

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

На правах рукописи

Куст Софья Алексеевна

**Получение, анализ свойств и иммунологической роли
субпопуляции NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR**

Специальность 03.01.03 (Молекулярная биология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Коваленко Елена Ивановна

Москва

2021 г

Список сокращений

АПК – антиген-презентирующие клетки

АРТ – антиретровирусная терапия

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДМСО – диметилсульфоксид

кДНК – комплементарная цепь ДНК

МРТ – магнитно-резонансная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

УФ – ультрафиолет

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

anti-IFN γ R – антитела к рецептору IFN γ

АРС – allophycosyanin (аллофикоцианин)

BCG – *Bacillus Calmette–Guérin* (Бацилла Кальметта-Герена)

BrA – brefeldin A (брефелдин А)

CEF – смесь пептидов *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr*, *Influenza A*, (цитомегаловируса, вируса Эпштейна-бар и вируса гриппа А)

CTL – cytotoxic T lymphocyte (цитотоксический Т-лимфоцит)

DC – dendritic cells (дендритные клетки); iDC – immature DC (незрелые дендритные клетки), mDC – mature DC (зрелые дендритные клетки)

ЕС – elite controllers (особые контроллеры – пациенты, зараженные HIV, у которых титр вируса в крови ниже уровня, характерного для активной фазы инфекции)

FCS – fetal calf serum (эмбриональная телячья сыворотка)

FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеинизотиоцианат)

HCMV – human cytomegalovirus (цитомегаловирус человека)

HCV – hepatitis C virus (вирус гепатита С)

HIV – human immunodeficiency virus (вирус иммунодефицита человека)

HLA – human leukocyte antigen (лейкоцитарный антиген человека)

HSV – herpes simplex virus (вирус простого герпеса)

IFN – interferon (интерферон)

IFN γ R – IFN γ receptor (рецептор IFN γ)

IL – interleukine (интерлейкин)

ILC – innate lymphoid cells (лимфоидные клетки врожденного иммунитета)

mbIL-21 – membrane-bound (мембраносвязанный) IL-21

KIR – killer-cell immunoglobulin-like receptors (иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток)

LILR – leukocyte immunoglobulin-like receptors (иммуноглобулин-подобные рецепторы лимфоцитов)

LTNP – long-term non-progressors (долго не прогрессирующие – пациенты, зараженные HIV, у которых титр вируса не выше 1000 ед./мл и уровень CD4⁺ Т-клеток в норме)

MHC – major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

NCR – natural cytotoxicity receptors (рецепторы натуральной цитотоксичности)

PBA – буфер PBS, содержащий 0,05% БСА и 0,1% азидата натрия

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

PBS – phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буфер, pH 7.2)

PE – phycoerythrin (фикоэритрин)

PMA – phorbol myristate acetate (форболмиристатацетат)

rhIL-21R – растворимый фрагмент рецептора к IL-21

SEB – Staphylococcus aureus Enterotoxin B (энтеротоксин В золотистого стафилококка)

SLE – systemic lupus erythematosus (системная красная волчанка)

TCR – T cell receptor (Т-клеточный рецептор)

Th1/Th2 – T-helper type 1/2 (Т-хелпер 1-го/2-го типа)

TLR – Toll-like receptors (Толл-подобные рецепторы)

Tregs – T regulatory cells (Т-регуляторные клетки)

Оглавление

Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	19
1.1. Краткая характеристика НК-клеток	19
1.1.1. Рецепторы натуральных киллеров.....	21
1.1.2. Субпопуляции НК-клеток	27
1.1.3. Адаптивные НК-клетки, экспрессирующие NKG2C	31
1.1.4. Энергетический метаболизм НК-клеток	32
1.1.5. Влияние цитокинов на функциональную активность НК-клеток.....	33
1.2. HLA-DR-позитивные НК-клетки.....	37
1.2.1. HLA-DR-позитивные НК-клетки в норме.....	39
1.2.2. HLA-DR-позитивные НК-клетки при патологии	41
1.2.2.1. HLA-DR-позитивные НК-клетки при инфицировании HIV ...	41
1.2.2.2. HLA-DR-позитивные НК-клетки при других вирусных инфекциях.....	43
1.2.2.3. HLA-DR-позитивные НК-клетки при туберкулезе	44
1.2.2.4. HLA-DR-позитивные НК-клетки при аутоиммунных заболеваниях.....	45
1.2.2.5. HLA-DR-позитивные НК-клетки при раке	48
1.2.3. Индукция экспрессии HLA-DR на НК-клетках.....	49
1.2.4. Регуляция экспрессии HLA-DR на транскрипционном уровне .	51
1.2.5. Функциональная значимость HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции НК-клеток	52
1.3. Роль НК клеток в защите от туберкулеза.....	59
Глава 2. Материалы и методы.....	65
2.1. Клеточные линии.....	65
2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови	65
2.3. Выделение НК-клеток человека методом магнитной сепарации.....	66
2.4. Получение CD4 ⁺ Т-клеток человека	67
2.5. Получение дендритных клеток человека	67
2.6. Проточная цитометрия	68
2.7. Внутриклеточное окрашивание IFN γ и TNF α	69
2.8. Анализ пролиферативной активности.....	70

2.9.	Сортировка субпопуляций НК-клеток	70
2.10.	Получение клонов НК-клеток	71
2.11.	Активация НК-клеток IL-2 и мембраносвязанным/растворимым IL-21	72
2.12.	Культивирование НК-клеток с блокатором IL-21 – растворимой формой рекомбинантного IL-21R	73
2.13.	Культивирование НК-клеток с блокатором IFN γ R – специфичным антителом к IFN γ R1	74
2.14.	Культивирование НК-клеток с ингибиторами транскрипционных факторов семейства STAT и ERK1/2	74
2.15.	Активация НК-клеток IL-2 и/или соникатом <i>M. tuberculosis</i>	76
2.16.	Стимуляция НК-клеток для функциональных тестов	77
2.17.	Анализ цитотоксической активности	78
2.17.1.	Оценка цитотоксической активности клеток-эффекторов по их дегрануляции	78
2.17.2.	Оценка цитотоксической активности по уровню активации каспазы-6 в клетках-мишенях	78
2.18.	Имуноферментный анализ	79
2.19.	Определение содержания АТФ в НК-клетках	80
2.20.	Выделение тотальной мРНК	81
2.21.	Обратная транскрипция	82
2.22.	Полимеразная цепная реакция	83
2.23.	Электрофорез ДНК в агарозном геле	84
2.24.	РНК-секвенирование	85
2.25.	Ко-культивация CD4 ⁺ Т-клеток с НК-клетками и дендритными клетками	87
2.26.	Статистический анализ	88
Глава 3.	Результаты и обсуждение	89
3.1.	Экспрессия HLA-DR <i>in vivo</i> на НК-клетках различной степени дифференцировки	89
3.2.	Экспрессия HLA-DR на НК-клетках NKG2C ⁺	94
3.3.	Сравнительное РНК-секвенирование HLA-DR-позитивных и негативных НК-клеток	95
3.4.	Анализ функциональных свойств свежесеквенированных HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток	102
3.5.	Экспансия HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток <i>in vitro</i>	105

3.6.	Сравнение воздействия растворимой и мембраносвязанной форм IL-21 на экспрессию HLA-DR NK-клетками.....	107
3.7.	Выявление оптимальных условий для получения HLA-DR-позитивных NK-клеток <i>in vitro</i>	110
3.8.	Стимуляция IL-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.....	112
3.8.1.	NK-клетки экспрессируют HLA-DR <i>de novo</i> в процессе активации	112
3.8.2.	HLA-DR-позитивные NK-клетки интенсивнее пролиферируют в ответ на стимуляцию.....	115
3.9.	Анализ механизма индукции экспрессии HLA-DR в NK-клетках.	118
3.9.1.	Экспрессию HLA-DR в NK-клетках индуцирует как IL-21, так и эндогенный IFN γ	119
3.9.2.	STAT3- и ERK1/2-опосредованные внутриклеточные пути передачи сигнала участвуют в запуске экспрессии HLA-DR в NK-клетках.....	122
3.9.3.	Экспрессию HLA-DR в NK-клетках регулирует изоформа 3 транскрипционного фактора СИТА.....	126
3.10.	Анализ экспрессии поверхностных маркеров на HLA-DR-позитивных NK-клетках, полученных в культуре	128
3.11.	Функциональная активность HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, полученных <i>in vitro</i>	132
3.12.	Энергетический метаболизм HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, свежевыделенных и полученных <i>in vitro</i>	136
3.13.	HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки в иммунном ответе против <i>M. tuberculosis</i>	138
3.13.1.	HLA-DR-позитивные NK-клетки в крови пациентов, больных туберкулезом	138
3.13.2.	HLA-DR ⁺ NK-клетки интенсивнее продуцируют IFN γ в ответ на <i>M. tuberculosis</i>	140
3.13.3.	Субпопуляция менее зрелых, NCR-экспрессирующих HLA-DR ⁺ NK-клеток пролиферирует в ответ на <i>M. tuberculosis</i>	144
3.13.4.	HLA-DR ⁺ NK-клетки способны осуществлять презентацию микобактериальных антигенов CD4 ⁺ Т-клеткам <i>in vitro</i>	146
Глава 4.	Заключение.....	149
	Список литературы	152

Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Натуральные киллеры (natural killer cells, NK-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.

Функциональная активность и репертуар поверхностных рецепторов NK-клеток регулируется множеством факторов. Переход NK-клеток из состояния покоя в состояние активации может сопровождаться запуском пролиферации NK-клеток, увеличением их цитотоксического ответа и продукции цитокинов, повышением экспрессии активирующих рецепторов и других поверхностных маркеров. Кроме того, независимыми группами исследователей было отмечено, что при длительном культивировании под воздействием определенных стимулов увеличивается доля NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR – подтип МНС (molecular histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости) класса II (МНС II) [Delso-Vallejo и др., 2017; Evans и др., 2011; Loyon и др., 2016; Nakayama и др., 2011; Rabinowich и др., 1994; Senju и др., 2018].

Впервые появление экспрессии HLA-DR на NK-клетках под действием стимулирующих агентов было зарегистрировано более 30-ти лет назад в общих лейкоцитарных культурах, и с того времени данная молекула часто использовалась как маркер для регистрации активированных NK-клеток [Phillips, Le, Lanier, 1984]. Однако, большинство исследований данного

феномена были исключительно описательными, и лишь в немногих работах были предприняты попытки оценить функциональную значимость молекулы HLA-DR для NK-клеток. Основная функция этой молекулы на других клетках связана со способностью презентировать антиген (у макрофагов, В-клеток, дендритных клеток). Опубликовано несколько исследований, демонстрирующих способность NK-клеток, подобно профессиональным антиген-презентирующим клеткам (АПК), стимулировать специфичный Т-клеточный ответ на определенные антигены: столбнячный токсин и аллерген домашнего пылевого клеща Der pI [Roncarolo и др., 1991], частицы HSV (herpes simplex virus, вирус простого герпеса) и выделенные из них пептиды [Kim и др., 2012], комплекс частиц HCMV (human cytomegalovirus, цитомегаловирус человека) с антителом [Costa-García и др., 2019]. Кроме того, повышение уровня HLA-DR-позитивных NK-клеток в тканях и периферической крови зарегистрировано при некоторых патологических состояниях, таких как иммунодефицит на фоне HIV (human immunodeficiency virus, вирус иммунодефицита человека) [Lichtfuss и др., 2012a; Marras и др., 2013], инфицирование HCMV [Rölle и др., 2016], рассеянный склероз [Aranami, Miyake, Yamamura, 2006], системная красная волчанка [Cruz-Gonzales и др., 2018], что указывает на физиологическую значимость этой субпопуляции *in vivo*. Во многих из перечисленных работ данные о высокой экспрессии HLA-DR сопровождались сообщениями об увеличенной функциональной активности NK-клеток, однако лишь в единичных случаях рассматривалась взаимосвязь этих двух фактов. В связи с этим, более углубленное исследование HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток представляется актуальной задачей. Изучение их фенотипических и функциональных особенностей, экспрессии HLA-DR на разных стадиях дифференцировки NK-клеток, сравнение HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, выделенных из периферической крови *ex vivo* и полученных после наращивания в стимулирующих условиях *in vitro*, выявление механизма

индукции экспрессии данной молекулы в НК-клетках поможет оценить вклад HLA-DR-позитивных НК-клеток в иммунный ответ. Все вышеперечисленные аспекты крайне мало описаны либо вовсе отсутствуют в литературе в настоящее время.

НК-клетки играют важную роль в иммунном ответе против микобактерий туберкулеза, взаимодействуя с зараженными моноцитами/макрофагами, дендритными клетками и различными субпопуляциями Т-клеток [Esin, Batoni, 2015]. При этом, в тканях легких пациентов с туберкулезом отмечено высокое процентное содержание HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005]. В другой работе показана экспансия данной субпопуляции и увеличение продукции IFN γ в ответ на стимуляцию BCG (Bacillus Calmette–Guérin, бацилла Кальметта-Герена) *in vitro* [Evans и др., 2011]. За счет увеличенной продукции IFN γ [Loyon и др., 2016; Yano и др., 1996] HLA-DR-экспрессирующая субпопуляция НК-клеток, накапливающаяся в легких, может участвовать в локальном ответе на инфекцию. Помимо этого, способность НК-клеток напрямую взаимодействовать с элементами клеточных стенок микобактерий [Esin и др., 2013; Marcenago и др., 2011] ставит вопрос о возможности распознавания HLA-DR-экспрессирующими НК-клетками микобактериальных антигенов и их последующей презентации наивным Т-клеткам.

Цели и задачи

Целью работы являлось изучение механизмов появления, фенотипических и функциональных особенностей HLA-DR-экспрессирующих НК-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 НК-клеток человека, выделенных из периферической крови.
2. Оценить пролиферативную способность, а также изменения фенотипа, функциональной и метаболической активности HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции при наращивании НК-клеток *in vitro* в общей популяции и в виде клональных культур.
3. Исследовать механизм индукции экспрессии HLA-DR на поверхности НК-клеток в условиях активации *in vitro*.
4. Провести сравнительный анализ содержания HLA-DR-позитивных НК-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. Изучить возможность 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* наибольшее увеличение доли HLA-DR-позитивных НК-клеток происходит при использовании разработанной нами схемы 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 прямая корреляционная зависимость между этими двумя параметрами в клональных культурах НК-клеток. Помимо этого, 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. 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 СРТА.

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. Кроме того, HLA-DR-позитивные НК-клетки интенсивнее продуцировали IFN γ в ответ на микобактериальные антигены, чем HLA-DR-негативные, как в смешанной культуре PBMC (peripheral blood mononuclear cells, мононуклеарные клетки периферической крови) *ex vivo*, так и в изолированной культуре НК-клеток после длительной стимуляции. Наконец, 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 НК-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 с возрастающей заинтересованностью в применении NK-клеток в адоптивной иммунотерапии [Fang, Xiao, Tian, 2017]. Наиболее перспективные в данной области методические подходы предполагают использование NK-клеток, предварительно стимулированных *in vitro* с целью повысить их функциональную активность и нарастить в нужных количествах [Ostaijen-ten Dam van и др., 2016]. Опираясь на уже опубликованные в литературе и полученные нами данные о появлении экспрессии HLA-DR на NK-клетках при разнообразных условиях стимуляции [Delso-Vallejo и др., 2017; Loyon и др., 2016; Rabinowich и др., 1994; Senju и др., 2018], можно утверждать, что существующие на данный момент способы наращивания NK-клеток будут приводить к значительному увеличению доли HLA-DR-экспрессирующих клеток в культуре, наряду с изменениями других фенотипических и функциональных свойств. Это необходимо учитывать при разработке методов получения NK-клеточного терапевтического продукта, и понимание спектра изменений, сопутствующих экспрессии HLA-DR в NK-клетках, может в этом помочь. 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.

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: XXVII, XXVIII, XIX, 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 и 13 тезисов.

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 ХХІХ», 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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Краткая характеристика НК-клеток

НК-клетки – это гетерогенная популяция лимфоцитов системы врожденного иммунитета. В настоящее время их относят к подгруппе клеток, объединенных под общим названием «врожденные лимфоидные клетки» (innate lymphoid cells, ILC) [Spits и др., 2013]. ILC и, в частности, НК-клетки играют ведущую роль во врожденной защите организма от патогенов, а также взаимодействуют с другими клетками врожденной и адаптивной иммунных систем (дендритные клетки, макрофаги, эндотелиоциты, Т-клетки), стимулируя или подавляя иммунный ответ. Кроме того, ILC участвуют в развитии, поддержании гомеостаза и ремоделировании тканей иммунной системы [Spits, Cupedo, 2012].

НК-клетки обладают естественной, то есть не требующей презентации антигена в комплексе с молекулами МНС класса I (МНС I), цитолитической активностью, способны продуцировать разнообразные цитокины: провоспалительные (IFN γ , TNF α), противовоспалительные (IL-10), а также факторы роста, такие как GM-CSF, G-CSF и IL-3. Установлено, что НК-клетки секретируют многие хемокины, включая CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1- α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), XCL1 (лимфотактин) и CXCL8 (IL-8) [Walzer и др., 2005]. Благодаря этому НК-клетки участвуют в противовирусном и противоопухолевом контроле организма, а также проявляют антибактериальную и антимикотическую активность [Bancroft, 1993; Lodoen, Lanier, 2006; Voigt и др., 2014]. На реализацию наиболее важной функции НК-клеток – контактного лизиса клетки-мишени – влияют несколько факторов: 1) активационные сигналы от рецепторов, узнающих различные патоген-ассоциированные молекулы (NCR (natural cytotoxicity receptors, рецепторы натуральной цитотоксичности), LILR (leukocyte immunoglobulin-like receptors, иммуноглобулин-подобные рецепторы лимфоцитов)); 2) связывание

активирующих рецепторов со «стресс-индуцированными» молекулами на поверхности инфицированных или опухолевых клеток; 3) наличие или отсутствие ингибирующего сигнала от молекул МНС I, экспрессированных на нормальных клетках организма – так называемый сигнал «отсутствия своего» [Held и др., 2011; Ярилин, 2010].

Главное отличие NK-клеток от других популяций лимфоцитов — отсутствие антигенспецифических рецепторов, кодируемых генами, перестраиваемыми в процессе дифференцировки клеток. С этим связано отсутствие клональной структуры популяции NK-клеток в ее стандартном понимании: все естественные киллеры идентичны по строению их ключевых рецепторов, однако, клетки с определенным набором этих рецепторов могут в ответ на специфический стимул размножиться, формируя устойчивую популяцию, персистирующую в организме длительное время (например, так называемые адаптивные NK-клетки). Кроме того, на разных стадиях развития NK-клетки экспрессируют множество рецепторов и поверхностных маркеров, характерных для клеток как миелоидного, так и лимфоидного происхождения, представляя, таким образом, гетерогенную смесь разнообразных субпопуляций [Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И., 2012]. У человека основными молекулами, по которым NK-клетки отделяют от других гематопозитических клеток, являются CD56 и CD16. Молекула CD56 участвует в гомофильной адгезии, экспрессируется, помимо NK-клеток, на нервных и мышечных клетках, а также на части Т-лимфоцитов; молекула CD16 — низкоаффинный Fc-рецептор FcγRIII, представленный также на нейтрофилах, моноцитах и некоторых Т-клетках. Ни один из этих двух маркеров не специфичен для NK-клеток, более того, часть NK-клеток не экспрессирует CD16 (преимущественно NK-клетки CD56^{bright}) [Michel и др., 2016], а часть — CD56 (CD56^{neg} NK-клетки) [Milush и др., 2013]. Тем не менее, в настоящее время общепринятым способом идентификации NK-клеток здорового человека является выявление CD3/CD14/CD19-негативных лимфоцитов,

экспрессирующих молекулу клеточной адгезии CD56 [Caligiuri, 2008; Freud и др., 2017; Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И., 2012].

НК-клетки распространены практически по всему организму и обнаруживаются в том числе в селезенке (преимущественно в красной пульпе), синусоидах печени, легких, лимфоузлах, децидуальной оболочке матки [Grégoire и др., 2007]. Значительная часть НК-клеток находится в циркуляции, составляя по разным данным около 5–20% числа лимфоцитов периферической крови [Abel и др., 2018; Freud и др., 2017]. Естественные киллеры — короткоживущие клетки, хотя в настоящее время обнаружено, что определенные НК-клетки, обладающие чертами клеток памяти, могут персистировать в организме несколько месяцев и с большей эффективностью активироваться при повторной встрече с антигеном [Horowitz и др., 2010b; Paust, Andrian von, 2011].

1.1.1. Рецепторы натуральных киллеров

НК-клетки характеризуются большим разнообразием активирующих и ингибирующих рецепторов, экспрессируемых на различных субпопуляциях в различных условиях и контролирующей активность этих лимфоцитов (таблица 1, рис. 1) [Pegram и др., 2011]. Описано несколько семейств НК-клеточных рецепторов, гены многих из них расположены в НК-комплексе, который у человека находится в коротком плече хромосомы 12. Большинство из них узнают стресс-индуцированные лиганды на поверхности клеток, молекулы МНС I (HLA-A,-B,-C,-E у человека) и родственные им молекулы, а также некоторые патоген-ассоциированные паттерны. К основным рецепторам относятся рецепторы семейства KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors, иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток), гомодимер NKG2D, гетеродимеры CD94/NKG2 и рецепторы естественной цитотоксичности NCR. Цитокиновые рецепторы, которые связаны с общей γ -цепью (γ c), участвуют в развитии НК-клеток и в стимуляции их эффекторной

и регуляторной функций [Vivier и др., 2011].

Рецепторы семейства KIR – наиболее обширная группа рецепторов NK-клеток человека, которые взаимодействуют с лейкоцитарными антигенами HLA (human leukocyte antigen). На данный момент выделяют 15 генов и 2 псевдогена KIR, при этом для них характерно значительное аллельное разнообразие [Middleton, Gonzelez, 2010]. В результате того, что эти рецепторы случайным образом экспрессируются на каждой NK-клетке, отдельный организм несет в себе довольно большой репертуар NK-клеточных «клонов». В соответствии с числом внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов различают рецепторы KIR2D и KIR3D, а в соответствии с длиной цитоплазматического региона – L- и S-формы. Длинные L-участки содержат в себе ингибирующие тирозинсодержащие сигнальные последовательности ITIM (обеспечивают проведение ингибирующего сигнала); S-участки не содержат ITIM, но способны взаимодействовать с адаптерными молекулами DAP12, в состав которых входит ITAM – активационный тирозинсодержащий иммунорецепторный мотив, опосредующий проведение активирующего сигнала [Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016; Ярилин, 2010]. Рецепторы KIR специфически связываются с молекулами HLA-A, -B и -C и узнают их полиморфные варианты (таблица 1); с помощью рентгено-структурного анализа было показано, что они присоединяются к пептидсвязывающей области, причем при условии нахождения там пептида [Hansasuta и др., 2004]. Считается, что рецепторы семейства KIR участвуют в поддержании толерантности NK-клеток к собственным тканям.

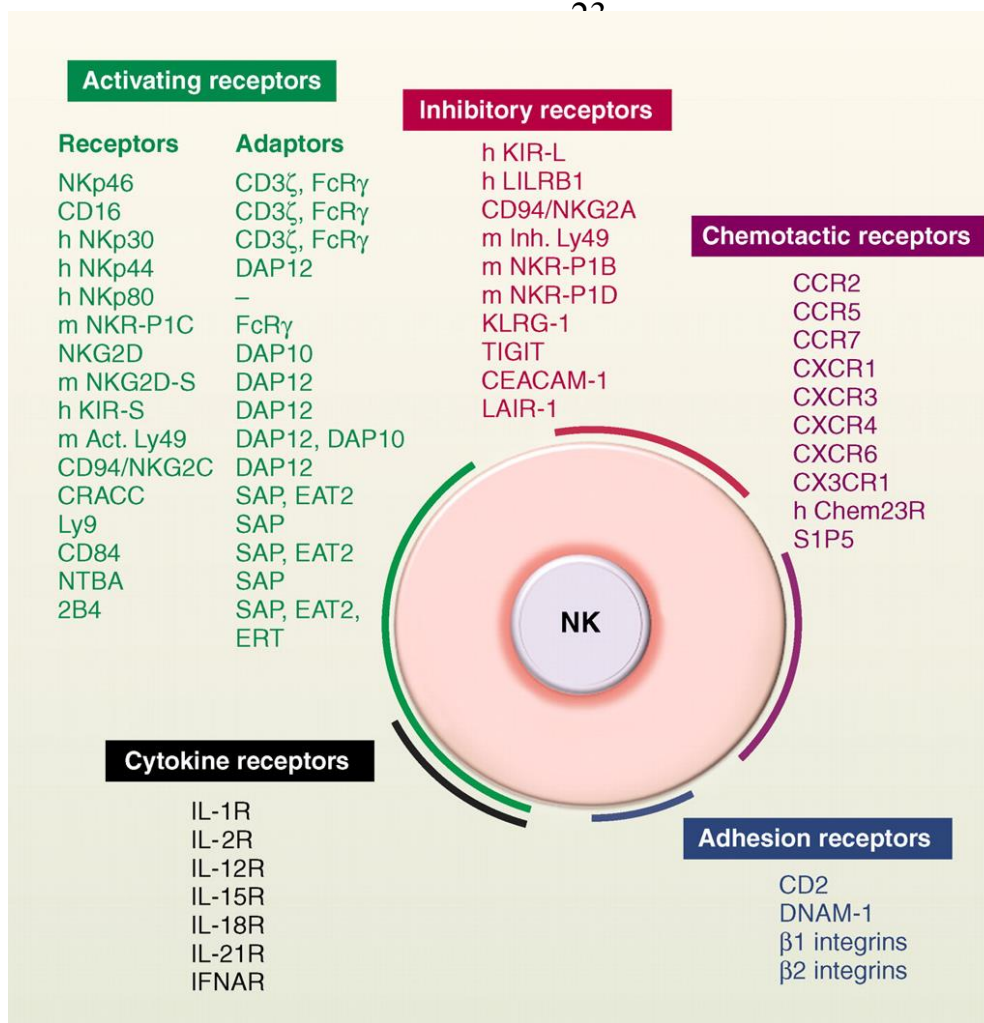


Рис. 1. Рецепторы NK-клеток [Vivier и др., 2011].

Гетеродимеры CD94-NKG2A/C/E – представители семейства лектиноподобных рецепторов C-типа, узнающих молекулы неклассических МНС I (HLA-E и HLA-G), нагруженные пептидом [Braud и др., 1998]. Считается, что таким образом NK-клетки способны косвенным путем «оценивать» количество представленных на поверхности потенциальной клетки-мишени молекул классических МНС I [Muntasell и др., 2013; Parham, 2006; Pegram и др., 2011], так как HLA-E презентует пептиды из лидерной последовательности классических МНС I [Borrego и др., 1998; Braud и др., 1998]. Предполагается, что этот механизм предотвращает нежелательную активацию естественных киллеров против собственных клеток. При этом NKG2A является рецептором ингибирующим, узнающим HLA-E с высокой аффинностью, тогда как рецептор NKG2C – активирующий, и его аффинность существенно ниже [Lopez-Vergès и др., 2011; Muntasell и др., 2013; Коваленко

Е.И., Стрельцова, 2016]. Гетеродимеры CD94-NKG2A/C экспрессированы на NK-клетках не постоянно: количество NKG2A на поверхности клеток зависит от степени их дифференцировки [Béziat и др., 2010], тогда как изменение количества NKG2C-позитивных NK-клеток связано с иммунным ответом на цитомегаловирус и некоторые другие вирусные инфекции [Lopez-Vergès и др., 2011, Chiesa Della и др., 2016; Muntasell и др., 2013; Pupuleku и др., 2017].

