные НК-клетки будут играть важную роль при развитии иммунного ответа против *M. tuberculosis*, в том числе, возможно, компенсируя недостатки адаптивного звена.

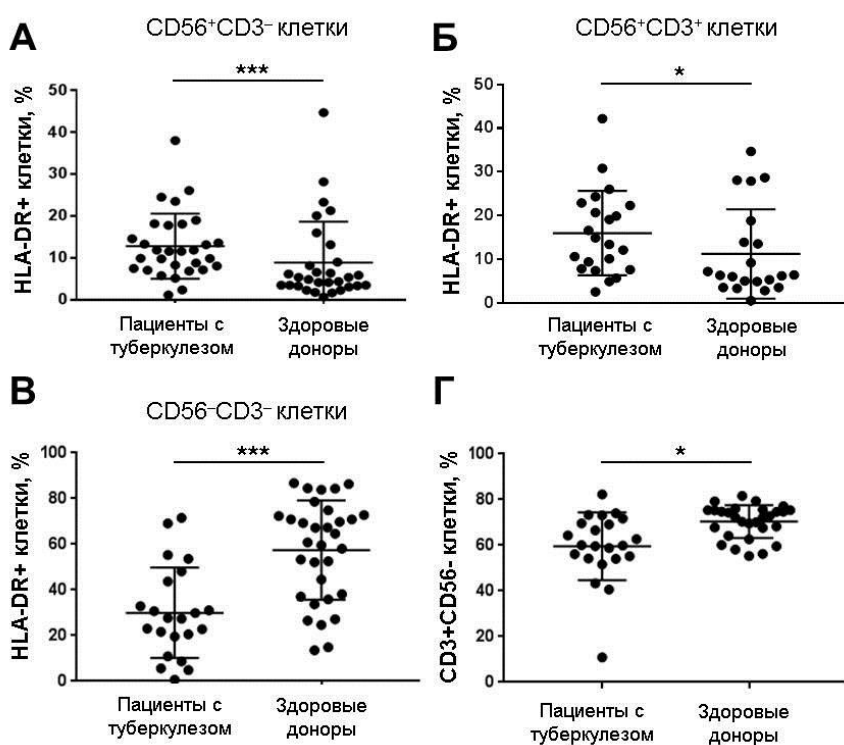


Рис. 10. Анализ доли HLA-DR⁺ клеток в популяциях НК-клеток (А), NKT-подобных клеток (Б) и во фракции $CD3^-CD56^-$ клеток (В) и сравнение доли $CD3^+CD56^-$ Т-клеток (Г) в крови здоровых доноров и пациентов с первично диагностированным туберкулезом.

2.10 HLA-DR⁺ НК-клетки интенсивнее продуцируют IFN γ в ответ на *M. tuberculosis*

Как у здоровых, так и у больных туберкулезом доноров, в культуре РВМС HLA-DR-позитивные НК-клетки демонстрировали более интенсивную продукцию IFN γ в ответ на 24-часовую стимуляцию разрушенными ультразвуком клетками *M. tuberculosis* (соникатом), по сравнению с HLA-DR-негативными НК-клетками (рис. 11А). В то же время, в культуре изолированных НК-клеток наблюдалось ингибирование продукции IFN γ после 24 ч инкубации с IL-2 и микобактериальными антигенами, как в HLA-DR⁺, так

и в HLA-DR⁻ субпопуляциях, в широком диапазоне концентраций сониката – от 0,25 до 10 мкг/мл. По-видимому, в отсутствие клеточного микроокружения (PBMC) функционирование и жизнедеятельность как HLA-DR⁺, так и HLA-DR⁻ NK-клеток существенно подавляется продуктами разрушенных микобактерий.