Таблица 1. Поверхностные рецепторы NK-клеток.

<i>Семейство рецепторов</i>	<i>Вид организма</i>	<i>Лиганд</i>	<i>Активация / ингибирование</i>	
KIR	Ч	HLA-A/-B/-C	Акт. / Ингиб.	
KIR2DL1		HLA-C2	Ингиб.	
KIR2DL2/3		HLA-C1	Ингиб.	
KIR2DL4		HLA-G	Акт.	
KIR2DL5		?	Ингиб.	
KIR3DL1		HLA-Bw4	Ингиб.	
KIR3DL2		HLA-A3, -A11	Ингиб.	
KIR2DS1		HLA-C2	Акт.	
KIR2DS2		HLA-C1	Акт.	
KIR2DS3		?	Акт.	
KIR2DS4		?	Акт.	
KIR2DS5		?	Акт.	
KIR3DS1		HLA-Bw4	Акт.	
CD94-NKG2		Ч/М	HLA-E, -G	Акт. / Ингиб.
NKG2A				Ингиб.
NKG2C	Акт.			
NKG2E	Акт.			
NKG2D	Ч/М	MIC-A/-B, ULBP1/2/3/4	Акт.	
NCRs	Ч/М		Акт.	
NKp30		BAT-3, HSPG, B7-H6	Акт.	
NKp44		Вирусные гемагглютинины	Акт.	
NKp46		Вирусные гемагглютинины, HSPG, виментин	Акт.	
NKp80		AICL	Акт.	
LILR	Ч/М	MHC class I, UL18	Ингиб.	
2B4	Ч/М	CD48	Акт. / Ингиб.	
KLRG1	Ч/М	Кадгерин	Ингиб.	
NKR-P1	М	Ocil/Clr-b	Акт. / Ингиб.	
DNAM-1	Ч/М	PVR, CD122	Акт.	
PILR	М	CD99	Акт.	

Прим.: Ч – человек; М – мышь; Акт. – активирующий; Ингиб. – ингибирующий.

Считается, что ингибирующий рецептор NKG2A экспрессируется преимущественно на клетках, находящихся на ранних стадиях дифференцировки [Béziat и др., 2010; Björkström и др., 2010]. Это подтверждается тем, что в пациентах, только что подвергшихся гематопозитической трансплантации, экспрессия NKG2A на NK-клетках CD56^{dim} сильно повышена по сравнению со здоровыми донорами [Beziat и др., 2009; Dulphy и др., 2008]. NK-клетки пуповинной крови CD56^{dim} также имеют очень высокую экспрессию этого рецептора [Garff-Tavernier Le и др., 2010]. NK-клетки CD56^{bright}, которые считаются наименее дифференцированными, практически стопроцентно позитивны по NKG2A [Béziat и др., 2010]. Все это указывает на то, что изменение экспрессии NKG2A маркирует переход между различными стадиями дифференцировки NK-клеток: от CD56^{bright}NKG2A⁺ к CD56^{dim}NKG2A⁺ и затем к CD56^{dim}NKG2A⁻ [Béziat и др., 2010]. Кроме этого, NK-клетки CD56^{dim}NKG2A⁻ способны вновь приобретать экспрессию NKG2A при стимуляции цитокинами IL-12 и IL18, причем приобретенная экспрессия коррелирует с продукцией IFN γ [Béziat и др., 2010]. Таким образом, NKG2A встречается преимущественно на наивных и на некоторых активированных NK-клетках; вероятно, этот ингибирующий рецептор важен для приобретения NK-клетками аутоотолерантности, в том числе в процессе так называемого «обучения», или «лицензирования».

Множество исследований указывают на то, что количество NKG2C-позитивных NK-клеток значительно возрастает при заражении цитомегаловирусом [Chiesa Della и др., 2016; Foley и др., 2012; Lopez-Vergès и др., 2011; Muntasell и др., 2013]. Какой вклад данные NK-клетки вносят в противостояние заболеванию, на данный момент точно не известно; однако показано, что они способны узнавать зараженные HCMV клетки через взаимодействие NKG2C с молекулой HLA-E, нагруженной пептидами из вирусного белка UL40 [Costa-García и др., 2015; Hammer и др., 2018]. У пациентов, инфицированных HCMV, рецептор NKG2C экспрессируется в

основном на зрелых $CD56^{dim}CD57^{+}$ NK-клетках, функционально активных и являющихся потенциальными продуцентами $IFN\gamma$ в процессе противовирусного ответа [Foley et al., 2012; Lopez-Vergès и др., 2011]. Данная субпопуляция NK-клеток относится к так называемым «адаптивным» и способна быстро реагировать на реактивацию вируса в организме [Costa-García и др., 2015; Sun, Beilke, Lanier, 2009; Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016].

Гомодимер $NKG2D$ – лектиноподобный активирующий рецептор, присутствующий на большинстве NK-клеток и узнающий различные лиганды, в том числе высокополиморфные стрессиндуцированные молекулы $MICA/B$, родственные молекулам $MHC I$, и молекулы $ULBP$ [Bauer, 1999; Cosman и др., 2001]. Показано, что количество стресс-лигандов на клетках увеличивается при злокачественной трансформации (как один из ответных механизмов на повреждение ДНК), проникновении и репликации вируса и при различных стрессовых воздействиях. Таким образом, узнавание этих молекул рецептором $NKG2D$ позволяет естественным киллерам отслеживать появление клеток, подвергшихся повреждению или злокачественному перерождению, элиминировать их, а также запускать ответ клеток CTL (cytotoxic T lymphocytes, цитотоксические Т-лимфоциты), Th1 или Th2 (T-helpers type 1/2, Т-хелперы 1-го/2-го типа). Таким образом, рецептор $NKG2D$ важен в первую очередь для иммунного надзора за опухолями и борьбы с вирусами [Guerra и др., 2008; Jamieson и др., 2002].

Рецепторы естественной цитотоксичности NCR , входящие в состав суперсемейства иммуноглобулинов, также проводят активирующий сигнал. У человека молекулы $NKp46$, $NKp80$ and $NKp30$ экспрессируются на поверхности NK-клеток как в состоянии покоя, так и при активации, тогда как молекула $NKp44$ появляется на поверхности лишь части клеток и только в состоянии активации [Pegram и др., 2011; Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016]. Для $NKp46$ и $NKp44$ подтвержденными лигандами являются вирусные гемагглютинины, а для $NKp46$ также виментин, экспрессированный, в

частности, на поверхности зараженных микобактериями туберкулеза моноцитов; для NKp30 – белок B7-H6, экспрессированный на поверхности опухолевых клеток, и HLA-B-ассоциированный транскрипт 3 (BAT3), который может высвобождаться клетками в условиях стресса; для NKp80 – лектин C-типа AICL [Pegram и др., 2011]. Предполагается, что именно NCR обеспечивают элиминацию большинства опухолевых и инфицированных внутриклеточными патогенами клеток.

Лейкоцитарные иммуноглобулиноподобные рецепторы LILRB/CD85 – ингибирующие рецепторы, связывающие молекулы MHC I (предположительно, α3- и β2-микроглобулиновые домены). Их функция окончательно не ясна, однако они способны ингибировать активацию NK-клеток аналогично рецепторам KIR и CD94–NKG2A. Кроме того, было показано, что один из рецепторов LIR реагирует с UL18, белком человеческого цитомегаловируса, и экспрессия этого лиганда увеличивает цитотоксичность NK-клеток по отношению к клеткам-мишеням [Pegram и др., 2011].

1.1.2. Субпопуляции NK-клеток

Основные субпопуляции NK-клеток определяют по экспрессии двух характерных маркеров, CD56 и CD16: традиционно, выделяют клетки CD56^{bright}CD16⁻ и CD56^{dim}CD16⁺. Субпопуляция CD56^{dim} NK-клеток преобладает в кровотоке (90–95%, против 5–10% клеток CD56^{bright}), однако в печени, эндометрии матки, децидуальной оболочке плода, лимфоузлах преобладают NK-клетки CD56^{bright} (до 75% от числа всех NK-клеток) [Ярилин, 2010]. Кроме плотности экспрессии CD56, данные субпопуляции различаются по набору цитокиновых и хемокиновых рецепторов (таблица 2) [Cooper, Fehniger, Caligiuri, 2001]. CD56^{bright}-клетки экспрессируют CCR7 и CD62L (L-селектин), что позволяет им мигрировать в лимфоузлы. С функциональной точки зрения они способны к контактному взаимодействию с дендритными клетками, характеризуются более слабой антителозависимой

цитотоксичностью, но хорошей естественной цитотоксичностью, высоким уровнем продукции цитокинов и хемокинов (IFN γ , TNF, GM-CSF, IL-10) по сравнению с CD56^{dim}-клетками, причем уже через несколько минут после активации цитокинами. Благодаря этому субпопуляция CD56^{bright} играет значительную роль в регуляции иммунного ответа [Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016]. Кроме того, NK-клетки CD56^{bright}CD16⁻ экспрессируют α -цепь рецептора IL-2, т.е. несут высокоаффинный рецептор для этого цитокина, поэтому *in vitro* они интенсивно пролиферируют в ответ на IL-2 [Ярилин, 2010]. При этом на них увеличивается экспрессия HLA-DR (подтип молекул МНС II человека) и увеличивается их цитотоксичность [Dunne и др., 2001; Evans и др., 2011]. Рецептор к IL-2 NK-клеток CD56^{dim}CD16⁺ состоит только из β - и γ -цепей и обладает промежуточной аффинностью, поэтому эти клетки слабо пролиферируют и только при действии высоких концентраций IL-2 [Ярилин, 2010]. Однако именно CD56^{dim}-клетки обладают выраженной естественной цитотоксической активностью и, кроме того, антителозависимой цитотоксичностью за счет Fc-рецептора CD16. Таким образом, клетки CD59^{dim}CD16⁺ можно охарактеризовать как преимущественно

цитотоксические, а CD56^{bright}CD16⁻ – как преимущественно регуляторные НК-клетки.

Относительно недавно в литературе появились данные об еще одной субпопуляции НК-клеток, на поверхности которых отсутствует экспрессия стандартного маркера НК-клеток CD56. Субпопуляцию CD56^{neg} определяют по экспрессии молекул CD16 и NKp46 и отсутствию экспрессии маркеров других линий иммунных клеток - CD3, CD4, CD14 и CD19 [Björkström, Ljunggren, Sandberg, 2010]. Данная субпопуляция составляет всего лишь несколько процентов от общего числа циркулирующих НК-клеток у здоровых людей, однако может достигать 20-40% у пациентов, хронически инфицированных HIV, HCV или хантавирусом, а также страдающих дерматомицитозом [Antonioli, Airò, 2004; Björkström, Ljunggren, Sandberg, 2010; Milush и др., 2013]. CD56^{neg} НК-клетки характеризуются пониженной экспрессией молекул NCR, NKG2A, перфорина и гранзимов, а также сниженной способностью к естественному и антителозависимому цитотоксическому ответу и продукции IFN γ . Гипореактивность данной

	CD56 ^{bright}	CD56 ^{dim}
CD56	++ ^b	(+) ^c
CD16	-/+ ^d	++
NK receptors		
KIR	-/+	++
CD94	++	-/+
NKG2A	+ ^e	-/+
ILT-2	- ^f	+
Cytokine and chemokine receptors		
IL-2R $\alpha\beta\gamma$	+	-
IL-2R $\beta\gamma$	+	+
c-kit	+	-
IL-1RAcP	+	+
IL-1R1	+	-/+
IL-18R	+ ^g	-/+
CCR7	++	-
CXCR3	+	-/+
CXCR1	-	++
CX ₃ CR1	-	++
Adhesion molecules		
CD2	++	+
L-selectin (CD62L)	++	-/+
PEN5-PSGL-1	-	+
LFA-1	(+)	++
CD44	++	+
CD49e	++	+

Таблица 2. Экспрессия некоторых поверхностных молекул НК-клетками CD56^{bright} и CD56^{dim}. (Cooper et al., 2001)

субпопуляции не восстанавливается даже после стимуляции IL-2 [Björkström, Ljunggren, Sandberg, 2010; Milush и др., 2013].

Существует мнение, что клетки CD56^{dim}CD16⁺ представляют терминальную, а клетки CD56^{bright}CD16⁻ – промежуточную стадию развития NK-клеток [Chan и др., 2013]. Это подтверждается наличием более длинных теломерных участков в NK-клетках CD56^{bright} по сравнению с клетками CD56^{dim} [Romagnani и др., 2007]. Среди NK-клеток CD56^{dim} также можно выделить определенные стадии развития. Согласно данным [Björkström и др., 2010], процесс дифференцировки NK-клеток CD56^{dim} непрерывен и характеризуется постепенной потерей пролиферативной способности и соответствующим изменением спектра поверхностных молекул: CD56^{dim} NK-клетки постепенно теряют экспрессию NKG2A и приобретают маркер “старения” CD57 и ингибирующие рецепторы KIR. Тогда как экспрессия NKG2A, как уже упоминалось выше, может возрастать снова при активации NK-клеток, до последнего времени считалось, что появление CD57 и KIR необратимо как *in vivo*, так и *in vitro*. В результате работы нашей группы на клональных популяциях NK-клеток было показано, что экспрессия CD57 также может быть обратима в определенных стимулирующих условиях [Streltsova и др., 2018a]. Таким образом, дифференцировку NK-клеток сложно назвать линейной: *in vivo* в организме в каждый момент времени присутствуют все возможные паттерны экспрессии NKG2A и KIR на CD57⁺ и CD57⁻ CD56^{dim} NK-клетках [Björkström и др., 2011]. Наиболее зрелые NK-клетки NKG2A⁻ KIR⁺CD57⁺CD56^{dim} характеризуются слабой экспрессией IL-2R β , главной субъединицы рецепторов IL-2 и IL-15, в связи с чем плохо пролиферируют и не продуцируют IFN γ в ответ на цитокины, однако способны к полноценному функционированию в качестве цитотоксических и цитокин-продуцирующих клеток при распознавании клеток-мишеней с помощью NCR или рецептора CD16 [Björkström и др., 2010; Lopez-Vergès и др., 2010].

1.1.3. Адаптивные НК-клетки, экспрессирующие NKG2C

Во многих современных работах по изучению НК-клеток человека описывается субпопуляция, численность которой в периферической крови увеличивается под действием HCMV-инфекции. Клетки из данной субпопуляции обладают экспрессией активирующего рецептора CD94/NKG2C и маркера терминальной дифференцировки CD57 [Lopez-Vergès и др., 2011]. Экспансия НК-клеток NKG2C⁺ также наблюдается после заражения хантавирусом [Björkström и др., 2011], вирусом Чикунгунья [Petitdemange и др., 2011], а также у пациентов HIV, одновременно серопозитивных по HCMV [Brunetta и др., 2010; Lugli, Marcenaro, Mavilio, 2014]. С помощью методов иммунофлуоресценции и внутриклеточного окрашивания было показано, что субпопуляция НК-клеток CD57⁺NKG2C⁺ человека обладает высокодифференцированным фенотипом: CD56^{dim}CD16⁺KIR⁺NKG2A⁻, а также имеет высокий уровень экспрессии активирующих KIR-рецепторов, специфичных к молекулам МНС I собственного организма, но пониженной экспрессией рецепторов натуральной цитотоксичности NKp46 и NKp30 за счет снижения экспрессии трансмембранной адапторной молекулы FcεRIγ [Zhang и др., 2013]. Данные клетки обладают некоторыми свойствами адаптивного иммунитета: экспансия при активации, усиленный эффекторный ответ при повторной встрече с патогеном, большая продолжительность жизни клеток (по разным данным от 4 месяцев до 1 года), а также определённые эпигенетические модификации, например, ремоделирование регуляторных областей гена IFNG, что приводит к увеличенной продукции IFNγ при распознавании клетки-мишени [Goodier и др., 2018; Kovalenko и др., 2017; Chiesa Della и др., 2016; Guma и др., 2004; Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016]. Таким образом, в настоящее время считается, что субпопуляция CD57⁺NKG2C⁺ представляет собой НК-клетки, обладающие иммунологической памятью [Serwenka, Lanier, 2016]. Было показано, что эти клетки проявляют усиленную функциональную активность при

взаимодействии с опухолевыми клетками [Peng, Tian, 2017].

1.1.4. Энергетический метаболизм НК-клеток

Исследование особенностей метаболизма иммунных клеток помогает понять, как изменения в метаболических путях влияют на их активацию и функционирование. Значительный прогресс был достигнут в выявлении метаболических сдвигов, важных для развития, дифференцировки, активации, эффекторной функции и/или формирования памяти в мышинных Т-клетках, макрофагах и дендритных клетках. Несколько недавних исследований показали, что многочисленные функции НК-клеток также метаболически регулируются [Gardiner, Finlay, 2017; Mah, Cooper, 2016]. В покоящихся НК-клетках как у мышей, так и у человека метаболическая активность низкая, с малой вовлеченностью процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования. Однако при стимуляции НК-клеток цитокинами интенсивность данных процессов возрастает в разы, увеличивается потребление глюкозы, в первую очередь, для гликолиза, возрастает митохондриальная масса и производство АТФ (аденозинтрифосфата) [O'Brien, Finlay, 2019]. При блокировке данной метаболической перестройки НК-клетки теряют способность к полноценной продукции IFN γ и реализации цитотоксического ответа [O'Brien, Finlay, 2019]. При этом, показано, что две основные субпопуляции НК-клеток CD56^{bright} и CD56^{dim} демонстрируют разную метаболическую активность: при цитокиновой стимуляции клетки CD56^{bright} интенсивнее увеличивают экспрессию нутриентных рецепторов и потребление глюкозы [Keating и др., 2016]. Также методом РНК-секвенирования было показано, что наибольшей экспрессией ряда метаболических ферментов и транспортеров питательных веществ обладают предшественники НК-клеток (pre-NK cells), по сравнению с промежуточно и терминально дифференцированными НК-клетками [Schaum и др., 2018]. Адаптивные НК-клетки, как субпопуляция с особыми

функциональными свойствами, характеризуются повышенным уровнем митохондриальной массы и митохондриального потенциала, а также окислительного фосфорилирования [Cichocki и др., 2018]. Большая часть метаболических процессов, которые запускаются в НК-клетках при активации, регулируются комплексом m-TORC1: при его блокировке НК-клетки снижают продукцию IFN γ , пролиферативную и цитотоксическую активность [O'Brien, Finlay, 2019].

1.1.5. Влияние цитокинов на функциональную активность НК-клеток

Функциональная активность, пролиферация и миграция НК-клеток регулируется большим набором цитокинов и хемокинов, продуцируемых окружающими клетками, а также непосредственными контактными взаимодействиями с потенциальными клетками-мишенями. Число и набор рецепторов на поверхности НК-клетки может варьировать в зависимости от стадии дифференцировки, принадлежности к той или иной субпопуляции, нахождения в состоянии покоя или активации.

IL-15 необходим для дифференцировки и поддержания постоянства численности популяции НК-клеток, так как он тормозит программируемую клеточную гибель [Lodolce и др., 2002]. IL-2 индуцирует пролиферацию и усиление цитотоксической функции НК-клеток, и широко используется для поддержания жизнеспособности НК-клеток в культуре [Becker и др., 2016; Dunne и др., 2001; London, Perussia, Trinchieri, 1986]. Кроме того, функциональную активность НК-клеток значительно повышают провоспалительные цитокины, продуцируемые преимущественно моноцитами и дендритными клетками, такие как интерфероны I типа, IL-12 и IL-18 [Коваленко Е.И., Стрельцова, 2016]. IL-15, IL-12 и IL-18 известны как стимуляторы интенсивной продукции IFN γ НК-клетками [Lusty и др., 2017]. Комбинации перечисленных выше цитокинов используется для наращивания и активации НК-клеток *in vitro* [Becker и др., 2016; Klingemann, Martinson,

2004; Senju и др., 2018; Shimasaki, Jain, Campana, 2020; Suck и др., 2011], а также в клинике в качестве терапевтических агентов [Janssen и др., 1993; Vukicevic и др., 2010]. Помимо этого, в ряде исследований показано, что стимуляция IL-12 совместно с IL-15 и IL-18 может индуцировать развитие НК-клеток, обладающих чертами клеток памяти [Romee и др., 2016].

Еще один цитокин, IL-21, синтезируемый преимущественно Т-клетками, играет важную роль в регулировке функциональной активности НК-клеток [Park и др., 2012; Skak, Frederiksen, Lundsgaard, 2008]. IL-21 способствует как пролиферации, так и созреванию НК-клеток в костном мозге в синергии с IL-15. *In vitro* в его присутствии, как вместе с IL-2, так и без него, усиливается продукция цитокинов и цитотоксичность НК-клеток человека, а также меняется репертуар поверхностных рецепторов. Под воздействием IL-21 в комбинации с IL-2 и IL-15 повышается экспрессия CD25, CD86 and CD69, продукция IFN γ , а сами клетки становятся более крупными и гранулярными [Skak и др., 2008; Park и др., 2012]. Растворимый IL-21, а также генетически модифицированные клетки линии K562, экспрессирующие IL-21 в мембраносвязанной форме на поверхности (K562-mbIL21), являются перспективными компонентами среды для наращивания НК-клеток с повышенной цитотоксичностью в целях применения в адоптивной противоопухолевой иммунотерапии [Denman и др., 2012; Wang и др., 2013]. Для наработки больших количеств НК-клеток в разное время использовали различные комбинации цитокинов, стромальных клеток, покрытые антителами бусины, а также фидерные клетки K562 или EBV-лимфобластоидных линий, экспрессирующие определенные молекулы (4-1BBL, мембраносвязанный IL-15, MICA) [Becker и др., 2016; Shimasaki, Jain, Campana, 2020]. При использовании клеток K562, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21 (mbIL-21), вместе с низкими дозами IL-2 удалось добиться особенно хороших результатов: в одном из исследований за 42 дня количество НК-клеток возрастало более чем в 10^8 раз; авторы утверждали, что

длина теломер увеличивалась по сравнению с клетками *ex vivo*, препятствуя «старению» клеток [Denman и др., 2012]. Данная методика наращивания и активации клеток *in vitro* удобна в использовании и может применяться не только в целях наработки НК-клеток для терапии, но и помочь в исследованиях влияния активирующего окружения на физиологию и функциональную активность НК-клеток, а также для разработки методов направленного влияния на свойства НК-клеток. В данной работе для наращивания и активации НК-клеток использовали схемы, включающие IL-2 и K562-mbIL21, а также растворимые цитокины (IL-2, IL-21, IL-18).

Рецепторы к IL-2 и IL-21 имеют общую γ -цепь, а также дополнительные цепи, специфичные для каждого конкретного цитокина: IL-2R α , IL-2R β и IL-21R α [Ярилин, 2010]. В отличие от большинства рецепторов факторов роста, рецепторы цитокинов типа I не обладают внутренней протеинкиназной активностью в своих цитоплазматических доменах. Для передачи сигналов от этой группы цитокинов, необходима ассоциация тирозинкиназы JAK1 с цитокин-специфическими рецепторными цепями (IL-2R β , IL-21R, но не IL-2R α) и тирозинкиназы JAK3 с γ -цепью [Leonard, O'Shea, 1998]. Предполагается, что конформационные изменения сформированных комплексов «рецептор-JAK», индуцированные лигандом, позволяют осуществлять последовательное трансфосфорилирование JAK3, а затем JAK1 [Nakamura и др., 1994; Nelson, Lord, Greenberg, 1994]. Активированные JAK3 и JAK1 фосфорилируют ключевые остатки тирозина в цитоплазматическом домене цитокин-специфичной рецепторной цепи (IL-2R β или IL-21R α), которые становятся сайтами связывания для белков «трансдукторов сигнала и активаторов транскрипции» (Signal Transducer and Activator of Transcription – STAT) через их домены SH2; затем эти белки фосфорилируются киназами JAK, димеризуются и транслоцируются в ядро [Leonard, O'Shea, 1998]. Факторы STAT оказывают влияние на многие процессы: пролиферацию клеток, дифференцировку, выживание, апоптоз и онкогенную трансформацию. При

лигировании рецептора IL-2 преимущественно активируется фактор STAT5, тогда как сигналы от IL-21R в основном поступают через STAT3 [Zeng и др., 2007]. Кроме STAT-опосредованного пути, хорошо охарактеризованы еще два пути передачи сигнала, активируемые цитокиновыми рецепторами с общей γ -цепью: сигнальный путь через фосфоинозитид-3-киназу и киназу Akt (PI3K/Akt) и через белок-адаптер Shc, ГТФазу RAS и митоген-активируемую протеинкиназу (RAS/MAPK) [Habib и др., 2002; Kovanen, Leonard, 2004]. PI3K и Shc также связываются с фосфорилированными остатками тирозина на цитокин-специфичной цепи рецептора.

Существует четыре основных терминальных киназы MAPK-пути у млекопитающих: киназа, регулируемая внеклеточными сигналами 1/2 (extracellular signal-activated kinase, ERK1/2), киназа, регулируемая внеклеточными сигналами 5 (extracellular signal-activated kinase 5, ERK5, называемая также Big MAP kinase-1 – BMK1), c-Jun N-терминальная киназа (c-Jun N-terminal kinase, JNK) и p38 MAP-киназа. Как правило, сигнал идет по ERK-зависимому пути в ответ на цитокины и факторы роста, тогда как JNK- и p38-опосредованные пути обычно отвечают на различные внеклеточные стрессовые сигналы [McKay, Morrison, 2007; Yang, Sharrocks, Whitmarsh, 2013]. Далее терминальные киназы взаимодействуют непосредственно с транскрипционными факторами, активируя их (например, фактор c-Myc). На рис. 2 представлены основные вышеописанные сигнальные пути на примере сигналинга от IL-2.

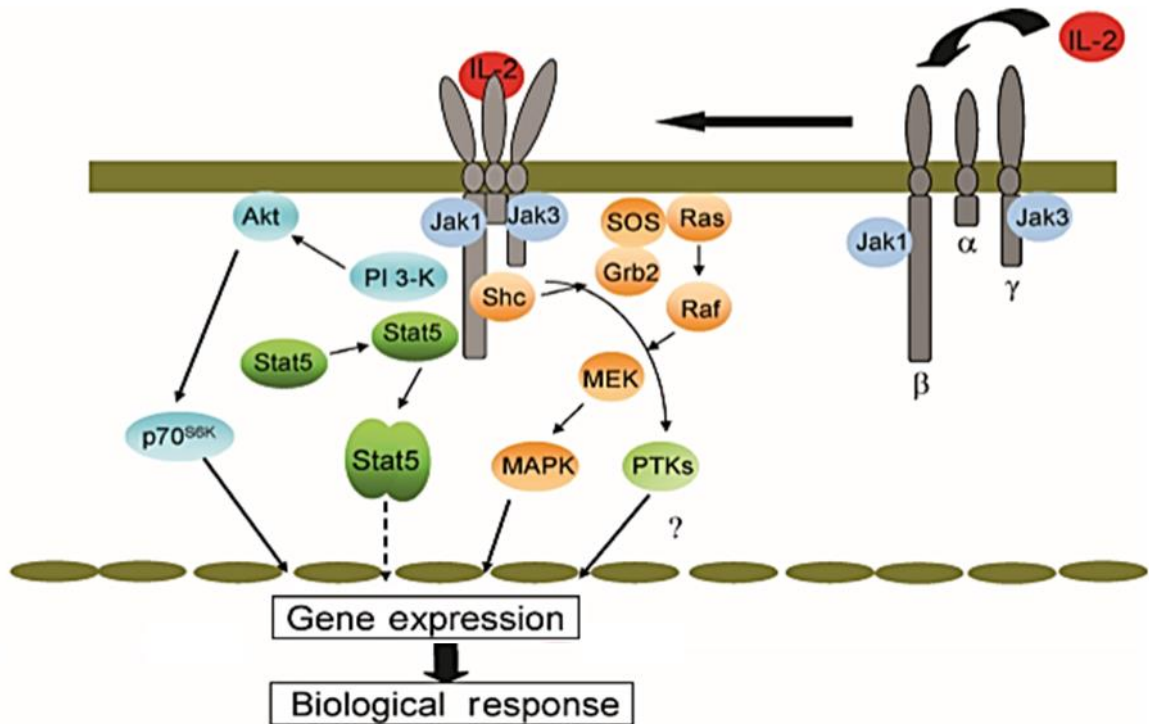


Рис. 2. Схематическое изображение основных сигнальных путей, активированных IL-2 [Kovanen, Leonard, 2004]

Поскольку рецептор IFN γ экспрессируется на поверхности всех клеток организма, кроме эритроцитов [Farrar, Schreiber, 1993], весьма вероятно, что он также может оказывать прямое воздействие на функциональную активность NK-клеток [Ivashkiv, 2018; Li и др., 2014; Li и др., 2015]. Рецептор IFN γ (IFN γ R) состоит из двух субъединиц: лиганд-связывающей IFN γ R1 и структурной IFN γ R2. Сигнальные пути от IFN γ R в ядро клетки проходят в основном через сигнальный путь JAK1/3-STAT1 [Roda и др., 2006], но также могут реализоваться и через MAP/ERK1/2-путь [Gough и др., 2008], по аналогии с передачей сигнала от рецепторов с общей γ -цепью, описанных выше.

1.2. HLA-DR-позитивные NK-клетки

HLA-DR как маркер активации был впервые описан для Т-клеток, отвечающих на стимуляцию различными митогенами и антигенами, а также в смешанных лимфоцитарных реакциях [Evans и др., 1978; Salgado и др., 2002].

Было показано, что HLA-DR появляется на поверхности лишь части Т-лимфоцитов и позже всех остальных активационных маркеров (CD69, CD25, CD71) [Caruso и др., 1997]. Одновременно с этим, сходное увеличение экспрессии молекулы HLA-DR было показано для NK-клеток, наращиваемых в присутствии различных стимулов либо в смешанных лимфоцитарных реакциях *in vitro* [Benlahrech и др., 2009; Evans и др., 2011; Loyon и др., 2016; Phillips, Le, Lanier, 1984; Rabinowich и др., 1994]. В NK-клетках динамика появления HLA-DR на поверхности также не коррелировала с другими активационными маркерами, такими как CD25, и данную молекулу стали считать маркером «поздней» активации [Lucia и др., 1997]. Также появлялись данные об увеличенном процентном содержании HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции NK-клеток при различных патологических состояниях, таких как инфицирование HIV [Luo и др., 2017; Marras и др., 2013; Naluyima и др., 2014], различные аутоиммунные заболевания [Aranami, Miyake, Yamamura, 2006; Cruz-Gonzales и др., 2018; Ng и др., 2009; Rinaldi и др., 2006; Yano и др., 1996], туберкулез [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005], что указывало на физиологическую значимость данной субпопуляции *in vivo*. Кроме того, различные по объему субпопуляции HLA-DR-позитивных NK-клеток были обнаружены в крови и различных органах у здоровых людей. Увеличение доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, также было зарегистрировано *in vitro* при стимуляции NK-клеток различными растворимыми цитокинами [Evans и др., 2011; Loyon и др., 2016; Senju и др., 2018; Vukicevic и др., 2010], клеточными линиями, периферическими мононуклеарными клетками и дендритными клетками [Benlahrech и др., 2009; Delso-Vallejo и др., 2017; Langers и др., 2014], при лигировании определенных поверхностных рецепторов [Rabinowich и др., 1994; Rölle и др., 2016].

Общеизвестной функцией молекулы HLA-DR, как и всех подтипов МНС II, является участие в презентации антигена, в связи с чем данная молекула высоко экспрессируется на профессиональных антиген-презентирующих

клетках: моноцитах/макрофагах, дендритных клетках, В-клетках [Rock, Reits, Neefjes, 2016]. Вопрос о функциональной роли HLA-DR на NK-клетках интересен и до сих пор дискусионен. С одной стороны, накапливается все больше данных о связи экспрессии HLA-DR на NK-клетках с такими характеристиками как повышенная продукция IFN γ [Yano и др., 1996], высокая пролиферативная активность [Evans и др., 2011] и уровень дегрануляции [Luo и др., 2017; Serti и др., 2015]. С другой стороны, начиная с самых ранних исследований в этой области, имеются работы, в которых показана способность HLA-DR-позитивных NK-клеток перерабатывать и презентировать на поверхности определенные антигены и, как следствие, стимулировать активацию и пролиферацию специфичных Т-клеток [Burt и др., 2009; Costa-García и др., 2019; Roncarolo и др., 1991; Voynova, Skinner, Bolland, 2015]. Однако, данных, описывающих данный процесс, все еще очень мало, и роль NK-клеток как антиген-презентирующих во время развития иммунного ответа нуждается в дополнительных исследованиях.

1.2.1. HLA-DR-позитивные NK-клетки в норме

HLA-DR-позитивные NK-клетки обнаруживаются у здоровых доноров как в крови, так и в различных иммунокомпетентных органах. В периферической крови доля таких клеток может составлять, по разным данным, от 0 до 37,7% от всех NK-клеток (конкретные данные по публикациям представлены в таблице 3) [Burt и др., 2009; D'Orazio, Stein-Streilein, 1996; Evans и др., 2011; Mizrahi и др., 2007]. Для такого разброса значений может быть несколько причин: 1) использование для детекции экспрессии HLA-DR моноклональных антител разных производителей и с разными флуорофорами; 2) индивидуальные особенности доноров – так, группой Costa-García было показано, что у части доноров процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в крови повышено в связи с увеличением доли клеток HLA-DR⁺ в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺, зачастую ко-экспрессирующих NKG2C [Costa-

García и др., 2019]. В субпопуляции CD56^{bright} экспрессия HLA-DR была высокой во всех случаях. При этом, экспрессия HLA-DR не соотносилась с экспрессией других маркеров активации, таких как CD25 и CD69 [Costa-García и др., 2019; Lucía и др., 1997].

Таблица 3. Содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в различных органах.

* Процент клеток HLA-DR⁺ среди всех NK-клеток был пересчитан из исходных данных, описывающих содержание HLA-DR⁺ NK-клеток в процентах от общего числа клеток в органе [Burt и др., 2009], предполагая, что DR^{lo} NK-клетки + DR^{neg} NK-клетки вместе составляют целую популяцию NK-клеток каждого органа.

Орган	Доля клеток HLA-DR ⁺ , среди всех NK-клеток	Ссылки
Кровь	Около 4%* 9.3 – 37.7% 2.0 – 5.5% 0-1%	Burt et al., 2008 D’Oracio et al., 1996 Evans et al., 2011 Mizrahi et al., 2007
Селезенка	Около 20%*	Burt et al., 2008
Печень	Около 22%*	Burt et al., 2008
Лимфатический узел	Около 45%*	Burt et al., 2008
Аденоиды	50-70%	Mizrahi et al., 2007

Также опубликованы данные об обнаружении HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции NK-клеток в селезенке, печени, лимфоузлах и аденоидах (таблица 3) [Burt и др., 2009; Mizrahi и др., 2007]. Согласно этим данным, в иммунокомпетентных органах данная субпопуляция присутствует на стабильно высоком уровне, в особенности в лимфоузлах. Данный факт косвенно указывает на участие HLA-DR-позитивных NK-клеток в регулировке адаптивного иммунного ответа и, возможно, в антигенпрезентации.

1.2.2. HLA-DR-позитивные NK-клетки при патологии

Повышенное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в периферической крови выявлено для многих патологических состояний, таких как инфицирование HIV и другими вирусами, туберкулез, различные аутоиммунные заболевания, онкология. При этом, в зависимости от ситуации, данная субпопуляция может играть как позитивную, так и негативную роль в борьбе с заболеванием. Ниже рассмотрены опубликованные случаи экспансии HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции NK-клеток у пациентов, а также возможности ее использования в качестве диагностического либо прогностического критерия.

1.2.2.1. HLA-DR-позитивные NK-клетки при инфицировании HIV

В нескольких независимых исследованиях показано, что у пациентов с HIV повышена доля клеток, экспрессирующих HLA-DR, по сравнению со здоровыми донорами в субпопуляции более зрелых NK-клеток CD56^{dim}CD16⁺ как до, так и после антиретровирусной терапии (АРТ) [Lichtfuss и др., 2012a; Marras и др., 2013; Naluyima и др., 2014]. В то же время, в субпопуляции CD56^{bright} различий не выявлено – в данной субпопуляции доля HLA-DR-позитивных NK-клеток стабильно высока и у здоровых, и у больных [Lichtfuss и др., 2012a; Luo и др., 2017]. Особенно высокие показатели доли NK-клеток HLA-DR⁺ были зарегистрированы у когорты людей HIV⁺, способных к длительному сдерживанию вируса без развития клинических признаков синдрома приобретенного иммунодефицита: elite controllers (EC) – титр вируса в крови ниже уровня, характерного для активной инфекции; long-term non-progressors (LTNP) – титр вируса не выше 1000 ед./мл и уровень CD4⁺ Т-клеток в норме. Согласно данным Marras и др., у таких пациентов процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в крови негативно коррелировало с содержанием менее дифференцированных клеток NKG2A⁺CD56^{dim} [Marras и др., 2013]. Кроме того, у данной группы людей была

повышена доля НК-клеток, несущих маркеры дифференцировки CD57⁺ и CD85j⁺. Вкупе представленные данные позволяют сделать предположение о переходе периферических НК-клеток у пациентов ЕС и LTNP к более зрелому фенотипу CD57⁺CD85j⁺NKG2A⁻, параллельно с увеличением экспрессии маркера активации HLA-DR.

В другой работе было показано, что у пациентов из Уганды с хронической инфекцией HIV-1 типа D, не получавших лечение, слабая функциональная активность НК-клеток была ассоциирована со снижением доли субпопуляции NKG2A⁺CD57⁺. Данная субпопуляция характеризовалась, в том числе, повышенным содержанием HLA-DR-экспрессирующих клеток по сравнению со здоровыми донорами [Naluyima и др., 2014]. Доля NKG2A⁺CD57⁺ НК-клеток в крови пациентов положительно коррелировала с процентным содержанием IFN γ -продуцирующих клеток.

Суммировав имеющиеся данные, можно предположить, что у индивидумов, зараженных HIV, в ответ на вирус в крови появляются активированные HLA-DR-позитивные НК-клетки. Однако, в отличие от пациентов из групп ЕС и LTNP, по неизвестной пока причине ингибируется их периферическое созревание, в связи с чем наблюдается сниженная доля переходной субпопуляции NKG2A⁺CD57⁺. Как следствие, в периферической крови уровень IFN γ -продуцирующих НК-клеток снижен, что, возможно, является одной из причин прогрессирования заболевания. Таким образом, зрелые НК-клетки с фенотипом HLA-DR⁺ могут обладать протективными свойствами в борьбе против HIV.

С другой стороны, опубликованы данные о том, что HLA-DR-позитивные НК-клетки могут мешать выздоровлению пациентов с HIV, находящихся на АРТ. Группа Luo и др. показала, что у пациентов, не отвечающих на АРТ, доля HLA-DR-позитивных НК-клеток достоверно выше, чем у выздоравливающих [Luo и др., 2017]. При этом процентное содержание

NK-клеток HLA-DR⁺ прямо коррелировало с долей CD107a-экспрессирующих клеток, то есть, участвовавших в дегрануляции, и отрицательно коррелировало с количеством CD4⁺ Т-клеток в крови пациентов. Авторы предполагают, что чрезмерно активированные HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки проявляют цитотоксическую активность по отношению к восстанавливаемому пулу CD4⁺ Т-клеток, препятствуя их восполнению. В другом исследовании также было показано, что после АРТ среди NK-клеток не снижается доля HLA-DR-экспрессирующих, в отличие от CD8⁺ или CD4⁺ Т-клеток [Lichtfuss и др., 2012a]. В целом, у данной группы пациентов после АРТ наблюдались высокие уровни маркеров активации миелоидной ветви иммунитета и спонтанной дегрануляции NK-клеток, однако не было отмечено никакой связи данных признаков с титром вируса или с количеством CD4⁺ Т-клеток. Таким образом, вопрос о негативной роли HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток у пациентов, проходящих курс АРТ, остается открытым.

1.2.2.2. HLA-DR-позитивные NK-клетки при других вирусных инфекциях

Показано, что доля HLA-DR⁺ NK-клеток повышается у пациентов, инфицированных вирусом Денге, во время острой фазы заболевания [Azeredo и др., 2006]. Экспрессия HLA-DR на NK-клетках также может быть повышена при хроническом инфицировании вирусом гепатите С (hepatitis C virus, HCV), при этом, данное состояние NK-клеток сопровождается их повышенной цитотоксической активностью и сниженной продукцией цитокинов по сравнению с клетками здоровых доноров. После специфической анти-HCV терапии у большинства пациентов показатели нормализовались, однако, у части больных наблюдалось возвращение вируса, и в таком случае повышенная экспрессия HLA-DR сохранялась [Serti и др., 2015].

Известно, что при инфицировании HCMV у большинства людей происходит экспансия субпопуляции высокодифференцированных NK-клеток

периферической крови, экспрессирующих рецептор NKG2C и проявляющих черты клеток памяти. Показано, что у таких людей наблюдается также высокая доля HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток в субпопуляции CD56^{dim}, в том числе клеток HLA-DR⁺NKG2C⁺, по сравнению с индивидами без экспансии NK-клеток NKG2C⁺ вне зависимости от их серостатуса по HCMV [Costa-García и др., 2019; Rölle и др., 2016]. При этом, в одной из работ было показано, что на NK-клетках CD56^{dim}NKG2C⁺ были также повышены маркеры активации CD25 и CD69 [Rölle и др., 2016], в то время как по данным другого исследования эти данные не подтвердились [Costa-García и др., 2019]. Costa García с соавторами также показали, что NK-клетки с высоким уровнем экспрессии NKG2C и HLA-DR способны интернализировать комплексы HCMV-антитело и затем стимулировать антиген-специфическую активацию CD4⁺ Т-клеток.

1.2.2.3. HLA-DR-позитивные NK-клетки при туберкулезе

В двух независимых исследованиях было продемонстрировано, что среди NK-клеток из плевральной жидкости пациентов с туберкулезом повышена доля HLA-DR-экспрессирующих, по сравнению со значениями как в периферической крови тех же больных [Schierloh и др., 2005], так и в плевральной жидкости пациентов без туберкулеза [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009]. Экспрессия HLA-DR была увеличена и в субпопуляции CD56^{dim}, и в субпопуляции CD56^{bright} [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009], однако, NK-клетки CD56^{bright} преобладали в плевральной жидкости туберкулезных больных. Данный факт объясняется, по мнению авторов, повышенным уровнем апоптоза среди клеток CD56^{dim} от воздействия неких растворимых факторов, выделяемых микобактериями в легких [Schierloh и др., 2005]. Помимо высокой экспрессии HLA-DR, NK-клетки CD56^{bright} из плевральной жидкости также характеризовались повышенной экспрессией TLR (toll-like receptors, толл-подобные рецепторы) [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009], CD94, NKG2A, CD62L, и CCR7 и интенсивной продукцией IFN γ в ответ на стимуляцию *M. tuberculosis*

[Schierloh и др., 2005], что может говорить об их роли в качестве первичных «сенсоров» микобактерий и модуляторов дальнейшего развития иммунного ответа.

Evans с соавторами показали, что доля HLA-DR-позитивных NK-клеток возрастает при длительном (до 6 дней) культивировании *in vitro* в присутствии BCG, ослабленного штамма *Mycobacterium bovis* [Evans и др., 2011]. Исследователи также измеряли продукцию IFN γ NK-клетками в ответ на данную бактерию и получили широкий спектр значений, от близких к нулю до 70% продуцирующих цитокин клеток. Разделив всех доноров на 2 группы, «низко отвечающих» (до 6,5% IFN γ -продуцирующих NK-клеток) и «высоко отвечающих» (более 6,5 %), исследователи выявили, что в группе «высоко отвечающих» доля HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток достоверно выше. Также было отмечено, что продукция IFN γ в ответ на стимуляцию BCG значительно снижалась при добавлении блокирующих антител к MHC II. Возможно, молекулы HLA-DR играют роль во взаимодействии NK-клеток с микобактериями. В целом, следует отметить, что во всех упомянутых работах отмечается разрастание популяции HLA-DR⁺ NK-клеток в присутствии микобактерий, и что экспрессия HLA-DR ассоциирована с увеличенной продукцией IFN γ данными клетками.

1.2.2.4. HLA-DR-позитивные NK-клетки при аутоиммунных заболеваниях

Показано, что у пациентов с IgA-нефропатией увеличено процентное содержание HLA-DR-экспрессирующей популяции NK-клеток в периферической крови по сравнению как с пациентами с не-IgA мезангиальным пролиферативным гломерулонефритом, так и со здоровыми донорами [Yano и др., 1996]. Помимо этого, у таких пациентов процентная доля NK-клеток HLA-DR⁺ положительно коррелировала с содержанием мРНК гена IFN γ и отрицательно коррелировала с изменениями в клиренсе

креатинина, по которому оценивали почечную функцию больных. Таким образом, не исключено, что активированная субпопуляция HLA-DR-позитивных NK-клеток участвует в патогенезе и развитии IgA-нефропатии за счет повышенной продукции IFN γ и создания провоспалительного окружения для инфильтрирующих гломерулы моноцитов [Yano и др., 1996].

При рассеянном склерозе также отмечается повышенное содержание NK-клеток HLA-DR⁺ в периферической крови. Среди пациентов с недавно диагностированным заболеванием была зарегистрирована увеличенная доля данной субпопуляции у больных с высокой и средней встречаемостью очагов атипичной активности на МРТ (магнитно-резонансной томографии) головного мозга по сравнению с пациентами без таких очагов [Rinaldi и др., 2006]. При этом, процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток у МРТ-активных больных оставалось высоким на протяжении всего периода наблюдений в течение года. Всего авторы обнаружили различия по 10 различным субпопуляциям периферических лимфоцитов. Алгоритм, построенный на основании полученных данных, позволил с чувствительностью 91.7% и специфичностью 87.5% корректно определить будущих МРТ-активных и неактивных пациентов по данным всего лишь трех первых временных точек (4,5 месяца наблюдений). Авторы предполагают, что выявленные различия в процентной доле различных популяций лимфоцитов, в том числе NK-клеток HLA-DR⁺, могут помочь в предсказании возможной активности на МРТ на ранних стадиях рассеянного склероза [Rinaldi и др., 2006].

Согласно другому исследованию, у пациентов с рассеянным склерозом в ремиссии также увеличена доля HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток [Aranami, Miyake, Yamamura, 2006]. Авторы данной работы разделили всех обследованных индивидуумов на 2 группы: с высокой и низкой (на уровне здоровых доноров) экспрессией маркера CD11c в PBMC. В группе CD11c^{high} доля NK-клеток HLA-DR⁺ была еще выше, чем у пациентов CD11c^{low}. В

дальнейшем на новой когорте пациентов было выявлено, что у 60% индивидуумов из группы с высокой экспрессией CD11c и HLA-DR болезнь вернулась в течение 120 дней после обследования, в то время как из группы CD11c^{low} – только у 15%. По аналогии с предыдущей работой, авторы предлагают использовать описанные в статье маркеры для мониторинга течения заболевания [Aranami, Miyake, Yamamura, 2006].

У пациентов с системной красной волчанкой (systemic lupus erythematosus, SLE) также была обнаружена увеличенная субпопуляция NK-клеток, ко-экспрессирующих маркеры CD11c и HLA-DR [Cruz-Gonzales и др., 2018]. Помимо этого, у них была повышена доля NK-клеток, экспрессирующих ко-стимуляторные молекулы CD86 и CD134 (OX40) и ингибирующий рецептор ILT-2. Обладающие такими характеристиками NK-клетки демонстрировали повышенную киллерную активность по отношению как к наивным (iDC), так и к зрелым (mDC) дендритным клеткам (dendritic cells, DC), которая, однако, не приводила к увеличению на них маркера дегрануляции CD107a и, вероятно, была опосредована Fas-FasL или TRAIL-TRAIL-R взаимодействиями. В целом, как суммируют полученные результаты авторы, сложно определить, негативную или позитивную роль играют NK-клетки CD11c⁺HLA-DR⁺ в развитии SLE: с одной стороны, ко-стимулирующие взаимодействия с DC через OX40-OX40L с последующим вероятным лизисом последних могут приводить к дальнейшей эскалации воспаления и потере ауто-толерантности; с другой стороны, лизис iDC и mDC, как клеток, потенциально презентующих ауто-антигены, может играть роль в защите от развития заболевания [Cruz-Gonzales и др., 2018]. Однако, в данной работе авторами практически не рассматриваются гуморальные эффекты субпопуляции CD11c⁺HLA-DR⁺CD56⁺.

В то же время, в двух последовательно опубликованных работах на мышцах, выполненных на экспериментальной TLR7-трансгенной мышью

модели красной волчанки, было показано, что особая субпопуляция NK1.1⁺CD11c⁺CD122⁺MHCII⁺, содержание которой значительно повышено в различных мышинных моделях SLE, индуцирует аутоиммуно-подобное заболевание при адоптивном переносе в мышей дикого типа [Voynova и др., 2015; Voynova, Skinner, Bolland, 2015]. Данная субпопуляция сочетает в себе признаки NK-клеток и клеток, описанных как «IFN γ -продуцирующие дендритные клетки»: они зависят от IL-15, продуцируют IFN типа I и II при активации, способны осуществлять как цитотоксическую активность, так и MHC-II-зависимую антиген-презентацию. Кроме того, они обладают высокой пролиферативной активностью и популяционно стабильны при адоптивном переносе [Voynova и др., 2015; Voynova, Skinner, Bolland, 2015].

1.2.2.5. HLA-DR-позитивные NK-клетки при раке

В работе Carrega с соавторами показано, что при не-мелкоклеточном раке легкого повышено содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток непосредственно в зоне опухолевой трансформации, по сравнению с прилежащими областями здорового легкого и с периферической кровью. Данные клетки преимущественно имеют фенотип CD56^{bright}, и среди них также много клеток NKp44⁺, NKG2A⁺, но мало клеток CD16⁺ и KIR⁺. Помимо этого, клетки непосредственно из опухоли содержали мало перфорина и проявляли слабую цитотоксическую активность по сравнению с клетками вокруг опухоли и клетками крови, однако, сохраняли способность продуцировать IFN γ и TNF- α [Carrega и др., 2008].

Приведенные данные демонстрируют, что экспансия HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, как в периферической крови, так и непосредственно в месте поражения, характерна для многих патологических состояний и в целом, по-видимому, связана с наличием про-воспалительного окружения. Во всех описанных случаях, кроме NK-клеток из опухолевого

инфильтрата, экспрессия HLA-DR была связана с повышенной продукцией IFN γ и/или цитотоксичностью. Таким образом, данная субпопуляция представляет собой NK-клетки с повышенной функциональной и, зачастую, пролиферативной активностью. Внутри опухоли, вероятно, данные свойства элиминируются супрессорным микроокружением. При этом, высокая функциональная активность не всегда оказывается преимуществом: если при вирусной инфекции и туберкулезе наличие HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток можно отнести к критериям благоприятного прогноза, то при аутоиммунных заболеваниях данная субпопуляция, по-видимому, участвует в развитии патологического процесса как за счет излишней секреции цитокинов (IFN γ), так и за счет неверно направленной цитотоксичности. Однако в некоторых случаях информация о содержании в крови HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток может оказаться полезна для диагностики либо предсказания течения заболевания, как в случае с рассеянным склерозом.

1.2.3. Индукция экспрессии HLA-DR на NK-клетках

К настоящему времени выявлен ряд факторов, обуславливающих увеличение процентной доли HLA-DR-позитивных NK-клеток в культуре *in vitro*, как гуморальных, так и связанных с межклеточными взаимодействиями. Показано, что увеличение доли HLA-DR-позитивной субпопуляции NK-клеток вызывают цитокины IL-2, IL-15, IL-18, IL-21 [Evans и др., 2011; Loyon и др., 2016; Senju и др., 2018; Vukicevic и др., 2010], особенно эффективной оказалась комбинация IL-2 и IL-21 [Loyon и др., 2016]. При этом, как утверждают Loyon с соавторами, под воздействием IL-2 и IL-21 HLA-DR⁺CD86⁺ NK-клетки появлялись именно в CD56^{dim} субпопуляции, в то время как Vukicevic с соавторами наблюдали увеличение HLA-DR-позитивной субпопуляции под воздействием IL-15 на клетках CD56^{bright}. Данные о влиянии растворимого IL-2 на экспрессию HLA-DR на NK-клетках человека также подтверждены *in vivo* в ходе клинических испытаний противораковой

цитокиновой терапии [Janssen и др., 1993], а IL-15 – в ходе восстановления пациентов после трансплантации гематopoэтических стволовых клеток [Vukicevic и др., 2010].

Значительное увеличение доли HLA-DR-позитивных NK-клеток оказывает комбинация IL-2 с облученными аутологичными PBMC [Delso-Vallejo и др., 2017]. Помимо этого, увеличение содержания NK-клеток HLA-DR⁺ в культуре было отмечено при лигировании иммуноглобулиноподобного рецептора CD7 моноклональными антителами [Rabinowich и др., 1994], а в субпопуляции адаптивных NK-клеток – при взаимодействии молекул адгезии CD2 (на NK-клетках) и CD58 (на фибробластах, зараженных HCMV) [Rölle и др., 2016]. Последние данные позволяют предположить, что индукция экспрессии HLA-DR происходит не только под действием растворимых цитокинов, но и является частью комплексного ответа на распознавание NK-клетками зараженных или по иным причинам измененных клеток.

Взаимодействие с дендритными клетками также способствует увеличению и/или приобретению экспрессии HLA-DR на NK-клетках [Benlahrech и др., 2009; Langers и др., 2014]. Причем, в одной из работ показано, что для этого необходимы именно межклеточные взаимодействия, а не растворимые факторы, производимые дендритными клетками [Benlahrech и др., 2009]. Сходные результаты продемонстрировала группа Nakayama с соавторами на клетках мыши, однако, в описанном ими случае появление MHC II на поверхности NK-клеток происходило независимо от появления MHC-II-транскриптов: NK-клетки, нокаутные по гену MHC II, все равно становились MHC-II-позитивными после контакта с дендритными клетками из селезенки или после адаптивного переноса в мышечной ткани дикого типа [Nakayama и др., 2011]. Авторы предположили, что причиной данного феномена может быть эффект трогоцитоза – «перетекания» части мембраны с одной клетки на другую в процессе контакта NK-клеток и дендритных клеток.