После предварительной активации IL-2+IL-21 в течение 7 дней HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки сохраняли высокий уровень продукции IFN γ даже в присутствии сониката, и в субпопуляции HLA-DR⁺ вновь было зарегистрировано значительно больше IFN γ -продуцирующих клеток, чем в субпопуляции HLA-DR⁻ (рис. 11Б). После длительного контакта с разрушенными микобактериями (стимуляция IL-2 и соникатом в течение 7 дней) и последующей ре-стимуляции цитокинами было выявлено, что, во-первых, HLA-DR-позитивные NK-клетки после культивирования с соникатом интенсивнее отвечают на ре-стимуляцию путем продукции интерферона, чем клетки, культивированные без сониката; во-вторых, среди HLA-DR⁺ NK-клеток было больше IFN γ -продуцирующих, чем среди клеток HLA-DR⁻ как в экспериментальном, так и в контрольном образце (рис. 11В).

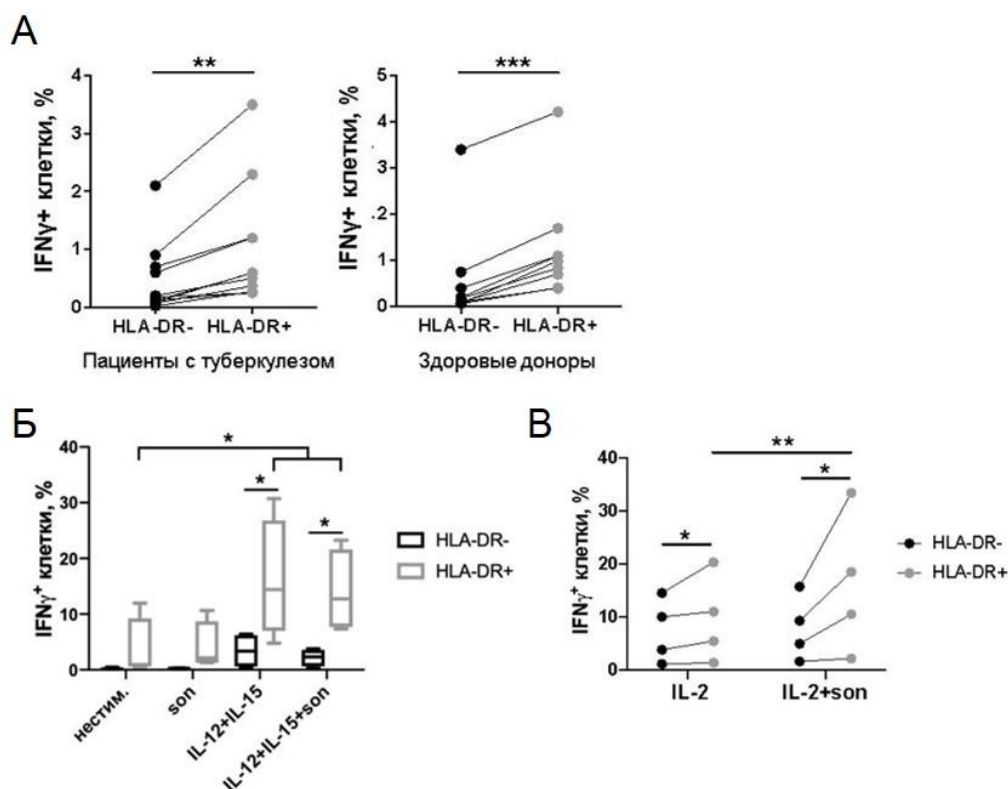


Рис. 11. Функциональный ответ NK-клеток на стимуляцию соникатом *M. tuberculosis*. (А) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ в культуре PBMC пациентов с туберкулезом и здоровых доноров в ответ на 24-часовую стимуляцию соникатом. (Б) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с IL-2+IL-21 и ре-стимуляции IL-12+IL-15 и соникатом. (В) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с IL-2±соникатом и ре-стимуляции IL-12+IL-15 в течение 20 ч.

Согласно полученным данным, как выделенные *ex vivo*, так и полученные *in vitro* HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки представляют собой субпопуляцию, которая активно реагирует на распознавание *M. tuberculosis* продукцией IFN γ . Однако, ввиду ингибирующего воздействия сониката микобактерий (предположительно, за счет высвобождающихся при разрушении клеток факторов вирулентности), для проявления своих функций HLA-DR⁺ НК-клеткам был необходим либо контакт с микроокружением (PBMC), либо предварительная активация цитокинами, либо ре-стимуляция после первичного контакта с разрушенными бактериями.