В большинстве описанных выше случаев увеличение экспрессии HLA-DR сопровождалось появлением и других признаков активации NK-клеток: увеличением экспрессии маркеров активации CD25, CD69 [Langers и др., 2014; Rabinowich и др., 1994; Rölle и др., 2016], молекул, участвующих в антиген-презентации CD86, B7-H3 [Delso-Vallejo и др., 2017; Loyon и др., 2016; Senju и др., 2018], повышением пролиферативной [Evans и др., 2011; Rabinowich и др., 1994] и цитотоксической активности NK-клеток [Benlahrech и др., 2009; Langers и др., 2014; Rabinowich и др., 1994] и продукции ими IFN γ [Langers и др., 2014; Loyon и др., 2016; Rölle и др., 2016].

1.2.4. Регуляция экспрессии HLA-DR на транскрипционном уровне

Регуляция экспрессии HLA-DR, как и всех молекул МНС II, осуществляется преимущественно на транскрипционном уровне с помощью особого комплекса цис-регуляторных элементов, формирующих энхансеому, а также не контактирующего напрямую с ДНК коактиватора, являющегося, по сути, главным регуляторным фактором экспрессии МНС II (class II transactivator, СИТА). Компоненты энхансеомы присутствуют примерно на одинаковом уровне во всех клетках организма, тогда как экспрессия СИТА зависит от типа клеток, присутствия стимулирующих/ингибирующих цитокинов в среде, стадии дифференцировки клетки и четко коррелирует с уровнем экспрессии МНС II [LeibundGut-Landmann и др., 2004]. Таким образом, экспрессия молекулы МНС II, и HLA-DR в частности, по большей части регулируется уровнем экспрессии ее основного транскрипционного фактора; экспрессия же самого СИТА зависит от функциональной активности одного из трех промоторов, активность которых зависит от типа клетки [Muhlethaler-Mottet и др., 1997]. В конститутивно экспрессирующих МНС II, а значит, и СИТА, клетках работают промоторы pI (макрофаги, индуцированные дендритные клетки) и pIII (В-клетки, плазмацитоидные дендритные клетки). В активированных Т-клетках

индукция экспрессии МНС II также осуществляется посредством активации промотора рIII [LeibundGut-Landmann и др., 2004]. Во множестве других клеточных типов для повышения экспрессии МНС II необходимо воздействовать на индуцируемый промотор рIV; индукция может быть осуществлена с помощью IFN γ по STAT1-зависимому пути [Muhlethaler-Mottet и др., 1998]. Другие цитокины, способные стимулировать экспрессию МНС II, практически не описаны, однако известно, что СИТА является одной из мишеней ERK1/2, транскрипционного фактора и терминальной киназы MAPK-киназного пути передачи сигнала [Voong и др., 2008]. В то же время, найдено множество веществ, способных, наоборот, снижать экспрессию, воздействуя на промоторы СИТА: TGF β , IFN α , IL-4, статины, NO, а также факторы, выделяемые *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamidia*, *Toxoplasma gondii*, *Cytomegalovirus* и другими патогенами [LeibundGut-Landmann и др., 2004].

Механизм активации экспрессии МНС II (или его подтипа HLA-DR) непосредственно в НК-клетках в литературе не описан. По аналогии можно предположить, что в этом процессе участвует или IFN γ -индуцируемый промотор рIV, или, из-за близости НК-клеток по происхождению и некоторым аспектам биологии с Т-клетками, промотор рIII транс-активатора СИТА.

1.2.5. Функциональная значимость HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции НК-клеток

Первоначально экспрессия HLA-DR расценивалась лишь как маркер активации НК-клеток в различных состояниях. Однако, среди клеток из субпопуляции CD56^{bright}, а также среди НК-клеток селезенки, лимфоузлов и других иммунокомпетентных органов (а возможно, и среди всех тканерезидентных НК-клеток) в норме всегда присутствует достаточно высокая доля HLA-DR-позитивных клеток [Burt и др., 2009; Mizrahi и др., 2007]. Возможно, в данном случае появление экспрессии HLA-DR связано с

этапами дифференцировки и созревания NK-клеток. Для NK-клеток периферической крови CD56^{dim} в норме также не все однозначно: у части индивидуумов доля HLA-DR-позитивных клеток в данной субпопуляции стремится к нулю, в то же время у других регистрируется на достаточно высоком уровне – до 21% от всех NK-клеток CD56^{dim} [Mizrahi и др., 2007]. Согласно работе Costa Garcia с соавторами, высокое содержание HLA-DR⁺ клеток в высокодифференцированной субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ может быть связано с ответом на инфекцию HCMV и, вероятно, с формированием пула «активированных» NK-клеток памяти [Costa-García и др., 2019]. При различных патологических состояниях, как было подробно описано выше, доля HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток *in vivo* может быть повышена как среди клеток CD56^{bright}, так и среди клеток CD56^{dim}. Таким образом, до сих пор неясно, в каких условиях та или иная субпопуляция NK-клеток становится «активированной», и связано ли в принципе появление HLA-DR в каждом конкретном случае с функциональной активацией или с другими процессами, происходящими в NK-клетках.

Тем не менее, если суммировать опубликованные данные, описывающие NK-клетки как *in vivo*, так и *in vitro*, то можно выделить следующие пункты, характеризующие HLA-DR-позитивные NK-клетки с функциональной стороны.

- 1) Ассоциация экспрессии HLA-DR с продукцией IFN γ , в том числе прямые корреляционные зависимости [Yano и др., 1996]. Следует отметить, что в данном случае причинно-следственную связь можно выстроить в обе стороны: как HLA-DR-позитивные («активированные») NK-клетки могут производить больше IFN γ [Loyon и др., 2016], так и продуцируемый NK-клетками IFN γ может стимулировать увеличение экспрессии HLA-DR в результате аутостимуляции, как это обсуждается в работе Yano с соавторами. Не исключено, что эти два процесса идут параллельно, поддерживая петлю положительной обратной связи.

2) Ассоциация экспрессии МНС II с пролиферативной активностью. МНС-II-позитивная субпопуляция NK-клеток как у людей, так и у мышей, размножается интенсивнее, чем МНС-II-негативная [Delso-Vallejo и др., 2017; Evans и др., 2011; Voynova, Skinner, Bolland, 2015].

3) Высокий уровень дегранулирующих в ответ на стимул клеток среди NK-клеток HLA-DR⁺ [Evans и др., 2011; Luo и др., 2017] за исключением клеток, инфильтрирующих опухоль (возможно влияние супрессивного микроокружения) [Carrega и др., 2008].

4) Ко-экспрессия одновременно с HLA-DR молекул, потенциально необходимых для антиген-презентации – HLA-DQ, CD80/86, B7-H3 [Delso-Vallejo и др., 2017; Loyon и др., 2016; Senju и др., 2018]

5) Способность к модуляции T-клеточного ответа [Loyon и др., 2016; Zingoni и др., 2004], а также к интернализации некоторых молекулярных комплексов (антигенов) и к последующей антиген-специфичной стимуляции активности T-клеток – потенциальной антиген-презентации [Costa-García и др., 2019; Roncarolo и др., 1991; Voynova, Skinner, Bolland, 2015] и кросс-презентации [Burt и др., 2009; Voynova, Skinner, Bolland, 2015].

Известно, что NK-клетки способны влиять на различные ветви T-клеточного иммунитета как посредством цитокинов, так и за счет межклеточных взаимодействий и даже прямого киллинга [Cook, Waggoner, Whitmire, 2014]. Работ, посвященных взаимодействию именно активированной субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁺ с T-клетками, не так много, однако, согласно одному из исследований, пред-активированные IL-2 и, вследствие этого, позитивные по HLA-DR NK-клетки способны значительно усиливать CD3-индуцированную пролиферацию CD4⁺ T-клеток и продукцию ими IFN γ [Zingoni и др., 2004]. Наблюдаемый эффект по крайней мере частично зависел от взаимодействия OX40 с OX40L, экспрессируемых на T- и NK-клетках, соответственно. Аналогичные результаты были получены при

стимуляции Т-клеток в присутствии активированных HLA-DR⁺ NK-клеток более «физиологичным» способом – посредством суперантигена SEB (*Staphylococcus aureus* Enterotoxin B), неспецифично, но с высокой аффинностью связывающего молекулы МНС II и TCR (T cell receptor, Т-клеточный рецептор), и вновь OX40-OX40L взаимодействия были важны для адекватной ко-стимуляции Т-клеток [Zingoni и др., 2004]. Сходные данные были опубликованы другой группой исследователей: в присутствии суперантигена SEB HLA-DR-позитивные NK-клетки стимулировали повышение экспрессии CD25 на Т-клетках [D’Orazio, Stein-Streilein, 1996].

Louon с соавторами предположили, что, поскольку NK-клетки HLA-DR⁺CD86⁺, полученные при стимуляции IL-2 и IL-21, высоко экспрессируют CD62L, то теоретически они могут попадать в лимфоузлы и взаимодействовать с наивными Т-клетками [Louon и др., 2016]. Они показали, что под действием HLA-DR-позитивных NK-клеток наивные CD4⁺ Т-клетки от того же донора начинают активно пролиферировать на уровне с контрольным образцом Th1-поляризации. При этом, CD4⁺ Т-клетки в присутствии NK-клеток HLA-DR⁺CD86⁺ приобретали фенотип CD45RA⁻CD62L⁺, характерный для центральных Т-клеток памяти, тогда как Т-клетки из контрольного образца Th1-поляризации были преимущественно CD45RA⁻CD62L⁻, что характерно для эффекторных клеток памяти. Однако, дальнейший анализ показал, что полученные под действием HLA-DR-позитивных NK-клеток Т-клетки CD45RA⁻CD62L⁺ скорее можно отнести к неполяризованным предшественникам клеток памяти, т.к. они не экспрессируют необходимые транскрипционные факторы, продуцируют только IL-2 и низкие дозы TNF α и не синтезируют IFN γ . Таким образом, полученные *in vitro* под действием цитокинов HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки способны стимулировать неспецифическую активацию и частичную дифференцировку CD4⁺ Т-клеток [Louon и др., 2016].

Наконец, имеется ряд публикаций, в которых демонстрируется способность HLA-DR-позитивных NK-клеток стимулировать антиген-специфическую активацию Т-клеток, то есть, осуществлять антиген-презентацию [Burt и др., 2009; Costa-García и др., 2019; Roncarolo и др., 1991; Voynova, Skinner, Bolland, 2015]. В наиболее ранней работе на эту тему Roncarolo с соавторами показали, что как свежевыделенные NK-клетки, так и стимулированные IL-2 и, что наиболее важно, клонированные *in vitro* NK-клеточные линии (клоны) способны вызывать пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, специфичных к столбнячному токсину. Перечисленные популяции NK-клеток презентировали данный антиген с разной эффективностью, которая зависела от интенсивности экспрессии HLA-DR на их поверхности и концентрации антигена в среде, но менее эффективно, чем профессиональные антиген-презентирующие клетки. При этом, презентация антигена зависела от аллеля HLA: только клоны NK-клеток, экспрессирующие определенный аллель HLA-DR, могли стимулировать пролиферацию специфичных к данному аллелю клонов Т-клеток. Также авторами были получены клоны NK-клеток, способные презентировать Т-клеткам Der pI, аллерген домашнего пылевого клеща, и выделенный из него пептид, и пептид из 65-кДа белка теплового шока *Mycobacterium leprae*, но не белок целиком [Roncarolo и др., 1991]. Поскольку в описываемой работе использовались клоны NK-клеток, длительно культивированные *in vitro* перед использованием в качестве АПК, вероятность того, что все описанные выше эффекты обусловлены загрязнением культур NK-клеток дендритными клетками и/или моноцитами, минимальна.

Относительно недавно группа Kim с соавторами продемонстрировала, что NK-клетки, обработанные УФ-инактивированным вирусом простого герпеса (herpes simplex virus, HSV1/2) или иммунодоминантными пептидами гликопротеина D из HSV2, конъюгированными с дипальмитоил-S-глицерилцистеином – агонистом TLR2 (Pam2Cys-gD2-30-5), увеличивали экспрессию HLA-DR и HLA-DQ, а затем индуцировали экспрессию CD69 на

аутологичных CD4⁺ Т-лимфоцитах при совместном культивировании [Kim и др., 2012]. Наблюдаемый эффект зависел как от межклеточного контакта, так и от продукции цитокинов. Более того, авторы наблюдали четкие иммунологические синапсы между НК-клетками, стимулированными Pam2Cys-gD2-30-5 или УФ-HSV1/2, и CD4⁺ Т-лимфоцитами, в которых участвовали молекулы CD4 и талина. Синапсы были зарегистрированы как *in vitro* в культуре, так и *ex vivo* в подкожном инфильтрате из рецидивирующих герпетических язв.

В 2019 году Costa-García с соавторами показали, что адаптивные НК-клетки NKG2C⁺HLA-DR⁺ способны стимулировать антиген-зависимую активацию атипичных эффекторных Т-клеток памяти CD28⁻CD4⁺ [Costa-García и др., 2019], ранее описанных в связи с инфекцией HCMV [Pachnio и др., 2016]. Активированные Т-клетки памяти были способны к дегрануляции и продукции Th1 цитокинов (IFN γ и TNF α). Аналогично работе Roncarolo и др., 1991, эффективность такой антиген-презентации была ниже, чем осуществляемая дендритными клетками того же донора. В то же время, данные НК-клетки не запускали одновременную HLA-I-опосредованную кросс-презентацию вирусных антигенов CD8⁺ Т-клеткам. По-видимому, НК-клетки NKG2C⁺HLA-DR⁺ могут захватывать, обрабатывать и представлять как вирусные частицы, так и комплексы HCMV-антитело, поскольку добавление хлорокина, ингибитора эндосомного и лизосомного закисления, снижало эффективность презентации. Авторы предполагают, что интернализация нативных вирусных частиц могла быть опосредована связыванием TLR2 с белками оболочки HCMV gB и gH, аналогично ситуации с HSV, описанной выше. При этом, захват иммунных комплексов вирус-антитело происходил через рецептор CD16, что подтверждалось снижением экспрессии CD16 и сопутствующим увеличением экспрессии HLA-DR в НК-клетках вскоре после добавления комплексов HCMV-антитело в среду для культивирования [Costa-García и др., 2019].

Возможность антиген-специфической активации Т-клеток НК-клетками была также продемонстрирована на мышах [Voynova, Skinner, Bolland, 2015]. Субпопуляция НК-клеток $NK1.1^+CD11c^+MHCII^+$, обнаруженная в различных мышинных моделях SLE, оказалась способна стимулировать пролиферацию специфических $CD4^+$ Т-клеток после предварительной инкубации с антигеном OVA, а также $CD8^+$ Т-клеток в присутствии обработанных OVA спленоцитов, не совпадающих по MHC I. Таким образом, НК-клетки $NK1.1^+CD11c^+MHCII^+$ участвовали как в классической, так и в кросс-презентации антигена [Voynova, Skinner, Bolland, 2015]. Возможность кросс-презентации циркулирующими в периферической крови HLA-DR-экспрессирующими НК-клетками также обсуждается в работе на клетках человека [Burt и др., 2009]. Прединкубированные со смесью пептидов CEF (Cytomegalovirus, Epstein-Barr, Influenza A, цитомегаловирус, Эпштейн-бар вирус и вирус гриппа А) НК-клетки $HLA-DR^+$ индуцировали продукцию $IFN\gamma$ в аутологичных $CD8^+$ Т-клетках при совместном культивировании.

Суммируя информацию о HLA-DR-экспрессирующих НК-клетках, проанализированных *ex vivo* и *in vitro*, можно предположить следующий «жизненный цикл» для этой субпопуляции. В нормальных условиях и при отсутствии вторичного обострения латентных инфекций (например, HCMV) в крови присутствует мало $HLA-DR^+$ НК-клеток, тогда как в иммунокомпетентных органах процент их содержания намного выше - возможно, из-за более частых взаимодействий с другими иммунными клетками и стимуляции фоновыми цитокинами [Burt и др., 2009; D'Orazio, Stein-Streilein, 1996; Evans и др., 2011; Mizrahi и др., 2007]. Во время инфекции или вспышки аутоиммунного заболевания большее количество НК-клеток активируется благодаря непосредственному распознаванию инфицированных клеток или целых патогенов и благодаря повышению уровня провоспалительных цитокинов, таким образом, доля HLA-DR-позитивных клеток

увеличивается как в периферической крови, так и в пораженном органе [Aranami, Miyake, Yamamura, 2006; Azeredo и др., 2006; Cruz-Gonzales и др., 2018; Rinaldi и др., 2006]. HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки, по видимому, участвуют в «первой линии» защиты и взаимодействуют с адаптивной иммунной системой: они продуцируют цитокины, усиливая воспаление, способны к быстрому цитотоксическому ответу, а также, вероятно, к переработке и презентации антигена [Costa-García и др., 2019; Evans и др., 2011; Luo и др., 2017; Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Yano и др., 1996]. Размножившаяся субпопуляция NK-клеток HLA-DR⁺ может персистировать в крови и органах в течение нескольких месяцев, пока стимул остается в организме [Costa-García и др., 2019; Rinaldi и др., 2006; Serti и др., 2015], но когда воспаление уходит, процент клеток, экспрессирующих HLA-DR, также снижается [Azeredo и др., 2006; Lichtfuss и др., 2012a; Luo и др., 2017; Serti и др., 2015].

Однако, до сих пор мало известно о связи экспрессии HLA-DR с дифференцировкой NK-клеток, о функциональных сходствах и различиях HLA-DR-позитивных клеток, выделенных *ex vivo* и полученных в результате стимуляции *in vitro*, о механизмах индукции экспрессии HLA-DR в NK-клетках и возможности презентации других антигенов, не описанных в литературе.

1.3. Роль NK-клеток в защите от туберкулеза

Наибольшую роль в защите от туберкулеза играет клеточный иммунный ответ, в основном по IL-12-Th1-IFN γ -зависимому пути с участием макрофагов [Young и др., 2008]. Однако в последнее время становится все более очевидным, что иммунный ответ организма против *M. tuberculosis* затрагивает гораздо больше компонентов иммунной системы, и что множество клеточных субпопуляций, кроме Th1, необходимы для полноценной защиты, в том числе NK-клетки (рис. 3). Они не только могут проявлять свою цитотоксическую

функцию по отношению к зараженным клеткам, но и являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, продуцируя цитокины и вступая во взаимодействия с другими иммунными клетками [Esin, Batoni, 2015].

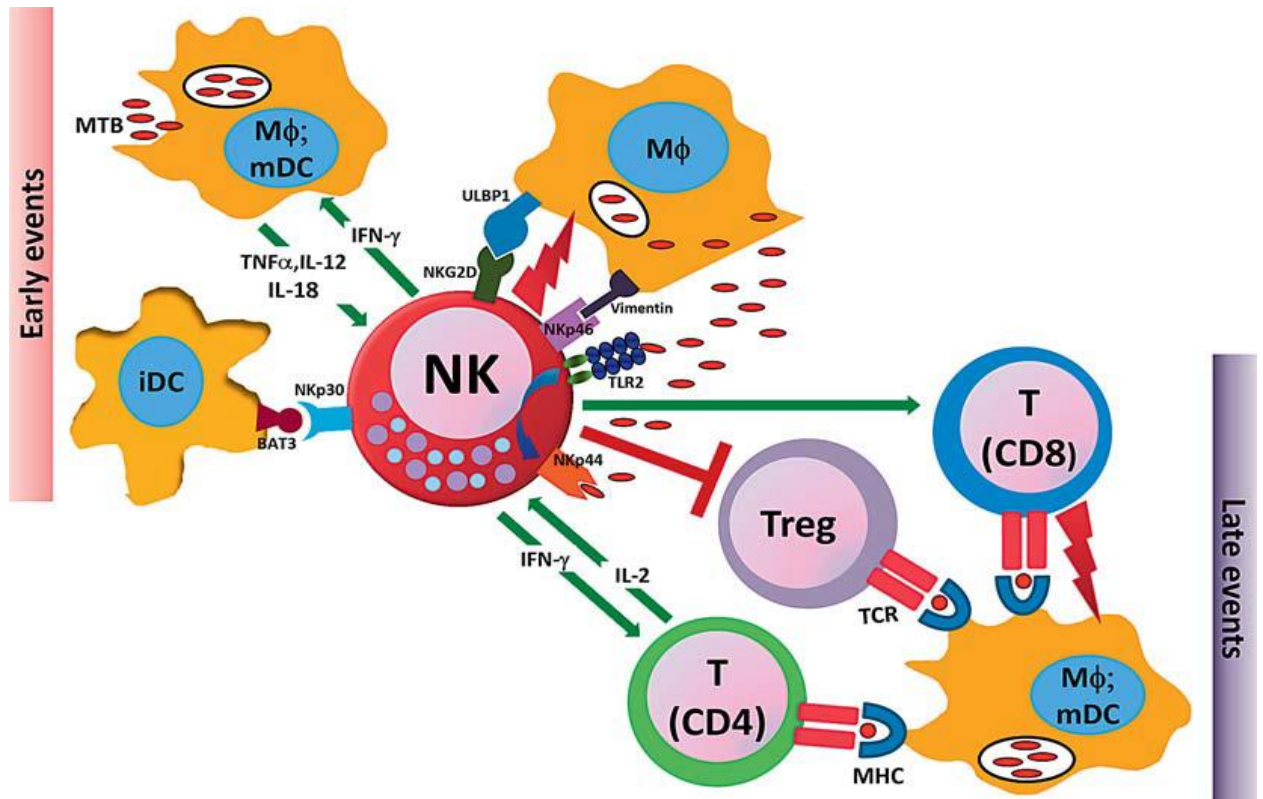


Рис. 3. Роль NK-клеток в иммунном ответе на *M. tuberculosis* [Esin, Batoni, 2015].

Показано, что NK-клетки, вместе с неканоническими Т-клетками, являются основными продуцентами $IFN\gamma$ и других провоспалительных цитокинов при первичной и повторной иммунизации BCG: клетки, выделенные из привитых доноров, отвечают повышением продукции цитокинов на ре-стимуляцию BCG, *M. tuberculosis* и другими патогенами *in vitro*, в отличие от клеток, полученных из непривитых индивидумов [Kleinnijenhuis и др., 2014; Suliman и др., 2016; Zufferey и др., 2013]. Подобные реактивные NK-клетки детектировались в крови иммунизированных людей вплоть до одного года после вакцинации, и возможно персистировали и дольше [Suliman и др., 2016]. В одной из работ было показано, что NK-клетки

вакцинированных детей также увеличивали экспрессию маркера активации CD69 в ответ на ре-стимуляцию *in vitro* лизатом *M. tuberculosis* или Pam3Cys – лигандом TLR2 [Smith и др., 2017]. Таким образом, в нескольких независимых исследованиях был показан BCG-индуцированный врожденный иммунный ответ с признаками иммунологической памяти – усиленной реакцией на повторную стимуляцию *in vitro*, основную роль в котором играли NK-клетки. В других работах NK-клетки, экспрессирующие маркеры адаптивной субпопуляции (CD45RO для человеческих клеток, CXCR6 для мышинных клеток), были выделены из легочной жидкости пациентов и из селезенки и печени мышей с активной туберкулезной инфекцией [Choreño-Parra и др., 2020; Fu и др., 2011; Fu и др., 2016]. CD45RO⁺ NK-клетки продуцировали IL-22 ответ на стимуляцию антигенами *M. tuberculosis* и BCG, а также увеличивали экспрессию IFN γ , гранзима B, CD69, CD25, NKG2D, IL-12R в ответ на стимуляцию IL-12, продуцируемым BCG-индуцированными моноцитами [Fu и др., 2011; Fu и др., 2016]. CXCR6⁺CD49a⁺ NK-клетки продуцировали IFN γ в ответ на экстракт клеточной стенки клинического штамма *M. tuberculosis* HN878 [Choreño-Parra и др., 2020]. С другой стороны, в мышинной модели не был зарегистрирован эффект иммунологической памяти при повторной стимуляции NK-клеток из селезенки предварительно иммунизированных мышей препаратом BCG: интенсивность продукции IFN γ была сравнима с клетками из неиммунизированных мышей [Kawahara, Hasegawa, Takaku, 2016].

Одним из важных аспектов является то, что NK-клетки способны узнавать микобактерии напрямую. В некоторых работах было показано, что NK-клетки здоровых доноров способны отвечать на стимуляцию BCG экспрессией маркеров активации, повышением цитотоксической активности и продукции цитокинов в отсутствие в системе моноцитов/макрофагов [Batoni и др., 2005; Esin и др., 2004], а также миграцией в очаги воспаления в легких *in vivo* [Fu и др., 2013]. Дальнейшие исследования показали, что, по всей

видимости, NK-клетки взаимодействуют с компонентами клеточной стенки бактерий через активирующие рецепторы NKp44 и TLR2 [Esin и др., 2013; Marsenago и др., 2011]. Однако чувствительность NK-клеток к присутствию микобактерий сильно варьирует у разных доноров [Evans и др., 2011; Marsenago и др., 2008], что, по некоторым данным, может коррелировать с гаплотипом по KIR-рецепторам [Portevin, Young, 2013].

NK-клетки способны узнавать моноциты, зараженные *in vitro* *M. tuberculosis*, *M. avium complex* или *M. bovis*, предположительно, через активирующие рецепторы NKp46 and NKG2D, и лизировать их [Esin, Batoni, 2015]. Сходные результаты были получены с альвеолярными макрофагами, выделенными из пациентов с туберкулезной инфекцией. Кроме того, показано, что NK-клетки способны сдерживать рост бактерий, паразитирующих внутри клеток [Guerra и др., 2012], и стимулировать моноциты/макрофаги к их перевариванию [Brill и др., 2001]. Этот процесс не зависел от продукции IFN γ , дегрануляции NK-клеток или Fas-FasL взаимодействий, однако требовал наличия прямого контакта между NK-клетками и инфицированными моноцитами/макрофагами, а также, вероятно, зависел от продукции натуральными киллерами определенных цитокинов, в том числе IL-22 [Dhiman и др., 2009].

Появляется все больше доказательств того, что NK-клетки могут позитивно и негативно влиять на активность различных субпопуляций Т-клеток при туберкулезе. Так, было показано *in vitro*, что после удаления NK-клеток из PBMC здоровых доноров пролиферация $\gamma\delta$ Т-клеток в ответ на низкомолекулярные антигены *M. tuberculosis* была сильно снижена [Zhang и др., 2006]. Вероятно, данное регуляторное воздействие осуществлялось посредством цитокинов, отличных от IFN γ , а также путем непосредственного контакта NK-клеток и $\gamma\delta$ Т-клеток через адгезионную молекулу CD54. Сходные результаты были получены после удаления NK-клеток из PBMC здоровых доноров, реагирующих на туберкулин: CD8⁺ Т-клетки гораздо хуже

лизировали зараженные *M. tuberculosis* моноциты, а также уменьшилось общее количество специфичных к *M. tuberculosis*, продуцирующих IFN γ CD8⁺ Т-клеток [Vankayalapati и др., 2003]. В этом случае регуляция осуществлялась через продукцию НК-клетками IFN γ , который, в свою очередь, запускал секрецию моноцитами IL-15 и IL-18, стимулирующих пролиферацию CD8⁺ Т-клеток.

Влияние НК-клеток распространяется и на Т-регуляторные клетки (T regulatory cells, Tregs). Tregs присутствуют в крови и в местах воспаления у пациентов, больных туберкулезом, и чем больше их в плевральной жидкости, тем хуже развивается локальный противотуберкулезный иммунный ответ [Esin, Batoni, 2014]. Было продемонстрировано, что человеческие НК-клетки способны лизировать Tregs, пролиферирующие *in vitro* в ответ на *M. tuberculosis*, но не свежесыведенные Tregs [Roy и др., 2008]. Процесс не зависел от продукции IFN γ ; НК-клетки распознавали Tregs по наличию на поверхности стресс-индуцированной молекулы ULBP1 при помощи активирующих рецепторов NKG2D и NKp46.

На настоящий момент очень мало работ посвящено взаимодействию на фоне туберкулезной инфекции НК-клеток с CD4⁺ Т-клетками, тогда как имеются данные о том, что эти популяции могут взаимодействовать в процессе иммунного ответа как посредством взаимной стимуляции цитокинами, так и напрямую через межклеточные контакты. Показано, что CD4⁺ Т-клетки способны стимулировать секрецию НК-клетками IFN γ в ответ на продуцируемый ими IL-2 в экспериментах по совместному культивированию [Fehniger и др., 2003], в ответ на стимуляцию вирусом гриппа А [He и др., 2004] или в ответ на зараженные *Plasmodium falciparum* эритроциты [Horowitz и др., 2010a]. С противоположной стороны, НК-клетки стимулируют активацию и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в эксперименте со смешанными культурами *in vitro* посредством межклеточного взаимодействия через молекулы OX40-OX40L и, возможно, B7-CD28 [Zingoni и др., 2004]. Кроме того, продукция

IFN γ NK-клетками может иметь важное значение для дифференцировки наивных CD4⁺ Т-клеток по Th1 пути [Junqueira-Kipnis и др., 2020; Martín-Fontecha и др., 2004; Scharon, Scott, 1993]. Особый интерес представляет изучение взаимодействия с Т-клетками субпопуляции активированных NK-клеток, экспрессирующих HLA-DR, поскольку они, потенциально, могут напрямую взаимодействовать с комплексом TCR-CD4 и обычно демонстрируют повышенную продукцию IFN γ [Evans и др., 2011; Yano и др., 1996]. Как было указано в разделе 1.7.5, большое количество HLA-DR⁺ NK-клеток обнаруживается в инфицированных легких больных туберкулезом [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005], а также эта популяция увеличивается в ответ на стимуляцию BCG *in vitro* [Evans и др., 2011]. На основании способности HLA-DR⁺ NK-клеток стимулировать специфический Т-клеточный ответ на определенные антигены (см. раздел 1.7.10), можно предположить, что они также могут участвовать в презентации микобактериальных антигенов CD4⁺ Т-клеткам.

Данная работа была посвящена исследованию реакции HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции NK-клеток на контакт с микобактериями туберкулеза как в изолированных культурах, так и в присутствии других клеток, их фенотипического и функционального ответа, резистентности к ингибирующему воздействию микобактерий, а также возможности индукции HLA-DR⁺ NK-клетками антиген-специфического ответа на *M. tuberculosis* при совместном культивировании с CD4⁺ Т-клетками.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Клеточные линии

В работе использовали линии клеток человеческой эритролейкемии K562 и В-клеточной лимфомы C1R, а также генетически модифицированный клон линии K562, экспрессирующий мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21), любезно предоставленный доктором Dean Lee (MD Anderson Cancer Center, США). Данный клон дополнительно экспрессирует на поверхности tCD19 (маркер для оценки эффективности трансдукции), CD64 (высокоаффинный Fc-рецептор), CD86 и CD137L (лиганды ко-стимулирующих рецепторов CD28 и CD137/4-1BB, соответственно), по сравнению с немодифицированными клетками линии K562.

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ) с добавлением 10% FCS (fetal calf serum, эмбриональная телячья сыворотка) (HyClone, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, РФ) и 100-кратного антибиотика Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma, США), содержащего после разведения 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 250 нг/мл амфотерицина В (далее – ростовая среда). Перед использованием в качестве фидерных клетки K562 обоих типов предварительно облучали (100 Грей), замораживали и хранили при температуре -150°C.

2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

Периферические мононуклеарные клетки крови выделяли из образцов крови, собранной в пробирки с ЭДТА (этилендиаминтетраацетат) у здоровых добровольцев, давших информированное согласие на участие в исследовании. В ряде экспериментов РВМС выделяли из образцов крови пациентов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», давших информированное согласие на участие в исследовании. В исследовании

участвовали пациенты с первично диагностированным туберкулезом, не проходившие анти-туберкулезную терапию.

Все манипуляции производили стерильно при комнатной температуре. Цельную кровь в разводили в два раза PBS (phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер), затем стерильным шприцом подслаивали раствор Ficoll-Paque плотностью 1.077 г/см³ (ПанЭко, Россия). Пробирки центрифугировали при 1500 g в течение 20 мин без тормоза. Полученную интерфазу (слой клеток между плазмой и раствором Ficoll-Paque) стерильным шприцом собирали в отдельную пробирку, разводили PBS до 50 мл и центрифугировали при 600 g в течение 15 мин. Полученный осадок клеток еще раз отмывали в PBS центрифугированием в течение 10 мин при 300 g, затем переводили в буфер для сепарации: PBS pH 7.2, 0,5% БСА (бычий сывороточный альбумин), 2mM ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Часть РВМС оставляли для определения основных субпопуляций лимфоцитов по экспрессии поверхностных маркеров методом проточной цитометрии. На втором этапе из РВМС получали НК-клетки, Т-клетки и дендритные клетки.

2.3. Выделение НК-клеток человека методом магнитной сепарации

НК-клетки выделяли из РВМС методом негативной селекции с помощью набора для магнитной сепарации (NK Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Германия) по методике производителя. Все операции производили в охлажденном буфере для сепарации. Клетки обрабатывали коктейлем биотинилированных антител, направленных ко всем основным клеточным популяциям в составе РВМС за исключением НК-клеток, инкубировали при 4°C. Далее в клеточную суспензию добавляли магнитные частицы, конъюгированные со стрептавидином, при 4°C. Затем клетки отмывали буфером для сепарации центрифугированием 10 мин при 300 g, ресуспендировали в буфере и пропускали суспензию через магнитную колонку. После элюции буфером для сепарации получали очищенные НК-

клетки в элюате. Чистоту полученных НК-клеток проверяли цитометрически на соответствие фенотипу CD3⁻/CD14⁻/CD20⁻/CD7⁺/CD56⁺.

2.4. Получение CD4⁺ Т-клеток человека

Для получения CD4⁺ Т-клеток, обогащенных клетками, специфичными к *M. tuberculosis*, свежевыделенные РВМС помещали в 24-луночный планшет в ростовой среде с добавлением разрушенных ультразвуком микобактерий – сониката, любезно предоставленного доктором И.В.Лядовой, заведующей лабораторией биотехнологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», в концентрации 5 мкг/мл. На третий день при смене среды добавляли рекомбинантный человеческий IL-2 (Hoffmann-La-Roche, Швейцария) в концентрации 20 ед./мл; далее среду с IL-2 меняли каждый третий день. На 11-й день клетки собирали и подвергали процедуре отрицательной магнитной сепарации с использованием специального набора MojoSort Human CD4 T cell isolation kit (Biolegend, США), аналогично пункту 2.3. Полученные в элюате клетки проверяли на соответствие фенотипу CD3⁺/CD56⁻/CD4⁺/CD8⁻.

Изолированные НК-клетки и Т-клетки далее культивировали в среде для лимфоцитов: среда NK MACS (Miltenyi Biotec, Германия) с добавлением 10% FCS (HyClone, США), 1% добавки NK MACS Supplement (Miltenyi Biotec, Германия) и 100-кратного антибиотика Antibiotic Antimycotic Solution (Sigma, США), содержащего после разведения 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 250 нг/мл амфотерицина В (далее – ростовая среда для лимфоцитов).

2.5. Получение дендритных клеток человека

Для получения дендритных клеток свежевыделенные РВМС помещали в 24-луночный планшет в ростовой среде с добавлением IL-4 (50 нг/мл) и GM-CSF (60 нг/мл) (Sci-store, Россия) и культивировали в течение 11 дней. На второй

день культивирования из лунок отбирали не прилипшие к пластику клетки. Среду с цитокинами меняли каждый третий день. Полученные клетки имели фенотип CD3⁻/CD56⁻/CD20⁻/CD14^{low}/CD11c⁺/HLA-DR^{hi}/CD86^{hi}.

2.6. Проточная цитометрия

Для анализа методом проточной цитометрии клетки предварительно подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию. Для этого клетки инкубировали 30 мин в темноте при 4°C в 30 мкл (в 96-луночном планшете) или в 100 мкл (в цитометрической пробирке) РВА (PBS, 0,05% БСА, 0,1% азида натрия) с антителами к интересующему маркеру, меченными флуорофором. Затем клетки 2 раза отмывали РВА центрифугированием 4 мин при 450 g, переводили в 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Beckton Dickinson, США) с помощью программы CellQuest, либо на проточном цитометре MACSQuant10 (Miltenyi Biotec, Германия) с помощью программного обеспечения производителя. В работе использовали антитела CD56-APC, CD56-PE, CD3-FITC, HLA-DR-FITC, HLA-DR-PE-Cy7 (Beckman Coulter, США), CD8-PE-Cy5, CD16-PE (BD Bioscience, США), CD57-PE, CD69-PE, CD107a-FITC, CD107a-PE-Cy5, NKG2D-PE (eBioscience, США), CD3-PE (Дакко, Дания), CD4-FITC, CD14-PE, CD25-FITC, CD19-PE, CD20-F (Сорбент, Россия), NKG2C-AF488, NKG2C-PE (R&D Systems, США), KIR-PE (Miltenyi Biotec, Германия), NKp30-PE, CD86-PE (Biolegend, США), HLA-DR-FITC, HLA-DR-PE, HLA-DR-Brilliant Violet 421, CD56-PE-Cy7, CD3-APC, NKp44-PE, NKp46-PE-Cy7 (Sony Biotechnology, США); супернатант гибридомы, содержащий антитела против CD7, любезно предоставленный доктором M. Lopez-Botet (Universitat Pompeu Fabra, Барселона, Испания).

Клетки пациентов, больных туберкулезом, перед измерением фиксировали с помощью 1%-го раствора параформальдегида (Carl Roth, Германия), в котором их выдерживали в течение 24 ч, после чего 2 раза отмывали PBS и производили измерения, как описано выше.

В эксперименте на определение различий в митохондриальной массе у HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных NK-клеток использовался флуоресцентный краситель Mitotracker Red FM (Thermo Fisher Scientific, США), который окрашивает активные митохондрии в живых клетках. При этом его накопление в митохондриях не зависит от величины их трансмембранного потенциала. Для этого клетки инкубировали в течение 30 мин при 37°C с добавлением антител CD56-PE-Cy7 и HLA-DR-FITC. Далее клетки дважды отмывали в PBS центрифугированием в течение 4 мин при 450 g, переносили в 200 мкл PBS и анализировали на проточном цитометре.

Полученные данные обрабатывали и представляли в программе Flowing Software (Perttu Terho, Финляндия) и FlowJo X 10.0.7r2 (Becton, Dickinson & Company, США).

2.7. Внутриклеточное окрашивание IFN γ и TNF α

Для внутриклеточного окрашивания IFN γ и TNF α к инкубирующимся клеткам за четыре и более часов до измерений добавляли брефелдин А (brefeldin A, BrA) (AppliChem, Германия) в концентрации 10 мкг/мл для ингибирования внутриклеточного транспорта из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи и предотвращения дальнейшей секреции цитокина во внеклеточное пространство. По окончании инкубации клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами к поверхностным маркерам, как описанно в пункте 2.6. После отмывки РВА клетки фиксировали и одновременно пермеабелизировали путем добавления 250 мкл раствора Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, США) и инкубации при 4°C в течение 15 мин. Затем клетки отмывали 2 раза в 250 мкл (96-луночный планшет) или в 1000 мкл (цитометрическая пробирка) раствора Perm/Wash (BD Biosciences, США) центрифугированием 4 мин при 450 g и ресуспендировали в 100 мкл буферного раствора Perm/Wash. В пробирки добавляли необходимое количество антител к IFN γ и TNF α (IFN γ -FITC, IFN γ -PE, TNF α -FITC, Miltenyi

Biotec, Германия) и инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 мин. После этого клетки 2 раза отмывали в буфере Perm/Wash центрифугированием 4 мин при 450 g и ресуспендировали в PBS для анализа на проточном цитометре.

2.8. Анализ пролиферативной активности

Пролиферацию NK-клеток оценивали с помощью флуоресцентного красителя CFSE. К свежеевыделенным NK-клеткам добавляли CFSE в концентрации 5 мкмоль/л (eBioscience, США), затем клетки отмывали и переносили в ростовую среду для лимфоцитов с необходимыми стимулами. NK-клетки, культивируемые в присутствии IL-2 (100 ед/мл) и колцемида (200 нг/мл) (Serva, Германия), использовали в качестве непролиферирующего отрицательного контроля. Долю клеток, снизивших либо утративших свечение CFSE, измеряли с помощью проточной цитометрии на 4 и 7 день.

2.9. Сортировка субпопуляций NK-клеток

Для подготовки к сортировке клетки подвергали окрашиванию флуоресцентномечеными антителами (пункт 2.6), однако все процедуры производили стерильно. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 200 мкл буфера для сепарации, затем инкубировали с антителами 30 мин в темноте при 4°C. В работе использовали антитела CD56-APC, CD3-RD1 (Beckman Coulter, США), HLA-DR-PE (Сорбент, Россия), CD56-PE (Dako, Нидерланды), HLA-DR-Brilliant Violet 421 (Sony Biotechnology, США). Далее клетки отмывали 2 раза буфером для сепарации (центрифугированием в течение 4 мин при 450 g), и в нем же ресуспендировали в объеме 250 мкл для последующего анализа и клеточной сортировки. Сортировку субпопуляций NK-клеток производили стерильно на клеточном сортировщике FACSVantage DiVa, оснащенном лазерами 405, 488 и 643 нм (Beckton Dickinson, США). Полученные данные обрабатывали и представляли в программе Flowing Software (Perttu Terho, Финляндия).

Типичные результаты сортировки НК-клеток представлены на рис. 4: свежевыделенных (рис. 4А) и предварительно стимулированных *in vitro* в течение 6 дней в присутствии IL-2+K562-mbIL21 (рис. 4В).

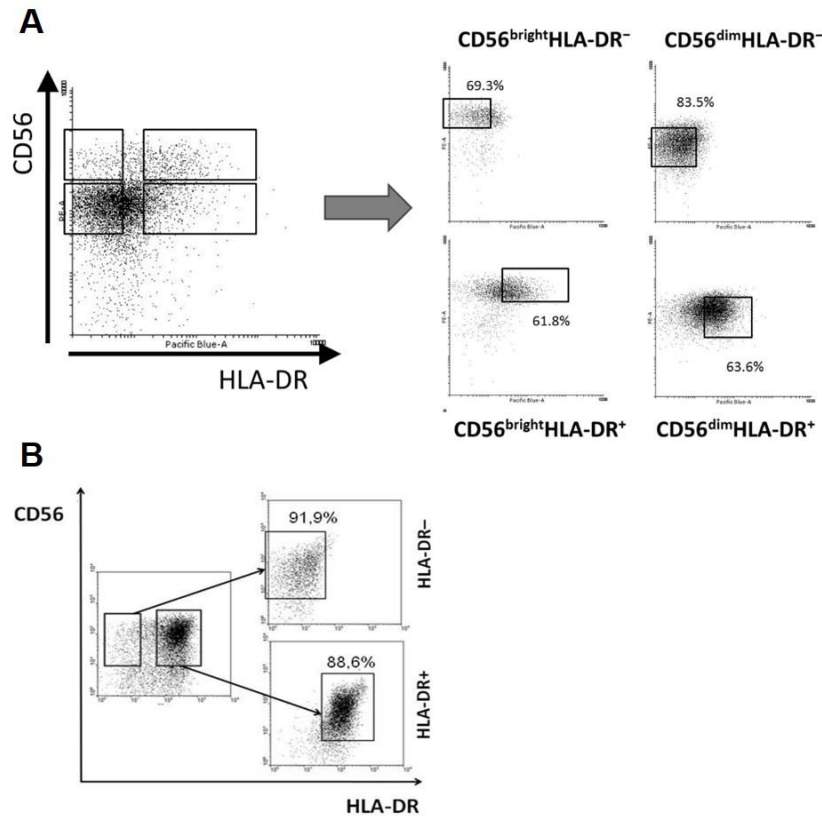


Рис. 4. Анализ фенотипа НК-клеток непосредственно после сортировки.

2.10. Получение клонов НК-клеток

НК-клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами (пункт 2.6), затем сортировали в 96-луночные круглодонные планшеты, по одной клетке на лунку в режиме сортировки одиночных клеток, в соответствии со следующими фенотипами: $CD3^-CD56^+$, $CD3^-CD56^+HLA-DR^+$, $CD3^-CD56^+HLA-DR^-$. Сортировку производили стерильно на клеточном сортировщике FACSVantage DiVa. Планшеты, подготовленные для сбора НК-клеток, содержали $2 \cdot 10^3$ фидерных клеток K562-mbIL21 на лунку в 200 мкл полной среды для клонов: смесь среды DMEM (ПанЭко, Россия) и ExVivo (Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 4:1, дополненная 10% FCS (HyClone, США), 2 ммоль/л L-глутамин (ПанЭко, Россия), антибиотическим-

антимикотическим раствором (Sigma-Aldrich, США) и 100 ед./мл IL-2. Планшеты с отсортированными НК-клетками инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 недель или более. Каждые 3 недели инкубации половину среды заменяли. Поверхностную экспрессию HLA-DR измеряли на 3 или 5 неделе методом проточной цитометрии.

2.11. Активация НК-клеток IL-2 и мембраносвязанным/растворимым IL-21

Свежевыделенные НК-клетки ресуспендировали в ростовой среде и переносили в планшет для культивирования в концентрации 0,5 млн/мл. Затем добавляли в разных экспериментах:

- 1) IL-2 в концентрации 100 ед./мл;
- 2) IL-21 (Biolegend, США) в концентрации 50 нг/мл;
- 3) фидерные клетки K562-mbIL21, в соотношении 4:5 с НК-клетками;
- 4) немодифицированные фидерные клетки K562 в соотношении 4:5 с НК-клетками;
- 5) IL-2 (100 ед./мл) + IL-21 (50 нг/мл);
- 6) IL-2 (100 ед./мл) + фидерные клетки K562-mbIL21 (в соотношении 4:5 с НК-клетками);
- 7) IL-2 (100 ед./мл) + немодифицированные фидерные клетки K562 (в соотношении 4:5 с НК-клетками);
- 8) IL-21 (50 нг/мл) + немодифицированные фидерные клетки K562 (в соотношении 4:5 с НК-клетками);
- 9) IL-2 (100 ед./мл) + IL-21 (50 нг/мл) + немодифицированные фидерные клетки K562 (в соотношении 4:5 с НК-клетками).

Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ 6 дней со сменой ростовой среды на третий день. По истечении 6 дней клетки подвергали

цитометрическому анализу или использовали в дальнейших экспериментах.

В экспериментах по анализу динамики поверхностных маркеров на НК-клетках HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ содержимое соответствующих лунок отбирали через 1, 3 и 6 дней. Клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами и измеряли экспрессию маркеров с помощью проточной цитометрии.

2.12. Культивирование НК-клеток с блокатором IL-21 – растворимым фрагментом рекомбинантного IL-21R

Свежевыделенные НК-клетки переводили в ростовую среду для лимфоцитов с IL-2 в концентрации 100 ед./мл и переносили в 96-луночный планшет для культивирования в концентрации 1 млн/мл. Далее в образцы разных групп добавляли:

- 1) ростовую среду для лимфоцитов (контроль только с IL-2);
- 2) растворимый фрагмент рецептора к IL-21 (rhIL-21R) (R&D systems, США) в концентрации 1, 5 или 15 мкг/мл;
- 3) IL-21 в концентрации 50 нг/мл;
- 4) IL-21 (50 нг/мл) + rhIL-21R в концентрации 1, 5 или 15 мкг/мл;
- 5) K562-mbIL21, в соотношении 4:5 с НК-клетками;
- 6) K562-mbIL21, в соотношении 4:5 с НК-клетками + rhIL-21R в концентрации 5 или 10 мкг/мл).

Клетки инкубировали при 37°C в течение 6 дней, со сменой среды на третий день и добавлением rhIL-21R в вышеописанных концентрациях. По истечении 6 дней клетки окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами и измеряли экспрессию маркеров с помощью проточной цитометрии.

2.13. Культивирование NK-клеток с блокатором IFN γ R – специфичным антителом к IFN γ R1

Свежевыделенные NK-клетки переводили в ростовую среду для лимфоцитов с IL-2 в концентрации 100 ед./мл и переносили в 96-луночный планшет для культивирования в концентрации 1 млн/мл. Затем в разные группы образцов добавляли:

- 1) ростовую среду для лимфоцитов (контроль только с IL-2);
- 2) антитела к рецептору IFN γ (anti-IFN γ R) (R&D Systems, США) в концентрации 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл;
- 3) IL-21 в концентрации 50 нг/мл;
- 4) IL-21 (50 нг/мл) + anti-IFN γ R в концентрации 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл;
- 5) K562-mbIL-1, в соотношении 4:5 с NK-клетками;
- 6) K562-mbIL21 (в соотношении 4:5 с NK-клетками) + anti-IFN γ R в концентрации 0,01, 0,1 или 1 мкг/мл.

Клетки инкубировали при 37°C в течение 6 дней, со сменой среды на третий день и добавлением антител anti-IFN γ R в указанных выше концентрациях. По истечении 6 дней клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами и измеряли экспрессию маркеров с помощью проточной цитометрии.

2.14. Культивирование NK-клеток с ингибиторами транскрипционных факторов семейства STAT и ERK1/2

Использовали следующие ингибиторы транскрипционных факторов: флударабина фосфат (Fludarabine Phosphate, Sigma Aldrich, США) – ингибитор STAT1, FR 180204 (Sigma Aldrich, США) – ингибитор ERK1/2, криптотаншинон (cryptotanshinone, Sigma Aldrich, США) – ингибитор STAT3.

Все вещества были разведены до необходимых концентраций в диметилсульфоксиде (ДМСО) (AppliChem, Германия).

Свежевыделенные НК-клетки переводили в ростовую среду для лимфоцитов и переносили в 96-луночный планшет для культивирования в концентрации 1 млн/мл. Затем разделяли образцы на две группы и добавляли:

- 1) IL-2 в концентрации 100 ед./мл (контрольные образцы);
- 2) IL-2 в концентрации 100 ед./мл и IL-21 в концентрации 50 нг/мл (экспериментальные образцы).

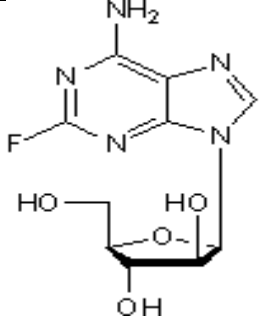
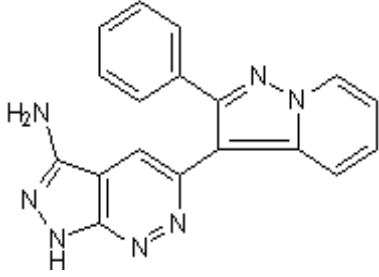
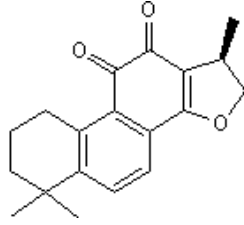
Клетки инкубировали при 37°C. На третий день ростовую среду для лимфоцитов обновляли с добавлением IL-2 (100 ед./мл) в первую группу образцов и IL-2 (100 ед./мл) + IL-21 (50 нг/мл) во вторую группу образцов. Далее в обе группы образцов добавляли:

- 1) ДМСО в концентрации 16,5 мкг/мл (контроль с растворителем);
- 2) флударабин в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг/мл;
- 3) FR 180204 в концентрации 0,5, 5 или 50 мкг/мл;
- 4) криптоганшинон в концентрации 0,1, 1 или 10 мкг/мл;

По истечении 36 ч после смены среды с добавлением ингибиторов клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами и измеряли экспрессию маркеров с помощью проточной цитометрии.

Ингибиторы транскрипционных факторов – низкомолекулярные вещества, молекулярные структуры которых представлены в таблице 4.

Таблица 4. Молекулярные структуры ингибиторов транскрипционных факторов

<p>Fludarabine (флударабин) – ингибитор STAT1</p>	
<p>FR 180204 – ингибитор ERK1/2</p>	
<p>Cryptotanshinone (криптотаншинон) – ингибитор STAT3</p>	

2.15. Активация НК-клеток IL-2 и/или соникатом *M. tuberculosis*

Суспензию разрушенных ультразвуком бактерий *M. tuberculosis* (соникат) предварительно подвергали ультразвуковой обработке в течение 20 мин для разрушения возможных агрегатов. Изолированные НК-клетки переносили в ростовой среде в 96-луночный планшет в концентрации 1,5 млн/мл, затем к ним добавляли для 24-часовой стимуляции:

- 1) ростовую среду для лимфоцитов (контроль);

- 2) соникат в концентрациях от 0,25 до 5 мкг/мл (для разных экспериментов);
- 3) IL-12 (BD Biosciences, США) + IL-15 (Sigma-Aldrich, США), по 20 нг/мл (24-часовая стимуляция), либо IL-2 в концентрации 100 ед./мл (7-дневная стимуляция);
- 4) соникат в концентрациях от 0,25 до 5 мкг/мл и IL-12+IL-15, по 20 нг/мл (24-часовая стимуляция), либо соникат и IL-2 в концентрации 100 ед./мл (7-дневная стимуляция).

Для 7-дневной стимуляции к НК-клеткам добавляли IL-2 (100 ед./мл) либо IL-2 (100 ед./мл) + соникат (2 мкг/мл). На 3-й день производили смену ростовой среды с добавлением IL-2 (100 ед./мл).

После 24-часовой инкубации клетки собирали и анализировали продукцию ими IFN γ методом внутриклеточного окрашивания, либо их цитотоксическую активность методом оценки дегрануляции. После семидневной инкубации клетки переносили в новый планшет и оставляли в ростовой среде на 24 ч (период покоя), затем рестимулировали для функциональных тестов (см. пункт 2.16).

В серии экспериментов НК-клетки вначале стимулировали IL-2 (100 ед./мл) + IL-21 (50 нг/мл) в течение 6 дней, затем после 24-часового периода покоя рестимулировали соникатом (2 мкг/мл), либо IL-12 (20 нг/мл) + IL-15 (20 нг/мл), либо соникатом и цитокинами одновременно для оценки функциональной активности.

2.16. Стимуляция НК-клеток для функциональных тестов

Для оценки функционального ответа после различных манипуляций НК-клетки переводили в новую ростовую среду для лимфоцитов, затем добавляли IL-2 (500 ед./мл), либо IL-12 (20 нг/мл) + IL-15 (20 нг/мл), либо клетки линии C1R + анти-CD20-антитело Rituximab (Roche, Швейцария).

Через 20 ч клетки собирали и подвергали функциональным тестам.