2.11 Субпопуляция менее зрелых, NCR-экспрессирующих HLA-DR⁺ НК-клеток пролиферирует в ответ на *M. tuberculosis*

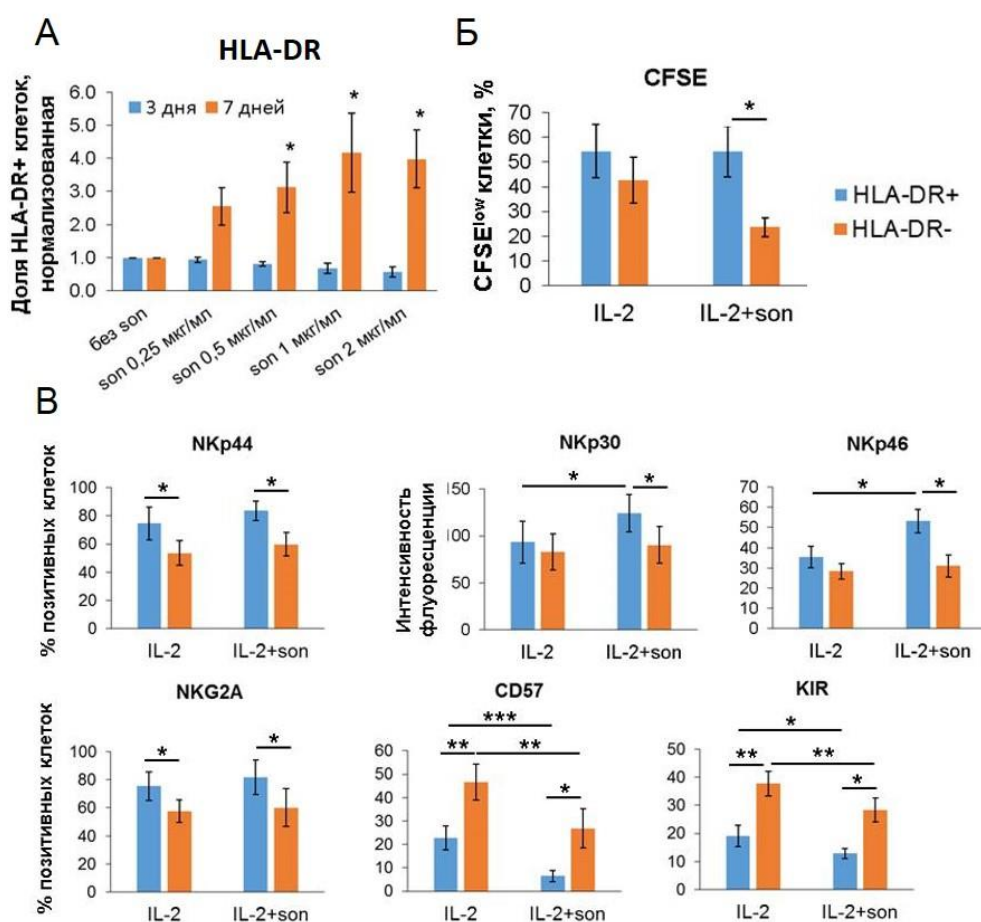


Рис. 12. Фенотипические изменения при культивировании НК-клеток с соникатом *M. tuberculosis*. (А) Изменение процентного содержания HLA-DR-позитивных НК-клеток через 3 и 6 дней инкубации с IL-2 и соникатом в указанных концентрациях. (Б) Анализ пролиферативной активности НК-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ при стимуляции IL-2 и соникатом. (В) Экспрессия указанных поверхностных маркеров на НК-клетках HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней стимуляции IL-2 и соникатом.

Было зарегистрировано увеличение доли HLA-DR-позитивных НК-клеток после 7 дней культивирования с IL-2 и соникатом *M. tuberculosis*, по сравнению с образцом только с IL-2, в соответствии с увеличением концентрации сониката от 0,25 до 2 мкг/мл (рис. 12А). Анализ снижения

флуоресценции ядерного красителя CFSE показал, что в ответ на соникат интенсивнее пролиферировали именно клетки HLA-DR⁺ (рис. 12Б). При этом, в субпопуляции HLA-DR-положительных NK-клеток после 7 дней стимуляции соникатом *M. tuberculosis* была зарегистрирована более высокая, чем в субпопуляции HLA-DR⁻, доля клеток NKp44⁺, NKG2A⁺ и интенсивность экспрессии рецепторов NKp46, NKp30, но сниженная доля клеток CD57⁺ и KIR⁺ (рис. 12В). Изменения в доле NKp44⁺ и NKG2A⁺ клеток были сходны с изменениями в образцах только с IL-2 и, таким образом, характерны для активированных NK-клеток в целом. Таким образом, большинство ответивших на соникат HLA-DR⁺ NK-клеток демонстрировали фенотип относительно менее зрелых (NKG2A⁺CD57⁻KIR⁻), но при этом экспрессировали на поверхности больше активирующих рецепторов NKp46, NKp30.

2.12 HLA-DR⁺ NK-клетки способны индуцировать активацию CD4⁺ Т-клеток в ответ на микобактериальные антигены *in vitro*

NK-клетки, предварительно активированные *in vitro* в течение 10 дней в присутствии IL-2, IL-21 и IL-18 для повышения экспрессии HLA-DR, инкубировали 24 ч с соникатом *M. tuberculosis* и затем культивировали совместно с аллогенными CD4⁺ Т-клетками. В качестве контрольных образцов к Т-клеткам добавляли пред-инкубированные с соникатом аллогенные дендритные клетки (DC) и NK-клетки, не контактировавшие с микобактериями (NK); также в часть образцов добавляли блокирующее антитело к HLA-DR.

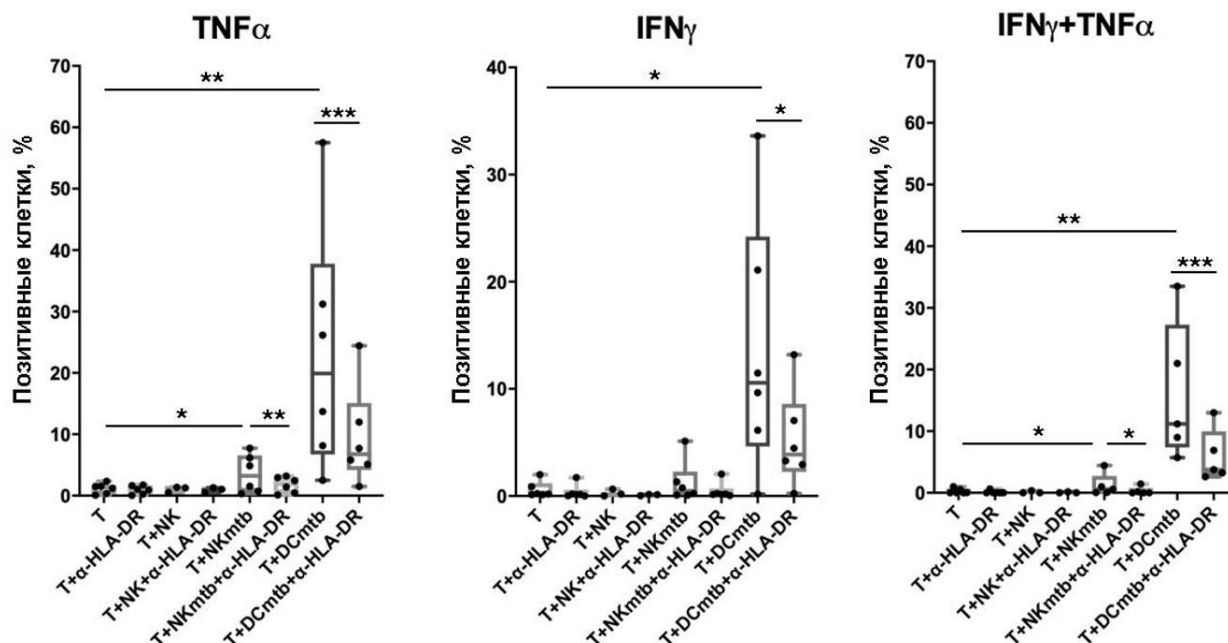


Рис. 13. Продукция $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ Т-клетками, измеренная после 20 ч инкубации с антителом против HLA-DR (α -HLA-DR), NK-клетками, пред-инкубированными и не пред-инкубированными с соникатом *M. tuberculosis* (NK и NKmtb), и дендритными клетками, пред-инкубированными с соникатом *M. tuberculosis* (DCmtb) в указанных комбинациях.