2.17. Анализ цитотоксической активности

Цитотоксическую активность НК-клеток оценивали с использованием следующих методик в зависимости от условий культивирования клеток:

2.17.1. Оценка цитотоксической активности клеток-эффекторов по их дегрануляции

Если предварительно НК-клетки инкубировали в среде без добавления фидерных клеток, то их цитотоксическую активность оценивали по наличию на поверхности молекулы CD107a. В норме данная молекула экспрессируется на внутренней поверхности цитотоксических гранул, но при дегрануляции мембрана везикулы сливается с клеточной мембраной, и молекула CD107a оказывается на поверхности НК-клетки. В качестве мишеней использовали клетки линии K562. К НК-клеткам добавляли антитела к CD107a (1 мкл на образец), BrA для ингибирования обратного захвата CD107a с клеточной мембраны (10 мкг/мл) и клетки-мишени K562, в соотношении 1:1 с НК-клетками. После этого клетки быстро осаждали центрифугированием 1,5 мин при 300 g и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. По истечении этого срока клетки отмывали, ресуспендировали в 100 мкл РВА и окрашивали необходимые поверхностные маркеры флуоресцентно-мечеными антителами (пункт 2.6). Измерение уровня экспрессии CD107a и поверхностных маркеров проводили с помощью проточной цитометрии.

2.17.2. Оценка цитотоксической активности по уровню активации каспазы-6 в клетках-мишенях.

В случае, если НК-клетки предварительно инкубировались в среде с добавлением фидерных клеток, то есть уже демонстрировали некоторую степень дегрануляции, их цитотоксичность анализировали по уровню

активации каспазы-6 в клетках-мишенях с помощью специального набора (OncoImmunin, США). В качестве мишеней также использовали клетки линии K562, которые предварительно метили прижизненным красителем TFL4 (длина волны возбуждения 657 нм). Для этого клетки в ростовой среде в концентрации 2 млн/мл инкубировали с 1 мкл красителя, предварительно разведенного в ДМСО, в течение 30 мин при 37°C с последующей двукратной отмывкой PBS центрифугированием в течение 6 мин при 300 g. Далее к предварительно стимулированным в 96-луночном планшете НК-клеткам добавляли клетки-мишени в соотношении 1:1 и доводили объем клеточной суспензии до 200 мкл ростовой средой. После этого клетки осаждали (350 g, 5 мин), сливали супернатант, добавляли во все лунки по 50 мкл субстрата, специфичного для каспазы-6, и ресуспендировали клетки. Данный субстрат ковалентно связан с двумя единицами флуорофоров, чья флуоресценция гасится за счет их стерической близости друг к другу. При расщеплении субстрата активированной каспазой молекулы флуорофоров расходятся, что приводит к резкому увеличению флуоресценции. Полученную смесь клеток быстро осаждали (300 g, 1 мин) и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C.

По окончании инкубации клетки отмывали в PBS центрифугированием в течение 5 мин при 350 g, затем ресуспендировали в 300 мкл PBS для последующего цитометрического анализа, в процессе которого оценивали долю клеток K562 с активированной каспазой-6.

2.18. Иммуноферментный анализ

Внеклеточную продукцию НК-клетками IFN γ оценивали с помощью иммуноферментного анализа, для чего использовали набор реагентов (Вектор Бест, Россия). В лунки 96-луночного планшета с иммобилизованными моноклональными антителами к IFN γ вносили исследуемые пробы среды, в которой инкубировались НК-клетки, разведенные в 10 раз. Инкубировали 120

мин при температуре 37°C. Затем содержимое лунок удаляли, лунки промывали 5 раз буфером из набора и вносили раствор биотинилированных антител к IFN γ . Инкубировали 60 мин при 37°C. Затем снова 5 раз отмывали и вносили раствор конъюгированной со стрептавидином пероксидазы хрена, инкубировали в течение 30 мин при 37°C. По окончании инкубации лунки снова 5 раз отмывали и вносили рабочий раствор тетраметилбензидина, инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 25 мин. После этого добавляли в каждую лунку стоп-реагент и тут же регистрировали оптическую плотность раствора в лунках на планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, США) в двух-волновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 620 нм. Концентрацию IFN γ определяли по предварительно построенному для данного набора калибровочному графику.

2.19. Определение содержания АТФ в НК-клетках

В отсортированных субпопуляциях НК-клеток (HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻) определяли продукцию АТФ с помощью биолюминесцентного анализа с применением коммерческого набора «Bioluminescent somatic cell assay kit» (Sigma-Aldrich, Germany) по методике производителя. Принцип метода показан на рис. 5.

Для анализа отбирали 10⁶ клеток на один образец, осаждали центрифугированием в течение 4 мин при 600g. Супернатант отбирали, добавляли 400 мкл лизирующего раствора (FL-SAR), перемешивали и инкубировали в течение 4 мин при комнатной температуре. Далее образцы замораживали и хранили при –20°C до проведения анализа.

Определение АТФ проводили при 4°C. Сначала измеряли хемилюминесценцию контрольного образца с известным количеством АТФ 5 x 10⁻⁹ моль на 10⁶ соматических клеток. Затем экспериментальный образец вынимали из морозильной камеры, нагревали до 4°C, добавляли 200 мкл реакционной смеси (FL-АММ), перемешивали и измеряли интенсивность

хемилюминесценции на люминометре (Triathler Multilabel tester 425-004, Hidex, Финляндия).

Содержание АТФ в исследуемом образце (в нмоль на 10^6 клеток) рассчитывали по пропорции с учетом интенсивности хемилюминесценции и содержания АТФ в контрольном образце.

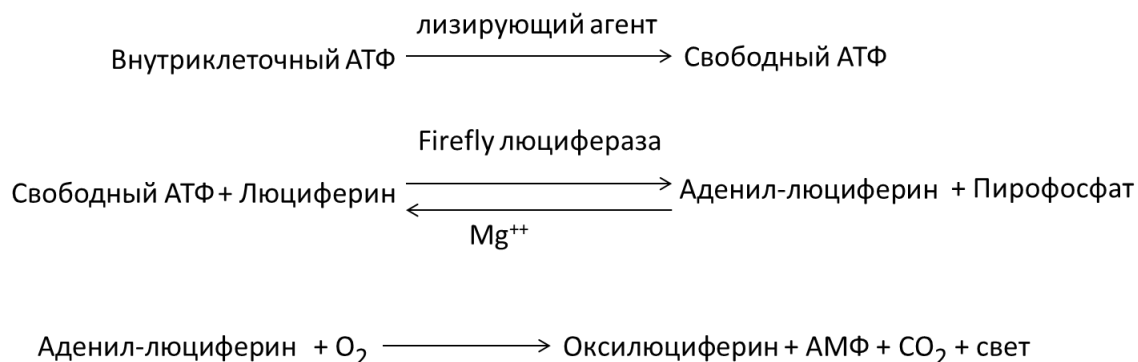


Рис. 5. Определение содержания АТФ в НК-клетках с помощью люциферин-люциферазного теста.

2.20. Выделение тотальной мРНК

Клетки лизировали с использованием коммерческого реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) из расчета 1 мл на 1 млн клеток, перемешивали и инкубировали в течение 10–15 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали в течение 10 мин при 15000g. Далее отбирали супернатант в новые, очищенные от ДНКаз и РНКаз пробирки и при необходимости замораживали при -60°C .

Из полученного супернатанта выделяли РНК по методике производителя. Для этого к супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа и инкубировали в течение 5 мин. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 12000g и 4°C . Собирали РНК-содержащую фракцию в новые пробирки и добавляли по 0,5 мл 100% изопропанола. После 10 мин инкубации проб при комнатной температуре их центрифугировали в течение 10 мин при 12000g. Супернатант отбирали, к осадку РНК добавляли 1 мл 75% этанола и

центрифугировали на максимальной скорости. Полученный супернатант снова отбирали, осадок высушивали на воздухе и растворяли в необходимом объеме очищенной воды. Концентрацию общей РНК в пробах (в мкг/мл) определяли, измеряя их оптическую плотность на спектрофотометре для малых объемов исследуемых образцов (BioDrop μ μ LITE+, Великобритания) при длине волны 260 нм и длине оптического пути 0,5 мм.

2.21. Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию для получения кДНК проводили в амплификаторе (Applied Biosystems, США) с использованием коммерческого набора, содержащего ревертазу MMLV (Евроген, Россия).

В пробирки добавляли:

- 1) РНК-матрицу (6 мкл/образец);
- 2) праймер 20 мкМ (1 мкл/образец);
- 3) стерильную чистую воду (3 мкл/образец);
- 4) мастер-микс для всех образцов (из набора ревертазы MMLV):
 - стерильная чистая вода (1 мкл/образец);
 - буфер (4 мкл/образец);
 - смесь dNTP (2 мкл/образец);
 - дитиотреитол (2 мкл/образец);
 - ревертаза MMLV (1 мкл/образец).

Для реакции использовали праймеры: oligo-dT к тотальной мРНК и специфический праймер к мРНК гена СІТА (5' GGTGTCTGTGTCTGGGTTCTG 3') (Евроген, Россия).

Смеси с РНК-матрицей прогревали в течение 2 мин при 70°C в термостате для расплавления вторичных структур и переносили образцы в лед.

Затем добавляли по 10 мкл мастер-микса в каждый образец (общий объем реакционной среды 20 мкл).

Образцы помещали в амплификатор на 60 мин при 40°C, затем на 10 мин при 70°C для остановки реакции. Концентрацию полученной кДНК в образцах (в мкг/мл) определяли с помощью спектрофотометра.

2.22. Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием мастер-микса полимеразы Maxima hot start (Евроген, Россия), с прямыми и обратными праймерами (Евроген, Россия) к β -актину (положительный контроль), α -субъединице HLA-DR и изоформам СИТА, различающимися по строению экзона 1 и нетранслируемой области перед ним. Последовательности используемых праймеров представлены в таблице 5.

Таблица 5. Последовательности праймеров и температура их отжига

Обратный праймер к β -актину	5'CATACTCCTGCTTGCTGATCC3'	Температура отжига 59°C
Прямой праймер к β -актину	5'ACTCTTCCAGCCTTCCCTCC3'	
Обратный праймер к HLA-DR	5' GATGCCCAACCAGACCCACAG 3'	Температура отжига 67°C
Прямой праймер к HLA-DR	5' ATCATGACAAAGCGCTCCAАСТАТ 3'	
Обратный праймер к СИТА	5' GGTGTCTGTGTCGGGTTCTG 3'	Температура отжига 63°C
Прямой праймер к изоформе 1 СИТА	5' CCCTCTTGGACAACCTGCTGAA 3'	
Прямой праймер к изоформе 3 СИТА	5' AGTGATGAGGCTAGTGATGAGG 3'	
Прямой праймер к изоформе 4 СИТА	5' CAGAGCTGGCGTGAGTGAGA 3'	

В пробирки добавляли:

- 1) ДНК-матрицу 1,1 мкг (1 мкл/образец);
- 2) праймер прямой 10 мкМ (1 мкл/образец);
- 3) праймер обратный 10 мкМ (1 мкл/образец);
- 4) стерильную чистую воду (7 мкл/образец);
- 5) мастер-микс для всех образцов (10 мкл/образец).

ПЦР проводили в амплификаторе в объеме 20 мкл со следующими параметрами:

1 стадия: активация полимеразы, 95°C 4 мин;

2 стадия: 30 циклов;

2.1. денатурация, 95°C 30 с;

2.2. отжиг праймеров 30 с, для образцов с различными праймерами – разные температуры (см. табл. 3.)

2.3. элонгация, 72°C 40 с;

3 стадия: остановка реакции, 72°C 7–10 мин.

2.23. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Результаты ПЦР визуализировали на методом электрофореза. Для проведения электрофореза использовали 1% агарозный гель: растворяли необходимое количество агарозы LE (Lonza, Швейцария) в однократном буфере TBE (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. По окончании электрофореза ДНК визуализировали при длине волны 254 нм с использованием прибора для автоматизированной визуализации геля (BioRad, США).

2.24. РНК-секвенирование

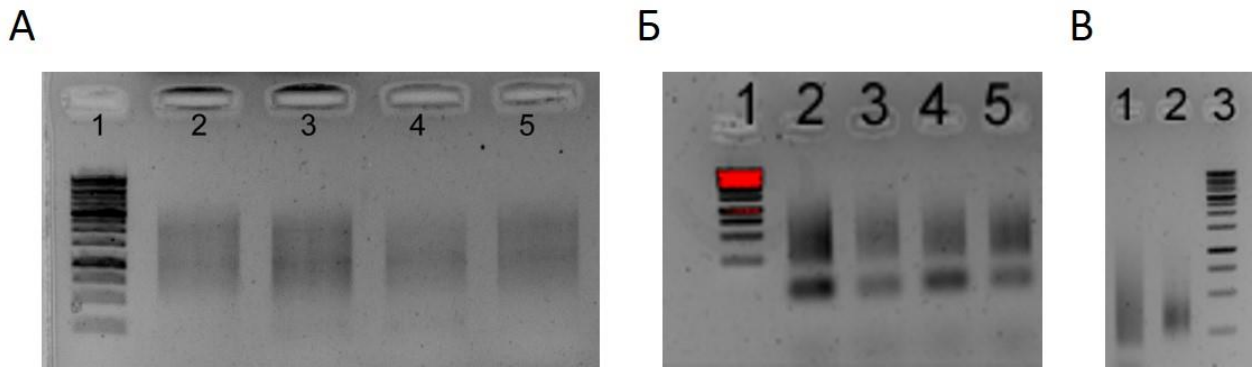
Субпопуляции HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ NK-клеток для РНК-секвенирования получали из свежеевыделенных клеток с помощью клеточного сортировщика FACSVantage DiVa (Beckton Dickinson). Для подготовки к сортировке клетки окрашивали флуоресцентномечеными антителами к CD56, CD3, HLA-DR, CD57, NKG2C.

Тотальную РНК из полученных субпопуляций выделяли с помощью набора RNeasy® MinElute® Cleanup Kit (Qiagen, США), согласно методике производителя. Элюцию РНК с колонки проводили в 12 мкл воды. Синтез кДНК с последующей амплификацией (ПЦР, 13 циклов) производили с помощью набора SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing согласно протоколу производителя (Takara Bio, США). Полученную библиотеку ре-амплифицировали в 25 мкл с праймером AAGCAGTGGTATCAACGCA, с использованием Q5 полимеразы (NEB, США), согласно протоколу, в течение 15-18 циклов со следующими параметрами:

1. денатурация, 98°C 10 с;
2. отжиг праймеров 58°C 15 с;
3. элонгация, 72°C 3 мин.

Результаты амплификации представлены на рис. 6А.

Полученные кДНК (комплементарная цепь ДНК) библиотеки очищали с использованием магнитных шариков Ampure XP (Beckman Coulter, США) согласно протоколу производителя, соотношение объема ПЦР смеси к магнитным частицам составляло 1:0,8. Далее измеряли концентрацию полученных после очистки библиотек с использованием Qubit dsDNA HS Assay kit (ThermoFisher, США). Тагментацию (необходима для уменьшения размера библиотеки и введения адаптерных последовательностей) и введение



индексов производили с помощью набора NexteraXT DNA Library Prep (Illumina, США) согласно протоколу, результаты визуализировали с помощью гель-электрофореза (рис. 6Б).

Рис. 6. (А) Электрофорез *кДНК* библиотек после обратной транскрипции и амплификации. 1 – дорожка маркер 1 *kB* Ladder (Евроген, Россия), 2-5 – *кДНК* библиотеки. (Б) Электрофорез тагментированных и амплифицированных *кДНК* библиотек. 1 – дорожка маркер 1 *kB* Ladder (Евроген, Россия), 2-5 – *кДНК* библиотеки. (В) Электрофорез очищенных с помощью приведенного протокола тагментированных и смешанных библиотек. 3 – дорожка маркер 1 *kB* Ladder (Евроген, Россия), 1 – смешанные *кДНК* библиотеки до очистки, 2 – *кДНК* библиотеки после двуступенчатой очистки с помощью *Ampure beads*.

Полученные библиотеки смешивали эквимолярно для проведения секвенирования нового поколения и очищали с использованием реагента *Ampure XP* (Beckman Coulter, США) согласно протоколу: в пробирку к тагментированным библиотекам добавляли 0,54 объема частиц *Ampure beads*, отбирали раствор с несвязавшейся с шариками ДНК, в этот раствор добавляли 0,24 объема (от исходного) частиц *Ampure beads*, дальнейшие манипуляции проводили с магнитными частицами, связавшими оставшуюся в растворе ДНК. Результаты очистки представлены на рис. 6В. Такой способ очистки позволяет обогатить библиотеку фрагментами ДНК в пределах 250-400 п.о., что является оптимальным размером для эффективного секвенирования с использованием платформы Illumina MiSeq и HiSeq.

Двуконцевое секвенирование фрагментов библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq и HiSeq4000 (Illumina, США) согласно протоколам производителей.

Для анализа профилей экспрессии белок-кодирующих генов результаты секвенирования были подвергнуты стандартным процедурам оценки качества набора прочтений (ридов), фильтрации и нормализации. Для обработки данных использовался ряд программных пакетов, таких как: bowtie2 для картирования полученных нуклеотидных чтений на референсный геном (сборка GRCh38/hg38); а также ряд пакетов для языка программирования R: easyRNAseq, DESeq, edgeR, необходимых для пересечения геномных координат с картированными ридами, определения статистической достоверности в разнице экспрессии для каждого гена и так далее. Представленность определенных функциональных категорий среди дифференциально экспрессирующихся генов была определена с помощью пакета программ GOseq.

2.25. Ко-культивация CD4⁺ Т-клеток с НК-клетками и дендритными клетками

Для проверки гипотезы о возможной антиген-презентации предварительно активированные в течение 10 дней с помощью IL-2 (100 ед./мл) + IL-21 (50 нг/мл) + IL-18 (50 нг/мл) (R&D systems, США) НК-клетки и полученные из РВМС дендритные клетки переводили в новую ростовую среду и инкубировали 24 ч в присутствии сониката микобактерий в концентрации 2 мкг/мл. Затем НК-клетки и DC отмывали от сониката и добавляли к CD4⁺ Т-клеткам в соотношении T:НК = T:DC = 2:1 в ростовой среде для лимфоцитов. Также в среду добавляли брэфелдин А (10 мкг/мл) и блокатор Fc-рецепторов (5 мкл на каждые 10 млн клеток) (Miltenyi Biotec, Германия), в часть образцов – ингибирующее антитело к HLA-DR (Sony Biotechnology, США). После 20 ч инкубации производили окрашивание

поверхностных маркеров и внутриклеточное окрашивание IFN γ и TNF α флуоресцентномечеными антителами, и анализировали клетки с помощью проточной цитометрии.

2.26. Статистический анализ

Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики и представлены в форме средней величины и стандартной ошибки среднего либо стандартного отклонения ($M \pm m$). Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями с нормальным распределением проводили с помощью парного либо непарного t -критерия Стьюдента. Для данных с ненормальным распределением использовали U-тест Манна-Уитни. Для данных, различающихся по двум параметрам, использовали тест ANOVA с множественным сравнением. Значения $p < 0,05$ считали достоверными.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Экспрессия HLA-DR *in vivo* на NK-клетках различной степени дифференцировки

У всех обследованных добровольцев (30 человек) количество NK-клеток составляло от 7 до 25% от всех мононуклеарных клеток периферической крови, в соответствии с литературными данными [Abel и др., 2018; Freud и др., 2017]. Доля HLA-DR-позитивных NK-клеток в общей популяции NK-клеток составляла $6,0 \pm 4,6\%$. Следует отметить, что уровень экспрессии HLA-DR на поверхности неактивированных NK-клеток был довольно низким по сравнению с моноцитами или В-клетками, что влияло на точность расчета доли клеток HLA-DR⁺. После магнитной сепарации чистота фракции NK-клеток CD56⁺ достигала 95–99%. Изолированные клетки содержали следовые количества клеток CD3⁺, CD14⁺ или CD20⁺ (менее 0,5% для каждого типа), а примесь клеток CD56⁺CD7⁻ обычно составляла не более 0,7% (рис. 7А), что соответствует высокой чистоте популяции NK-клеток. Доля клеток CD56^{neg} в различных образцах находилась в пределах 0,2–5% (рис. 7А).

На первом этапе была проанализирована взаимосвязь между уровнем поверхностной экспрессии HLA-DR в NK-клетках периферической крови и стадиями дифференцировки NK-клеток, которые были определены в соответствии с экспрессией маркеров CD56 и CD57 (рис. 7Б). Общепринято, что NK-клетки CD56^{bright} являются менее дифференцированными по сравнению с клетками CD56^{dim} [Chan и др., 2013; Romagnani и др., 2007]. Антиген CD57 представлен на зрелых NK-клетках и является маркером конечной стадии их дифференцировки [Björkström и др., 2010]. Поверхностная экспрессия HLA-DR была проанализирована в следующих субпопуляциях: CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻, CD56^{dim}CD57⁺ (рис. 7В-Д).

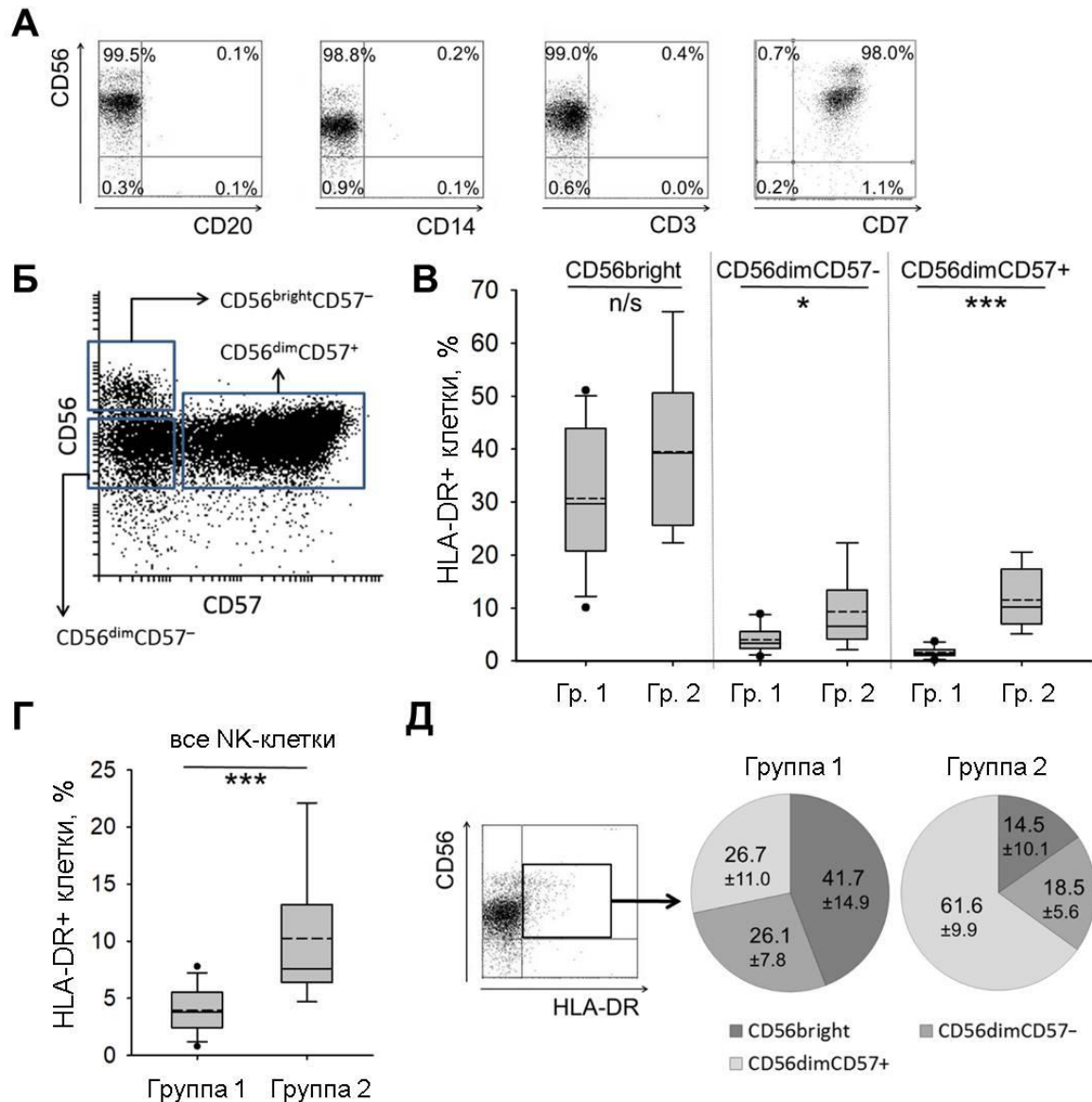


Рис. 7. Анализ экспрессии HLA-DR в свежеевыделенных NK-клетках. (А) Фенотип NK-клеток, измеренный непосредственно после магнитной сепарации. (Б) Субпопуляции NK-клеток на разных стадиях дифференцировки, выбранные для анализа экспрессии HLA-DR. (А, Б) Представлены результаты репрезентативного окрашивания, полученные на клетках одного донора из 21. (В, Г) Диаграммы, иллюстрирующие долю HLA-DR-положительных NK-клеток в субпопуляциях CD56^{bright}, CD56^{dim}CD57⁻ и CD56^{dim}CD57⁺ (В) и в целой популяции NK-клеток (Г) у доноров из групп 1 и 2. Группа 1: доля клеток HLA-DR⁺ в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ составляет менее 5%, 12 человек; группа 2: доля клеток HLA-DR⁺ в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ более 5%, 9 человек. Усы отображают 5-ю и 95-ю процентиля, сплошная линия - медиана, пунктирная линия - среднее значение, черные точки - выбросы. Gr. 1 и Gr. 2 – группы 1 и 2, соответственно. (Д) Доли NK-клеток на разных стадиях дифференцировки в HLA-DR-позитивной фракции у доноров из групп 1 и 2. Показано среднее значение ± SD для 12 и 9 обследованных доноров, соответственно.

Доля HLA-DR-позитивных клеток была значительно выше среди NK-клеток CD56^{bright}, чем CD56^{dim}, у всех обследованных добровольцев (рис. 7В, таблица 6). Однако у некоторых доноров наблюдалась относительно высокая доля HLA-DR-позитивных NK-клеток и интенсивность экспрессии HLA-DR еще и в субпопуляциях CD56^{dim}CD57⁺ и CD56^{dim}CD57⁻ (группа 2), по сравнению с донорами из группы 1 (рис. 7В, таблица 6). У доноров из группы 2 в целом наблюдался повышенный уровень общего количества HLA-DR-позитивных NK-клеток в периферической крови (рис. 7Г) и увеличенная интенсивность экспрессии HLA-DR на каждой отдельной клетке (MFI) во всех субпопуляциях, и в особенности в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ (таблица 6). Также в группе 2 наблюдалось иное, по сравнению с группой 1, распределение NK-клеток HLA-DR⁺ по стадиям дифференцировки. В частности, большую часть HLA-DR-позитивной субпопуляции составляли терминально дифференцированные NK-клетки CD56^{dim}CD57⁺, из-за чего в этой фракции была снижена доля клеток CD56^{bright} (рис. 7Д, группа 2). У доноров из группы 1 HLA-DR-позитивные NK-клетки в основном состояли из менее дифференцированных клеток с фенотипом CD56^{bright} (рис. 7Д, группа 1).