Выявлено, что НК-клетки, контактировавшие с разрушенными микобактериями (NKmtb), но не контрольные НК-клетки индуцировали статистически значимое увеличение продукции цитокинов в CD4⁺ Т-клетках (рис. 13). Однако, наблюдаемый эффект был значительно ниже, чем в образцах с дендритными клетками. Важно отметить, что после инкубации с NKmtb среди Т-клеток появлялась субпопуляция TNF⁺IFN γ ⁺, продуцирующая оба цитокина, отчетливо регистрируемая также в образцах с DC и характерная для антиген-зависимого функционального ответа. При этом, как в образцах T+DC, так и в образцах T+NKmtb добавление блокирующего антитела к HLA-DR приводило к снижению продукции обоих цитокинов в Т-клетках. Приведенные данные свидетельствуют о том, что НК-клетки, предварительно проинкубированные с *M. tuberculosis*, вступают в HLA-DR-опосредованное взаимодействие с CD4⁺ Т-клетками, активируя антиген-зависимый цитокиновый ответ, то есть, вероятно, реализуют антиген-презентацию.

Полученные в данной работе результаты позволяют заключить, что HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки могут обладать различающимися характеристиками в зависимости от того, когда возникла экспрессия HLA-DR: *ex vivo*, на клетках CD56^{bright} экспрессия HLA-DR может быть частью программы дифференцировки и ассоциирована с пролиферативной активностью, тогда как на клетках CD56^{dim} это действительно маркер активных цитокин-продуцирующих клеток. Показано, что *in vitro* при различных методах стимуляции экспрессия HLA-DR на НК-клетках значительно возрастает, и сопровождается увеличением пролиферативной активности, продукции IFN γ , дегрануляции и экспрессии ряда активирующих рецепторов и ко-стимуляторных молекул. За счет этих свойств, а также поскольку HLA-DR-позитивные НК-клетки можно эффективно нарастить *in vitro* с помощью протестированной нами комбинации IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, у данной субпопуляции имеется значительный потенциал для использования в иммунотерапевтических подходах. Выявлено, что индукция экспрессии HLA-DR в НК-клетках обеспечивается в том числе эндогенным IFN γ , создающим петлю положительной обратной связи, что, по-видимому, необходимо для поддержания активированного состояния НК-клеток длительное время.

Проведенные исследования подтверждают существенную роль HLA-DR⁺ НК-клеток в иммунном ответе. На примере инфекции *M. tuberculosis* было продемонстрировано, что HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки могут являться важным источником IFN γ . Помимо продукции цитокинов, НК-клетки из данной субпопуляции обладают повышенной экспрессией рецепторов, которые могут быть необходимы для распознавания непосредственно микобактерий туберкулеза и зараженных клеток (моноцитов), а также способны к антиген-зависимой активации CD4⁺ Т-клеток после предварительной инкубации с антигенами *M. tuberculosis*.

ВЫВОДЫ

1. В периферической крови человека встречаются два пула HLA-DR-позитивных NK-клеток: менее дифференцированные клетки HLA-DR⁺CD56^{bright}, и более зрелые клетки HLA-DR⁺CD56^{dim}CD57⁺, в том числе адаптивные – экспрессирующие NKG2C. Циркулирующие NK-клетки HLA-DR⁺ характеризуются увеличенной продукцией IFN γ , но сниженной антитело-зависимой цитотоксичностью.
2. Стимуляция IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 приводит к увеличению доли HLA-DR-позитивных NK-клеток в культуре до 90%.
3. При стимуляции *in vitro* увеличение экспрессии HLA-DR на NK-клетках положительно коррелирует с продукцией IFN γ . Кроме того, приобретение экспрессии HLA-DR связано с более интенсивной дегрануляцией по отношению к фидерным клеткам, высокой пролиферативной активностью, более высокой экспрессией рецепторов NKG2D, CD86 на NK-клетках.
4. Экспрессия HLA-DR *in vitro* может запускаться экзогенным IL-21, а также индуцированным им эндогенным IFN γ , по STAT3- и ERK1/2-зависимому пути через активацию изоформы 3 транскрипционного фактора СИТА.
5. Доля HLA-DR⁺ NK-клеток повышена в крови пациентов, больных туберкулезом, по сравнению со здоровыми добровольцами.
6. В ответ на разрушенные бактерии *M. tuberculosis* HLA-DR-позитивные NK-клетки интенсивнее продуцируют IFN γ , чем клетки HLA-DR⁻, в смешанной культуре РВМС *ex vivo* и в изолированной культуре после стимуляции. При длительном контакте с антигенами микобактерий происходит экспансия NKG2A⁺CD57⁻KIR⁻HLA-DR⁺ NK-клеток с увеличенной экспрессией рецепторов NKp30, NKp46.
7. HLA-DR-позитивные NK-клетки способны запускать активацию CD4⁺ Т-клеток после предварительной инкубации с антигенами *M. tuberculosis*, однако с меньшей эффективностью, чем профессиональные антиген-презентирующие клетки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Стрельцова М.А., **Ерохина С.А.**, Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Сравнительный анализ поверхностных маркеров клонов НК-клеток человека. Российский иммунологический журнал, 2015, 9(18), 3(1): 218-220.
2. Kovalenko, E.I., Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., **Erokhina, S.A.**, Telford, W.G. Identification of human memory-like NK cells. *Curr. Protoc. Cytom.*, 2017, 79: 9.50.1-9.50.11. doi: 10.1002/cpsy.13
3. **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Telford, W.G., Sapozhnikov, A.M. and Kovalenko, E.I. HLA-DR⁺ NK cells are mostly characterized by less mature phenotype and high functional activity. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96(2): 212–228. doi:10.1111/imcb.1032
4. Streltsova M.A., **Erokhina S.A.**, Kanevskiy L.M., Grechikhina M.V., Kobyzeva P.A., Lee D.A., Telford W.G., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. Recurrent stimulation of NK cell clones with K562 expressing membrane-bound IL-21 affects their phenotype, IFN- γ production and lifespan. *Int J Mol Sci.*, 2019, 20(2): E443. doi: 10.3390/ijms20020443.
5. Kanevskiy, L.M., **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., et al. The Role of O-Antigen in LPS-Induced Activation of Human NK Cells. *J Immunol Res.*, 2019, 2019: 3062754. doi: 10.1155/2019/3062754.
6. **Erokhina, S.A.**, Streltsova, M.A., Kanevskiy, L.M., Grechikhina, M.V., Sapozhnikov, A.M., Kovalenko, E.I. HLA-DR-expressing NK cells: effective killers suspected for antigen presentation. *J Leukoc Biol.*, 2020, 109(2): 1-11. doi: 10.1002/JLB.3RU0420-668RR.
7. Kobyzeva, P.A., Streltsova, M.A., **Erokhina, S.A.**, Kanevskiy L.M., Telford W.G., Sapozhnikov A.M., Kovalenko E.I. CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ NK cells retaining proliferative potential are possible precursors of CD57⁺NKG2C⁺ memory-like NK cells. *J Leukoc Biol.*, 2020, 108(4): 1379–1395. doi: 10.1002/JLB.1MA0720-654RR.
8. **Kust, S. A.**, Streltsova, M. A., Panteleev, A. V., Karpina, N. L., Lyadova, I. V., Sapozhnikov, A. M., Kovalenko, E. I. HLA-DR-Positive NK Cells Expand in Response to Mycobacterium Tuberculosis Antigens and Mediate Mycobacteria-Induced T Cell Activation. *Front. Immunol.*, 2021, 12: 1531. doi: 10.3389/fimmu.2021.662128.