Полученные данные о том, что в периферической крови в субпопуляции менее дифференцированных NK-клеток CD56^{bright} доля HLA-DR-экспрессирующих клеток выше, чем в субпопуляции CD56^{dim}, согласуются с уже опубликованными исследованиями, рассматривавшими как здоровых доноров, так для пациентов с HIV [Costa-García и др., 2019; Lichtfuss и др., 2012b; Luo и др., 2017; Mizrahi и др., 2007]. Повышенная экспрессия HLA-DR на менее зрелых NK-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 кровотоки. Согласно опубликованным данным, среди

тканерезидентных NK-клеток, большую часть из которых составляют клетки CD56^{bright} [Michel и др., 2016], доля клеток HLA-DR⁺ может достигать 50% [Burt и др., 2009; Mizrahi и др., 2007].

Увеличение у части добровольцев доли HLA-DR-позитивных клеток в более дифференцированных NK-клетках CD56^{dim}, в том числе в терминально дифференцированной субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺, может быть связано с иммунным ответом на один из широко распространенных латентных вирусов – HCMV. В одной из публикаций показано, что у инфицированных HCMV индивидов часто происходит экспансия субпопуляции NK-клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺, и значительная часть этих клеток экспрессирует HLA-DR [Costa-García и др., 2019]. Действительно, у 8 из 9 обследованных нами доноров из группы 2 в крови были обнаружены антитела к HCMV, и у 6 из 9 – относительно высокое содержание NKG2C-позитивных NK-клеток – более 10% (в группе 1 – у 8 из 12 и у 1 из 12, соответственно) (таблица 6). Интересно, что у двоих доноров, распределенных в группу 2 по уровню HLA-DR⁺ NK-клеток в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺, доля NKG2C-позитивных NK-клеток сравнительно низкая (таблица 6): у донора 5 это скорее всего связано с отсутствием признаков иммунного ответа на HCMV (титр антител ниже порога определения), у донора 9 – по-видимому, с делецией гена NKG2C, так как экспрессия данного маркера не детектируется вовсе. В первом случае экспансия CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁺ NK-клеток в периферической крови может быть результатом иммунного ответа на другой патоген, во втором – может иметь место NKG2C-независимый ответ NK-клеток на цитомегаловирус, наблюдаемый у индивидумов с делецией [Chiesa Della и др., 2014; Liu и др., 2016]. Таким образом, для более зрелых NK-клеток CD56^{dim} появление экспрессии HLA-DR может входить в комплекс реакций при распознавании измененных клеток, в том числе зараженных HCMV.

Таблица 6. Поверхностная экспрессия HLA-DR в субпопуляциях NK-клеток периферической крови. В группу 1 входят лица, у которых доля HLA-DR-позитивных NK-клеток в субпопуляции CD56^{dim}CD57⁺ составила менее 5%, в группе 2 – более 5%. Представлены средние значения ± стандартное отклонение. Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни. Различия с P < 0,05 считались достоверными. Уровень экспрессии HLA-DR (нормализованная MFI – средняя интенсивность флуоресценции) рассчитывался как (эксп/контроль - 1)*100, где эксп - среднее значение интенсивности флуоресценции экспериментального образца, контроль - среднее значение аутофлуоресценции. Н/о – не определялось.

	Донор #	Доля NKG2C ⁺ среди всех NK-клеток донора, % /серостатус CMV	HLA-DR во всех NK-клетках		HLA-DR в CD56 ^{bright}		HLA-DR в CD56 ^{dim} CD57 ⁻		HLA-DR в CD56 ^{dim} CD57 ⁺	
			Позитивные клетки, %	MFI	Позитивные клетки, %	MFI	Позитивные клетки, %	MFI	Позитивные клетки, %	MFI
Группа 1	1	Н/о / -	5.3	116.3	51.1	481.5	2.7	22.3	1.5	52.4
	2	8,8 / +	3.7	41.8	35.0	408.6	4.1	33.8	2.3	0.4
	3	2,7 / -	2.4	20.0	46.9	422.5	2.3	7.5	1.3	-5.0
	4	5,1 / +	5.9	44.0	47.5	476.0	3.7	36.0	1.8	0.0
	5	49,4 / +	7.8	100.0	31.9	358.6	8.5	158.6	1.8	10.3
	6	Н/о / +	2.6	25.0	26.3	382.1	3.8	21.4	1.0	0.0
	7	3,2 / +	3.9	38.5	21.9	234.6	2.5	53.8	0.4	26.9
	8	Н/о / +	4.6	100.0	27.5	577.8	6.0	137.0	3.3	63.0
	9	5,7 / -	2.5	73.1	17.1	392.3	1.7	57.7	1.2	38.5
	10	6,9 / -	2.1	62.1	20.4	334.5	2.9	75.9	1.0	41.4
	11	3,3 / +	0.8	7.4	10.1	163.0	0.9	14.8	0.2	-3.7
	12	Н/о / +	5.6	50.0	32.6	253.1	8.9	146.9	3.7	0.0
	Среднее±СО		3.9±2.0	56.5±35.7	30.7±12.8	373.7±115.9	4.0±2.5	63.8±54.2	1.6±1.1	18.7±24.5
Группа 2	1	13,9 / +	6.2	71.1	22.3	344.7	3.3	42.1	7.4	65.8
	2	Н/о / +	12.4	81.8	39.3	500.0	5.5	42.4	20.6	97.0
	3	41,4 / +	4.7	87.1	24.7	474.2	2.1	93.5	5.1	241.9
	4	11,4 / +	11.5	67.7	34.2	522.6	6.5	80.6	15.0	177.4
	5	2,6 / -	14.0	111.4	66.0	705.7	12.9	105.7	11.7	80.0
	6	19,6 / +	7.6	89.2	45.9	851.4	4.9	70.3	7.0	73.0
	7	13,4 / +	22.1	277.4	55.3	693.5	22.3	316.1	19.7	222.6
	8	27,0 / +	6.9	100.0	40.9	482.9	12.1	234.3	7.0	60.0
	9	0,1 / +	6.6	217.2	26.5	551.7	13.9	379.3	10.2	179.3
	Среднее±СО		10.2±5.5	122.5±73.5	39.5±14.6	569.6±153.2	9.3±6.5	151.6±125.9	11.5±5.8	133.0±72.1
	Достоверность различий между группами		Достоверно, P = <0.001	Достоверно, P = 0.043	Не достоверно	Достоверно, P = 0.006	Достоверно, P = 0.014	Достоверно, P = 0.043	Достоверно, P = <0.001	Достоверно, P = <0.001

3.2. Экспрессия HLA-DR на NK-клетках NKG2C⁺

Нами была проанализирована доля HLA-DR-позитивных клеток и уровень экспрессии HLA-DR *ex vivo* в субпопуляциях NK-клеток, экспрессирующих рецептор NKG2C, но находящихся на разных стадиях дифференцировки. В частности, была проанализирована субпопуляция терминально дифференцированных NK-клеток CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺, считающаяся адаптивной, то есть проявляющая признаки клеток памяти: повышенный пролиферативный и функциональный ответ при повторной встрече с патогеном [Cerwenka, Lanier, 2016]. Как уже упоминалось выше, экспансию NKG2C-экспрессирующих NK-клеток связывают с реакцией организма на инфицирование цитомегаловирусом [Guma и др., 2004; Lopez-Vergès и др., 2011; Muntasell и др., 2013]. В данной работе установлено, что в субпопуляциях NK-клеток CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ процентная доля HLA-DR-позитивных клеток была значительно выше, чем в соответствующих субпопуляциях NKG2C⁻ (рис. 8). Кроме того, клетки CD56^{dim}CD57⁻NKG2C⁺ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺ также демонстрировали более высокую интенсивность экспрессии данного маркера, независимо от HCMV-статуса донора. При этом, прямой корреляции между процентной долей NK-клеток HLA-DR⁺ и NKG2C⁺ выявлено не было. В субпопуляции NK-клеток CD56^{bright}, в соответствии с уже представленными выше данными (рис. 7B), у многих доноров был отмечен высокий уровень экспрессии HLA-DR и процентное содержание HLA-DR⁺ клеток как во фракции CD56^{bright}NKG2C⁺, так и во фракции CD56^{bright}NKG2C⁻ (рис. 8). Таким образом, вновь отмечена ассоциация экспрессии HLA-DR со стадией дифференцировки NK-клеток CD56^{bright}, а также подтверждены недавно опубликованные данные о том, что у HCMV-позитивных доноров может наблюдаться увеличенная популяция активированных дифференцированных клеток CD56^{dim}57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ [Costa-García и др., 2019]. Можно предположить, что реактивация вируса в

организме и развитие соответствующего иммунного ответа приводит к активации и экспансии адаптивных НК-клеток, ко-экспрессирующих NKG2C и HLA-DR. Кроме того, было впервые показано, что активация и увеличение экспрессии HLA-DR и NKG2C на НК-клетках происходит уже на стадии дифференцировки $CD56^{dim}CD57^{-}$, и по ряду других характерных фенотипических и функциональных признаков можно предположить, что НК-клетки $CD56^{dim}CD57^{-}NKG2C^{+}$ являются предшественниками адаптивных клеток $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}$ [Kobyzeva и др., 2020].

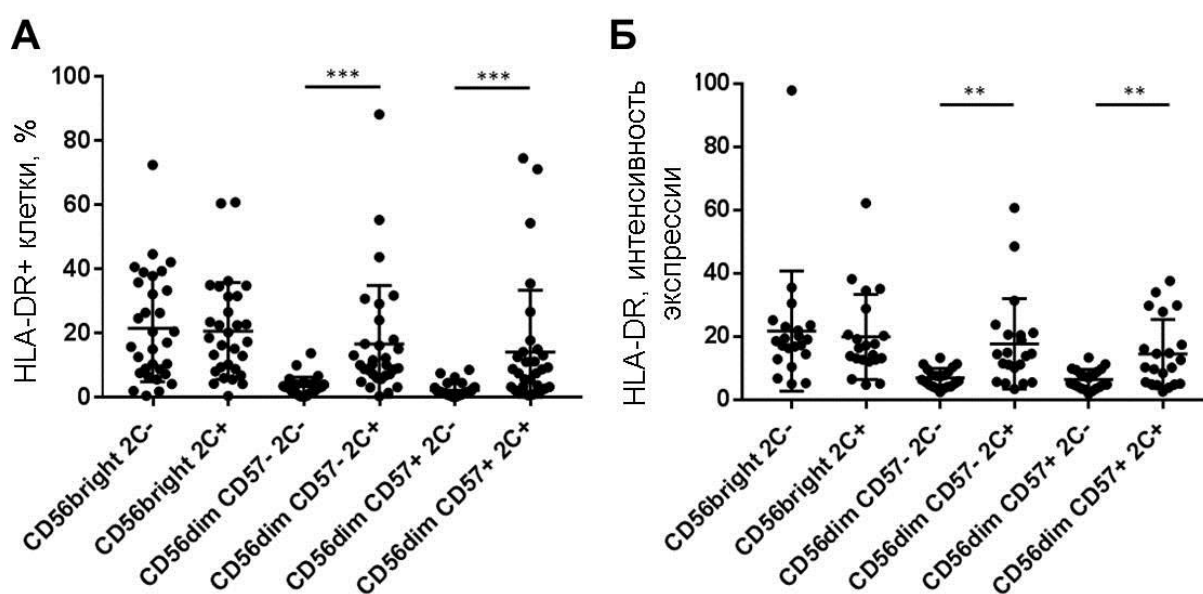
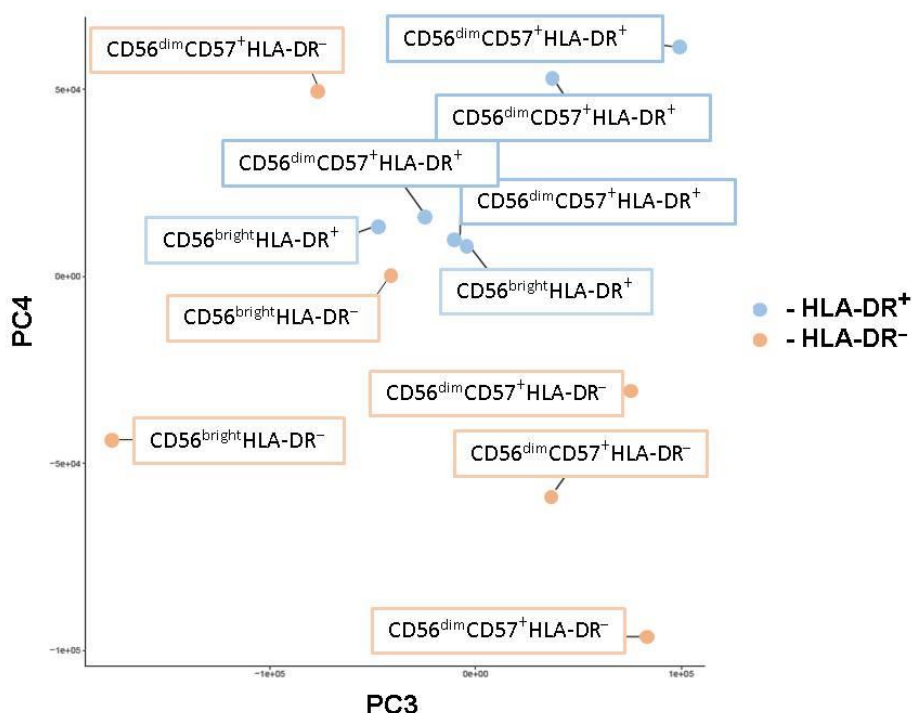


Рис. 8. Доля HLA-DR-позитивных клеток (А) и интенсивность экспрессии HLA-DR (Б) в субпопуляциях НК-клеток $NKG2C^{+}$ и $NKG2C^{-}$ на разных стадиях дифференцировки.

3.3. Сравнительное РНК-секвенирование HLA-DR-позитивных и негативных НК-клеток

Для анализа сходств и различий между двумя описанными в разделе 4.1 фракциями HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток – 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. Анализ дифференциальной экспрессии генов между образцами CD56^{bright}HLA-DR⁻ и CD56^{bright}HLA-DR⁺, CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻HLA-DR⁻ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ показал, что HLA-DR-позитивные НК-клетки на разных стадиях дифференцировки имеют некоторые общие черты и преимущественно группируются вместе при анализе основных компонент (principle component analysis, PCA) (рис. 9),



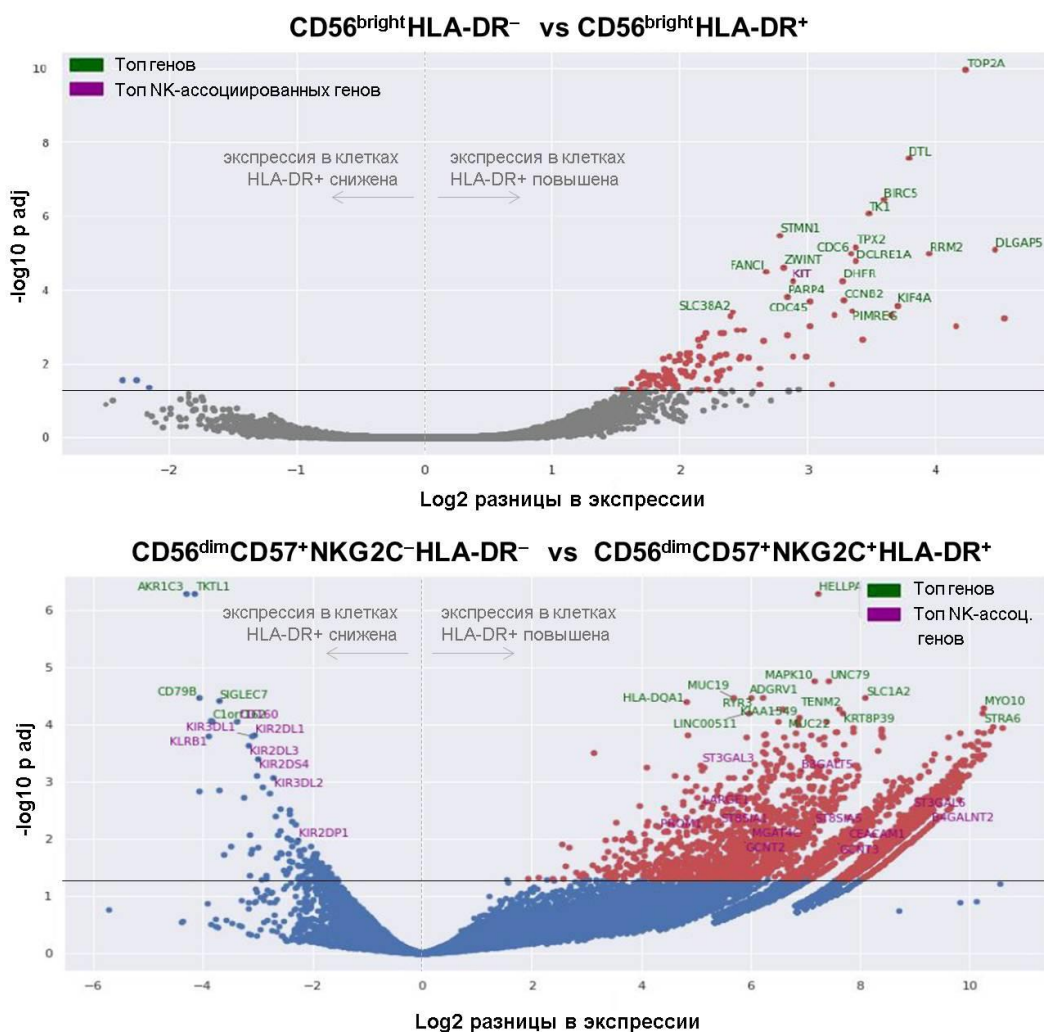
однако во многом их профили экспрессии различаются (рис. 10).

Рис. 9. Анализ главных компонент данных РНК-секвенирования субпопуляций НК-клеток CD56^{bright}HLA-DR⁻, CD56^{bright}HLA-DR⁺, CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁻HLA-DR⁻ и CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺. Представлены суммарные данные, полученные на клетках от двух доноров в двух повторностях.

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. 10). и Из 20 наиболее отличающихся по экспрессии генов (то есть генов с наименьшим значением «p-value adjusted» - значение P, учитывающее множественные сравнения) в клетках HLA-DR⁺ по сравнению с клетками

HLA-DR⁻ в субпопуляции CD56^{bright} преобладали гены, участвующие в репликации (*TOP2A*, *TK1*, *CDC6*, *RRM2*, *DHFR*, *CDC45*, *DTL*), регуляции перехода между стадиями клеточного цикла S-G2-M (*DLGAP5*, *DCLRE1A*, *CCNB2*), регуляции процесса митоза (*STMN1*, *ZWINT*, *KIF4A*, *PIMREG*), а также ингибиторы апоптоза (*BIRC5*) – их экспрессия увеличена в HLA-DR-положительных клетках (рис. 10). Это говорит о том, что экспрессия HLA-DR в NK-клетках CD56^{bright} ассоциирована в первую очередь с их пролиферативной активностью, и, таким образом, увеличена в активно делящихся клетках. В субпопуляции CD56^{dim}, из 20 наиболее отличающихся по экспрессии генов, в клетках HLA-DR⁺ по сравнению с клетками HLA-DR⁻ была увеличена экспрессия генов, повышающих клеточную адгезию (*ST8SIA1/5*, *ST3GAL6*, *MYO10*, *TENM2*), участвующих в передаче сигнала (*UNC79*, *MAPK10*, *RYR3*, *ADGRV1*, *STRA6*) и антигенпрезентации (*HLA-DQA1*) (рис. 10). В то же время, была снижена экспрессия ряда ингибирующих и активирующих рецепторов, характерных для более дифференцированных клеток (*SIGLEC7*, *KIR2DL1*, *KIR2DL3*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KLRB1*, *KIR2DS4*, *CD160*). Увеличение адгезивных свойств, распластывание и миграция характерны для функционально активированных NK-клеток и необходимы для формирования иммунологического синапса [Bakker и др., 2000; Culley и др., 2009; Urlaub и др., 2017]. Увеличение экспрессии сигнальных молекул подтверждает активированное состояние CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ NK-клеток. Низкая экспрессия рецепторов семейства KIR характерна для менее дифференцированных NK-клеток [Béziat и др., 2010]; при этом, по другим фенотипическим маркерам (NKG2C⁺, CD57⁺) отсортированную субпопуляцию CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ скорее следует отнести к терминально дифференцированным клеткам [Lopez-Vergès и др., 2011]. Подобный паттерн экспрессии мог возникнуть в результате «обратной дифференцировки» зрелых NK-клеток, в том числе адаптивных, параллельно с приобретением экспрессии HLA-DR при активации; однако, на данный момент появление рецепторов KIR

на поверхности считается необратимым [Béziat и др., 2010; Björkström и др., 2010]. В качестве альтернативной гипотезы, экспрессия HLA-DR может изначально появляться на менее дифференцированных клетках, еще не прошедших лицензирование или находящихся в процессе, однако уже экспрессирующих маркеры CD57 и NKG2C. Считается, что именно приобретение поверхностной экспрессии KIR характеризует «обученные» НК-клетки, причем, чем больше различных рецепторов экспрессирует клетка, тем выше её функциональная активность, в первую очередь, цитотоксическая



[Brodin, Kärre, Höglund, 2009; Held и др., 2011].

Рис. 10. Сравнительная дифференциальная экспрессия генов между НК-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 $P_{adj} \leq 0,05$. P_{adj} - «*p-value adjusted*», значение P , учитывающее множественные сравнения.

Дополнительно было проведено сравнение экспрессии определенных групп генов, связанных с функциональной активностью, степенью дифференцировки NK-клеток и антиген-презентирующим комплексом (рис. 11). В клетках $CD56^{bright}HLA-DR^{+}$ так же, как и в клетках $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}HLA-DR^{+}$, была отмечена сниженная экспрессия некоторых ингибирующих рецепторов (*CD300a*, *KLRG1*, *SIGLEC7*), в том числе KIR (*KIR2DL1/3/4*, *KIR3DL1*). В то же время, экспрессия ряда других ингибирующих рецепторов (*CEACAM1*, *TIGIT*, *LILRB1*) была увеличена, но только в клетках $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}HLA-DR^{+}$. В обеих субпопуляциях в NK-клетках $HLA-DR^{+}$ был немного снижен уровень экспрессии гена Fc-рецептора CD16, общей гамма-цепи цитокиновых рецепторов *IL-2RG*, маркера зрелых цитотоксических клеток *FCRL6*, гранзимов и перфорина, но увеличена экспрессия генов *IL-15R α* и *IFN γ* (рис. 11). В совокупности, данный паттерн экспрессии указывает на ожидаемую сниженную цитотоксическую активность, однако потенциально увеличенную продукцию цитокинов в ответ на IL-15 у циркулирующих $HLA-DR^{+}$ NK-клеток здоровых людей. В обеих субпопуляциях в $HLA-DR$ -позитивных NK-клетках отмечена увеличенная экспрессия альфа и бета цепей других типов МНС II помимо $HLA-DR$ ($HLA-DQ\alpha 1$ и $\beta 1$) (рис. 11), однако только в клетках $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}HLA-DR^{+}$ также повышена экспрессия сопутствующих молекул, необходимых для регуляции экспрессии антиген-презентирующего комплекса и процесса презентации: *CIITA*, *HLA-DM*, *CD80*, *CD209* [LeibundGut-Landmann и др., 2004; Rock, Reits, Neefjes, 2016] (рис. 11Б). Профиль экспрессии хемокиновых рецепторов указывает на то, что NK-клетки $CD56^{bright}HLA-DR^{+}$, помимо характерной для всех клеток $CD56^{bright}$ способности заходить в ткани и лимфоузлы, вероятно, могут эффективнее рекрутироваться в места интенсивного воспаления (за счет рецепторов *CCR2*, *CCR3*, *CCR5*, *CXCR3*)

[Maghazachi, 2010] (рис. 11A). НК-клетки $CD56^{dim}CD57^{+}NKG2C^{+}HLA-DR^{+}$, по сравнению с соответствующими

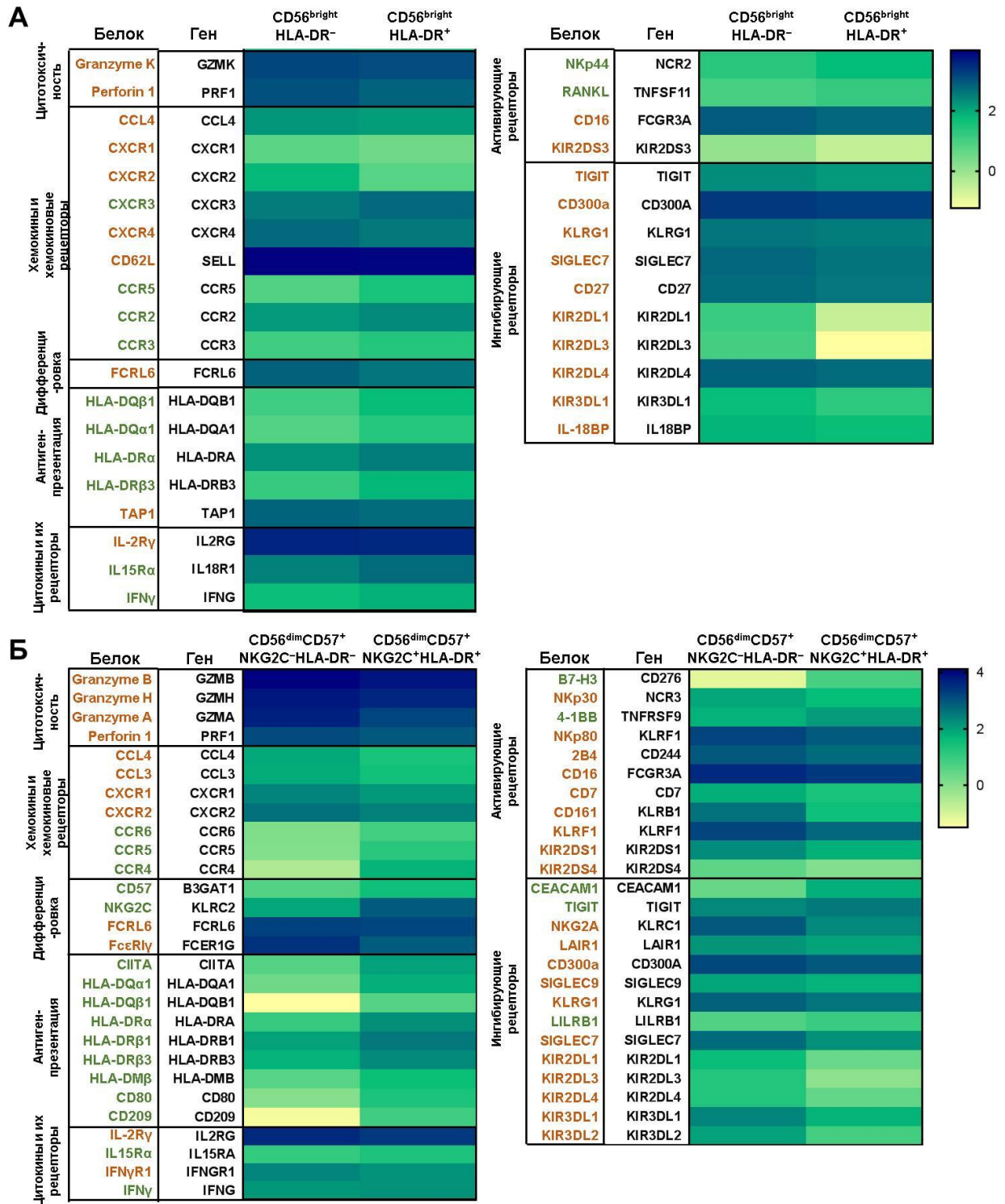


Рис. 11. Дифференциально экспрессированные гены и кодируемые ими белки из определенных групп, связанных с функциональной активностью НК-клеток, выявленные при сравнении субпопуляций $CD56^{bright}HLA-DR^{-}$ и $CD56^{bright}HLA-DR^{+}$ (A) и субпопуляций

$CD56^{dim}CD57^+NKG2C^-HLA-DR^-$ и $CD56^{dim}CD57^+NKG2C^+HLA-DR^+$ (Б). Зеленым выделены белки с увеличенной экспрессией соответствующих генов в HLA-DR-позитивных клетках по сравнению с HLA-DR-негативными на той же стадии дифференцировки, красным – с пониженной.