Тезисы докладов на конференциях:

1. **Ерохина С.А.**, Коваленко Е.И. Характеристика HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток человека, полученных в условиях стимуляции IL-2 и мембраносвязанным IL-21 // Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 9-12 февраля, 2015, Москва. Сборник тезисов, с. 93-94.
2. Streltsova, M., **Erokhina, S.**, Kanevskiy, L., Kovalenko, E. Phenotypic characteristic of NK cell clones obtained with soluble IL-2 and membrane-bound IL-21 stimulation // Cell Symposium “Cancer. Inflammation and Immunity”, 14-16 июня, 2015, Сиджес, Испания. Abstract book, с. P1.063.
3. **Ерохина С.А.**, Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Применение фидерных клеток, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21, для активации и пролиферации НК-клеток человека // «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге XXVIII», 1-4 июня, 2015, Санкт-Петербург. Медицинская иммунология, 2015, том 17 (спецвыпуск), с. 20.
4. **Ерохина С.А.**, Коваленко Е.И. Изучение возможной роли HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток человека в иммунном ответе на *M. tuberculosis* // Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля, 2016, Москва. Сборник тезисов, с. 43.
5. **Erokhina, S.**, Streltsova, M., Kanevskiy, L., Kovalenko, E. Generation, characterization and functional analysis of HLA-DR-positive NK cells // International Congress of Immunology, 21-26 августа, 2016, Мельбурн, Австралия. European Journal of Immunology, Special Issue: Abstracts of ICI 2016, том 46(s1), с. 119-120.
6. **Ерохина С.А.**, Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. HLA-DR как маркер особого функционального состояния НК-клеток человека // Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 7-10 февраля, 2017, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 15.
7. **Ерохина С.А.**, Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Экспрессия HLA-DR на НК-клетках ассоциирована преимущественно с менее дифференцированными клетками с повышенной функциональной активностью // «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге XXIX», 5-8 июня, 2017, Санкт-Петербург. Медицинская иммунология, 2017, том 19, спецвыпуск, с. 29.
8. Стрельцова М.А., **Ерохина С.А.**, Муравьева А.В., Коваленко 2017. Е.И. IL-2 и мембраносвязанный IL-21 приводит к индукции пролиферации,

- изменению фенотипа и функций НК-клеток // VIII Российский Симпозиум «Белки И Пептиды», 18-22 сентября, 2017, Москва. Acta Naturae, 2017, спецвыпуск, стр. 57.
9. **Ерохина С.А.**, Стрельцова М.А., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Экспрессия HLA-DR периферическими НК-клетками человека ассоциирована с высокой способностью к пролиферации и продукции IFN γ , но низкой антитело-зависимой цитотоксичностью // Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 12-15 февраля, 2018, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 11.
 10. **Erokhina S.**, Kobyzeva P., Streltsova M., Kovalenko E. Mature NKG2C+ NK cells demonstrate increased HLA-DR expression // The 5th European Congress of Immunology, 2-5 сентября, 2018, Амстердам, Нидерланды. Abstract book, с. 450.
 11. **Erokhina S.**, Streltsova M., Kanevskiy L., Kovalenko E. A subset of HLA-DR-positive NK cells expands in response to Mycobacterium tuberculosis // NK Cell Symposium, 10-12 сентября, 2018, Гамбург, Германия. Abstract book, с. 41.
 12. **Ерохина С.А.**, Негреева А.В., Пантелеев А.В., Лядова И.В., Коваленко Е.И. Анализ ответа HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток человека на стимуляцию антигенами M. tuberculosis // Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии», 11-14 февраля, 2019, Москва. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с. 15.
 13. **Erokhina S.**, Negreeva A., Lutsenko G., Streltsova M., Kanevskiy L., Kovalenko E. HLA-DR expression in NK cells is induced by both extracellular cytokines and self-produced IFN γ and associated with high metabolic activity // 18th Meeting of the Society for Natural Immunity, 29 сентября – 3 октября, 2019, Люксембург, Люксембург. Abstract book, с. 39.