клетками HLA-DR⁻, вероятно могут распределяться в ткани (кожу, легкие), в том числе в качестве клеток памяти, и заходить в лимфоузлы за счет увеличенной экспрессии рецепторов CCR4, CCR5, CCR6 [Maghazachi, 2010; Pease, 2007] (рис. 11Б).

В целом, по данным РНК-секвенирования, HLA-DR⁺ НК-клетки из менее дифференцированной субпопуляции $CD56^{bright}$ и более дифференцированной субпопуляции $CD56^{dim}CD57^+NKG2C^+$ представляют собой два существенно различающихся по паттерну экспрессии пула клеток, но обладают некоторыми сходными чертами. HLA-DR⁺ НК-клетки из обеих субпопуляций демонстрируют ряд признаков сниженной цитотоксической активности, сниженную экспрессию KIR, но увеличенную экспрессию IFN γ по сравнению с соответствующими клетками HLA-DR⁻. В то же время, НК-клетки $CD56^{bright}HLA-DR^+$ можно охарактеризовать как находящиеся на или готовые к стадии активной пролиферации, с возможностью рекрутинга в очаг воспаления. НК-клетки $CD56^{dim}CD57^+NKG2C^+HLA-DR^+$ демонстрируют склонность к подвижности и миграции, в том числе, в ткани и лимфоузлы, а также экспрессию более широкого спектра компонентов антиген-презентирующей системы и рецепторов, еще больше снижающих цитотоксическую активность, по сравнению с клетками $CD56^{bright}HLA-DR^+$. Возможно, именно более дифференцированные HLA-DR-позитивные НК-клетки способны контактировать с Т-клетками посредством антиген-презентации *in vivo*, и сниженная цитотоксичность в таком случае защищает их от аутореактивности при близком контакте. Не исключено, что активно делящиеся и накапливающиеся в очагах воспаления НК-клетки $CD56^{bright}HLA-DR^+$ могут впоследствии дифференцироваться в клетки

CD56^{dim}CD57⁺NKG2C⁺HLA-DR⁺ и служить дополнительными активаторами Т-клеточного адаптивного звена.

3.4. Анализ функциональных свойств свежевыделенных HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток

В литературе представлено мало данных о функциональной активности циркулирующих HLA-DR-позитивных НК-клеток *in vivo* или *ex vivo* у здоровых индивидов. В одном из исследований была зарегистрирована более интенсивная дегрануляция НК-клеток HLA-DR⁺ в целом, по сравнению с клетками HLA-DR⁻ [Evans и др., 2011]; в другой работе свежевыделенные HLA-DR-позитивные НК-клетки демонстрировали более эффективную цитотоксичность только по отношению к НК-устойчивым клеткам-мишеням, но не к стандартной клеточной линии K562 [Burt и др., 2009]. Более интенсивная продукция IFN γ НК-клетками HLA-DR⁺ *ex vivo* от здоровых доноров была показана только в ответ на стимуляцию BCG [Evans и др., 2011]. В данной работе мы оценили способность свежевыделенных HLA-DR-позитивных НК-клеток из крови здоровых людей продуцировать IFN γ в ответ на стимуляцию IL-12 и IL-15, а также проанализировали их антителозависимую и естественную цитотоксичность после предварительной стимуляции IL-2. НК-клетки CD56^{dim}HLA-DR⁺, выделенные из крови и обогащенные с помощью клеточной сортировки (рис. 4А), демонстрировали более высокий уровень продукции IFN γ , чем клетки CD56^{dim}HLA-DR⁻ (рис. 12А, Б). В субпопуляции НК-клеток CD56^{bright}, клетки HLA-DR⁺ и клетки HLA-DR⁻ одинаково продуцировали IFN γ , как в абсолютных значениях, так и в процентах продуцирующих клеток, и делали это интенсивнее, чем клетки CD56^{dim} (рис. 12А, Б). Высокая отвечаемость на стимуляцию цитокинами в целом характерна для клеток из субпопуляции CD56^{bright} [Cooper и др., 2001]. Свежевыделенные НК-клетки CD56^{dim}HLA-DR⁺ демонстрировали менее

эффективную антитело-зависимую дегрануляцию, чем NK-клетки $CD56^{dim}HLA-DR^{-}$, хотя уровень гранзима В был одинаковым у HLA-DR-позитивных и негативных клеток (рис. 12В, Г). У клеток $CD56^{bright}HLA-DR^{+}$ и $HLA-DR^{-}$ наблюдался низкий уровень антитело-зависимой дегрануляции (рис. 12Г), что характерно для клеток на данной стадии дифференцировки. Естественная цитотоксическая активность после пред-инкубации в течение ночи с IL-2 (500 ед./мл) была одинаковой среди всех четырех отсортированных субпопуляций: $CD56^{bright}HLA-DR^{-}$, $CD56^{bright}HLA-DR^{+}$, $CD56^{dim}HLA-DR^{-}$, $CD56^{dim}HLA-DR^{+}$ (рис. 12Д).

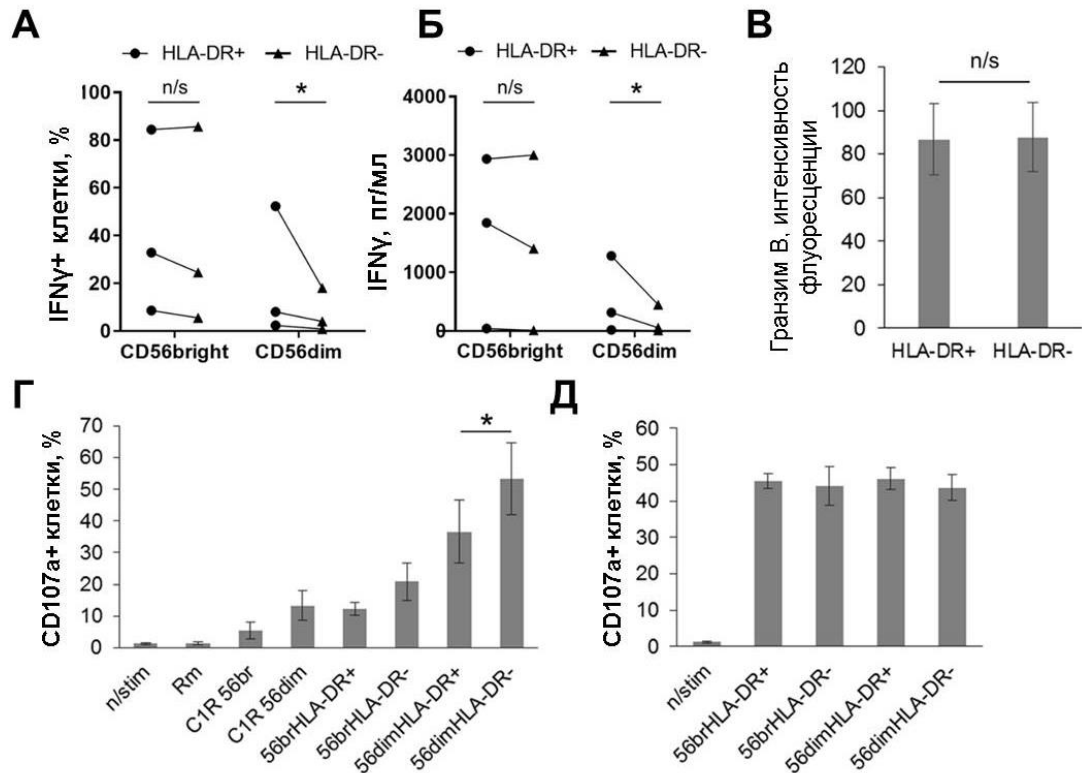


Рис. 12. Функциональная активность $HLA-DR^{+}$ и $HLA-DR^{-}$ NK-клеток из субпопуляций $CD56^{bright}$ и $CD56^{dim}$. Продукцию $IFN\gamma$ измеряли с помощью внутриклеточного окрашивания (А) и ИФА (Б) после предварительной стимуляции $IL-12+IL-15$. Представлены результаты трех независимых экспериментов. (В) Уровень гранзима В в свежесыведенных $HLA-DR$ -позитивных и негативных NK-клетках. (Г, Д) Антитело-зависимая (Г) и естественная (Д) 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 и K562, соответственно, после предварительной стимуляции IL-2. (В-Д) Данные

представлены как средние значения \pm SEM трех независимых экспериментов. Статистическую достоверность различий во всех представленных экспериментах оценивали с помощью парного *t*-теста. *n/s* – недостоверно; *n/stim* – не стимулированные, *Rt* - ритуксимаб (антитело против CD20); *C1R 56br* - клетки CD56^{bright} + клетки C1R; *C1R 56dim* - клетки CD56^{dim} + клетки C1R; экспериментальные образцы содержали NK-клетки указанной субпопуляции + клетки C1R + ритуксимаб.

Таким образом, в субпопуляции CD56^{dim} NK-клетки HLA-DR⁺ демонстрировали более высокую продукцию IFN γ в ответ на цитокины, но менее активную антитело-зависимую дегрануляцию, чем клетки CD56^{dim}HLA-DR⁻, что согласуется с прогнозами, сделанными на основе РНК-секвенирования. Более интенсивная реакция на цитокины и в то же время менее интенсивный ответ на CD16-опосредованную стимуляцию не характерны для адаптивных NK-клеток. Данные характеристики скорее сближают фракцию CD56^{dim}HLA-DR⁺ по функциональной активности с менее дифференцированной субпопуляцией CD56^{bright}. Поскольку в данной серии экспериментов NK-клетки не разделяли дополнительно по экспрессии маркеров CD57 и NKG2C, наблюдаемый функциональный ответ субпопуляции CD56^{dim}HLA-DR⁺ складывался из ответа терминально дифференцированных клеток CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁺ (в том числе адаптивных NKG2C⁺) и менее дифференцированных клеток CD56^{dim}CD57⁻HLA-DR⁺. Несмотря на то что двое из трех доноров, чьи результаты представлены на рис. 12, принадлежали к группе 2 (таблица 6) и обладали относительно высоким уровнем клеток CD56^{dim}CD57⁺HLA-DR⁺, в данных условиях стимуляции, по всей видимости, основной вклад в зарегистрированный функциональный ответ внесли клетки CD56^{dim}CD57⁻.

В то же время, NK-клетки CD56^{bright} HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ не показали статистически достоверных различий по функциональной активности и демонстрировали типичные характеристики NK-клеток на данной стадии

дифференцировки. Полученные данные подтверждают предположение, что экспрессия HLA-DR на менее дифференцированных NK-клетках CD56^{bright}, циркулирующих в крови, не связана с их активацией, так как не сопровождается изменениями в функциональном ответе. Как уже обсуждалось выше, приобретение NK-клетками CD56^{bright} экспрессии HLA-DR может быть связано с прохождением определенных этапов дифференцировки, либо быть результатом межклеточных взаимодействий в тканях до выхода NK-клеток CD56^{bright} в кровотоки.

3.5. 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, комбинация IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, комбинация IL-2 и немодифицированных фидерных клеток K562, или только клетки K562-mbIL21. Данные по стимуляции только немодифицированными клетками K562 в качестве фидерных не представлены, так как данные клетки не могли поддерживать жизнеспособность NK-клеток в течение более чем 2-3 дней. K562 – это стандартная линия клеток-мишеней, широко используемая для стимуляции NK-клеток, а модифицированные клетки K562, экспрессирующие IL-21, являются перспективным агентом для наращивания человеческих NK-клеток в культуре, в том числе, для нужд адоптивной терапии, так как обеспечивают их длительную и интенсивную пролиферацию [Denman и др., 2012].

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.

13А, Б). При этом увеличивались размер и гранулярность НК-клеток, они приобретали «неправильную» форму, характерную для подвижных клеток, то есть переходили в активированное состояние. Клетки в контрольных образцах (без стимула) жили не больше 2-3 дней, и на их поверхности экспрессия HLA-DR не увеличивалась (данные не представлены). Наиболее высокий уровень экспрессии HLA-DR на поверхности НК-клеток наблюдался на 6-й и 9-й день в образцах, содержащих комбинацию IL-2 и K562-mbIL21 (35-93% HLA-DR⁺ клеток) или только K562-mbIL21 (47-90% HLA-DR⁺ клеток). Уровень HLA-DR-позитивных НК-клеток на 6-й день в образцах с IL-2 и немодифицированными клетками K562 также был довольно высоким (от 12% до 55%), что указывает на то, что не только мембраносвязанный IL-21, но также и другие молекулы на поверхности клеток K562 играют роль в стимуляции экспрессии MHC II на НК-клетках, например, молекулы адгезии (рис. 13А, Б).

Стоит отметить, что количество живых НК-клеток в образцах, стимулированных только фидерными клетками K562-mbIL21, на 6-й и тем более на 9-й день было значительно ниже, чем в других образцах, клетки теряли экспрессию CD56 и постепенно погибали (рис. 13А, вторая колонка). В этом случае высокий процент HLA-DR⁺ НК-клеток скорее является следствием их преимущественного выживания в данных условиях стимуляции. В образцах, стимулированных IL-2 и K562-mbIL21, высокопозитивные по HLA-DR НК-клетки также теряли экспрессию CD56, возможно, погибая из-за гиперактивации или чрезмерной дегрануляции по отношению к фидерным клеткам. Тем не менее, наиболее эффективно увеличение экспрессии HLA-DR вызывала именно комбинация IL-2 и фидерных клеток K562-mbIL21, в том числе, вероятно, благодаря отличным от mbIL-21 стимулирующим молекулам на их поверхности. Данный клон K562, помимо mbIL-21, несет на поверхности CD86 и CD137L – лиганды рецепторов CD28 и CD137(4-1BB), соответственно. Экспрессия этих рецепторов регистрируется на НК-клетках и увеличивается при их активации [Galea-Lauri

и др., 1999; Stojanovic и др., 2014]. При этом, если взаимодействие CD28-CD86 является ко-стимулирующим для NK-клеток [Galea-Lauri и др., 1999; Nandi, Gross, Allison, 1994], то взаимодействие CD137-CD137L у человека может давать противоречивые эффекты: индуцировать функциональное ингибирование NK-клеток при их взаимодействии с определенными раковыми клетками [Baessler и др., 2010; Buechele и др., 2012], либо, наоборот, усиливать пролиферацию и цитотоксическую активность NK-клеток при использовании CD137L-экспрессирующих фидерных клеток [Dowell и др., 2012; Jiang и др., 2014; Zhang и др., 2011]. В наших экспериментальных условиях обе лиганд-рецепторные системы, вероятнее всего, дают ко-стимулирующий эффект, дополняющий активирующий эффект мембраносвязанного IL-21 при взаимодействии NK-клеток с фидерными клетками K562-mbIL21.

Помимо увеличения субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁺, в образцах также повышалась экспрессия CD56. Большая часть HLA-DR-позитивных клеток демонстрировали фенотип CD56^{bright} после 6 дней культивирования и далее (рис. 13А). Увеличение экспрессии CD56 в NK-клетках, стимулированных различными цитокинами и фидерными клетками, наблюдалось ранее [Dowell и др., 2012; Skak, Frederiksen, Lundsgaard, 2008]. В образцах, содержащих только K562-mbIL21, экспрессия CD56 снижалась к 9-му дню, что коррелировало с постепенным вымиранием популяции (рис. 13А).

3.6. Сравнение воздействия растворимой и мембраносвязанной форм IL-21 на экспрессию HLA-DR NK-клетками

На следующем этапе было проведено сравнение влияния растворимого и мембранного связанного IL-21 на экспансию HLA-DR-позитивной доли NK-клеток. Для этого свежесыводенные NK-клетки здоровых добровольцев инкубировались в течение 6 дней с различными комбинациями растворимых цитокинов (IL-2, IL-21) и модифицированных и немодифицированных клеток линии K562.

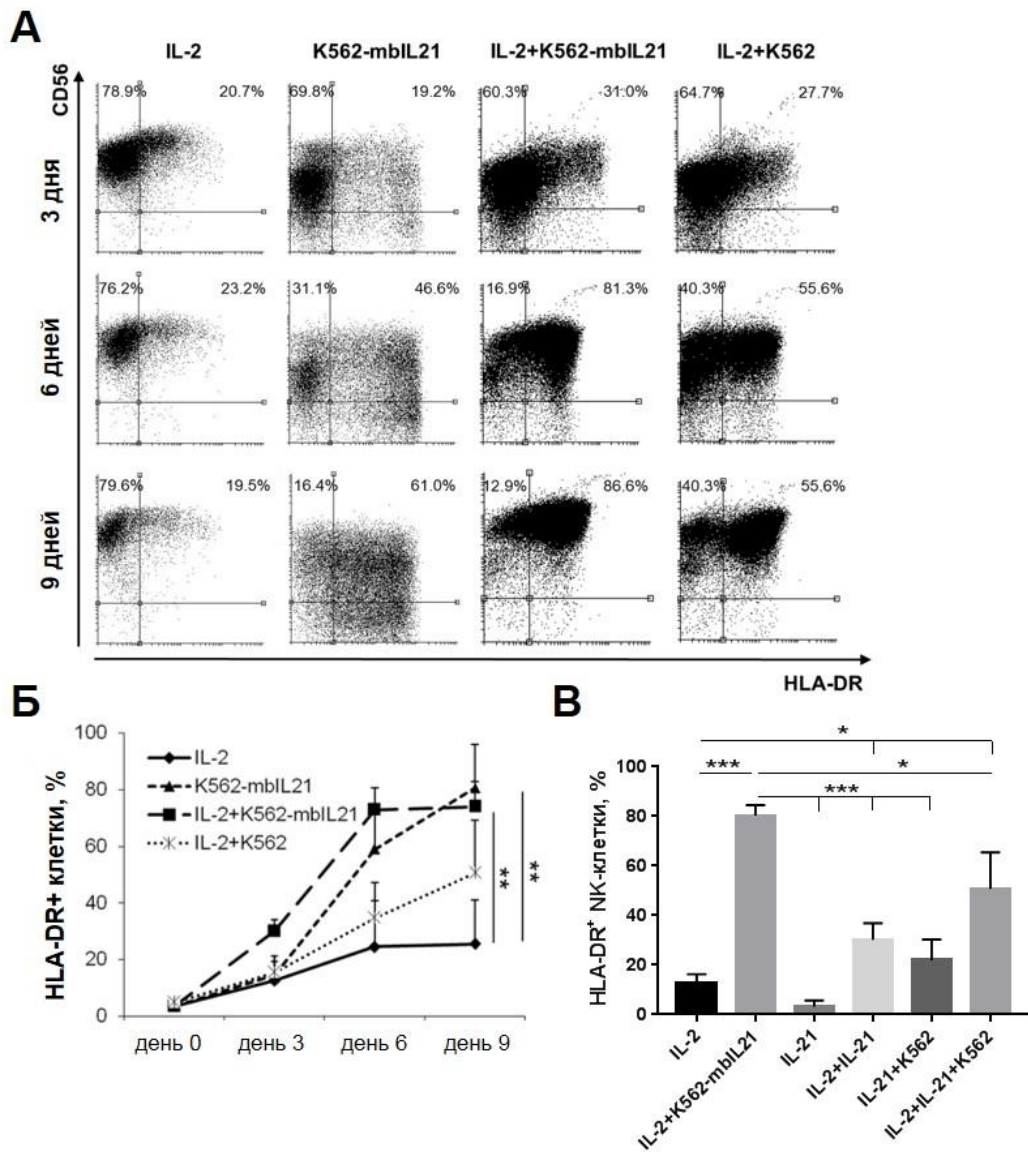


Рис. 13. Увеличение экспрессии HLA-DR на NK-клетках в условиях стимуляции. (А) Экспрессия HLA-DR и CD56 на NK-клетки через 3, 6 и 9 дней инкубации с указанными стимулами. Репрезентативное окрашивание клеток одного донора из трех. (Б) Динамика экспрессии HLA-DR во время инкубации с указанными стимулами. Представлено среднее \pm SD трех независимых экспериментов. Статистическая достоверность различий, оцененная парным *t*-тестом, показана для 9 дня. (В) Сравнение влияния растворимого и мембраносвязанного IL-21 на экспрессию HLA-DR в NK-клетках. Представлена доля NK-клеток HLA-DR⁺ на 6-ой день инкубации с указанными стимулами. Представлено среднее \pm SEM трех независимых экспериментов. Статистическую достоверность

различий оценивали парным t-тестом.

Растворимый IL-21 сам по себе не вызывал увеличения доли HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток; стимуляция IL-21 совместно с фидерными клетками K562 давала прирост HLA-DR⁺ НК-клеток на уровне со стимуляцией только IL-2 (рис. 13B). При добавлении к НК-клеткам растворимого IL-21 совместно с IL-2 доля HLA-DR-экспрессирующих клеток возрастала интенсивнее, чем при добавлении только IL-2 (рис. 13B). Когда стимуляция растворимыми IL-2 и IL-21 дополнялась немодифицированными клетками K562, отмечалась тенденция к еще большему увеличению доли HLA-DR-положительных НК-клеток по сравнению с образцом IL-2+IL-21, однако различия были недостоверными. Наибольшая доля НК-клеток HLA-DR⁺ была вновь зарегистрирована в образце с IL-2 и K562-mbIL21. Таким образом, фидерные клетки K562-mbIL21 в присутствии IL-2 являются наиболее эффективным агентом из протестированных нами для экспансии субпопуляции HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток *in vitro*. Однако, использование растворимых цитокинов IL-2, IL-21 и немодифицированных фидерных клеток K562 также приводило к существенному увеличению доли НК-клеток HLA-DR⁺. Это говорит о том, что на увеличение экспрессии HLA-DR оказывает влияние как взаимодействие с фидерными клетками, так и стимуляция IL-21; использование фидерных клеток с мембраносвязанным IL-21 (K562-mbIL21), вероятно, позволяет максимально совместить и усилить эти два эффекта.

Рассматривая возможные причины такого эффективного влияния фидерных клеток K562-mbIL21 на увеличение HLA-DR-положительной субпопуляции НК-клеток, было выдвинуто предположение, что немодифицированные клетки K562 и клетки K562-mbIL21 могут вызывать различный цитотоксический ответ со стороны НК-клеток. При взаимодействии с разными клеточными линиями разное количество НК-клеток дегранулирует и впоследствии активируется, запуская экспрессию HLA-DR либо пролиферацию клеток HLA-DR⁺. Однако, не было

зарегистрировано значимой разницы ни в уровне лизиса клеток K562 и K562-mbIL21, ни в уровне дегрануляции NK-клеток по отношению к этим двум клеточным линиям, как среди HLA-DR-позитивных, так и среди HLA-DR-негативных NK-клеток (рис. 14 А, Б). Таким образом, основной вклад в увеличение доли HLA-DR-позитивных NK-клеток в модели стимуляции IL-2 + K562-mbIL21 вносит именно активирующий эффект мембраносвязанного IL-21 и, возможно, ко-стимулирующих молекул CD86 и CD137L, экспрессированных на клоне фидерных клеток K562-mbIL21.

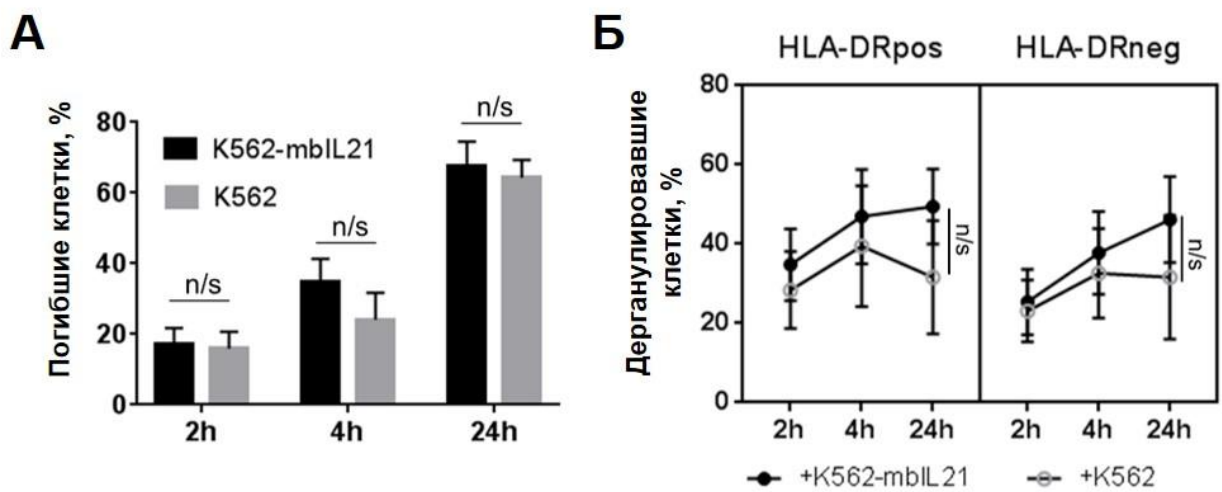


Рис. 14. Сравнение киллерной активности NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ по отношению к фидерным клеткам K562 и K562-mbIL21. (А) Доля умерших фидерных клеток K562 и K562-mbIL21 через 2, 4 и 24 ч ко-культивирования с NK-клетками. Гибель клеток измеряли с помощью витального красителя SytoxRed. (Б) Дегрануляция HLA-DR-позитивных и негативных NK-клеток через 2, 4 и 24 ч ко-культивирования с фидерными клетками K562 и K562-mbIL21. (А-Б) Представлено среднее \pm SD трех независимых экспериментов. Статистическую достоверность различий оценивали парным *t*-тестом.

3.7. Выявление оптимальных условий для получения HLA-DR-позитивных NK-клеток *in vitro*

Одной из задач данной работы было выявление наиболее благоприятных условий для получения NK-клеток, высоко экспрессирующих HLA-DR, для возможности последующей разработки терапевтического клеточного продукта

на основе данной субпопуляции. Были подобраны оптимальные временные условия культивирования, наиболее подходящая плотность НК-клеток и соотношение НК-клеток с фидерными клетками K562-mbIL21. Наиболее благоприятная концентрация для НК-клеток составляла 0,5 млн/мл при концентрации фидерных клеток 0,4 млн/мл (соотношение 5:4), при добавлении IL-2 в концентрации 100 ед./мл. При большей плотности культивирования, так же как и при больших концентрациях клеток K562-mbIL21, НК-клетки начинали погибать, скорее всего, из-за недостатка питательных веществ и/или слишком активной дегрануляции по отношению к фидерным клеткам. В указанных выше оптимальных условиях НК-клетки демонстрировали наиболее высокую экспрессию HLA-DR начиная с 6-го дня культивирования. На более ранних этапах доля HLA-DR-позитивных НК-клеток была существенно меньше (рис. 15).

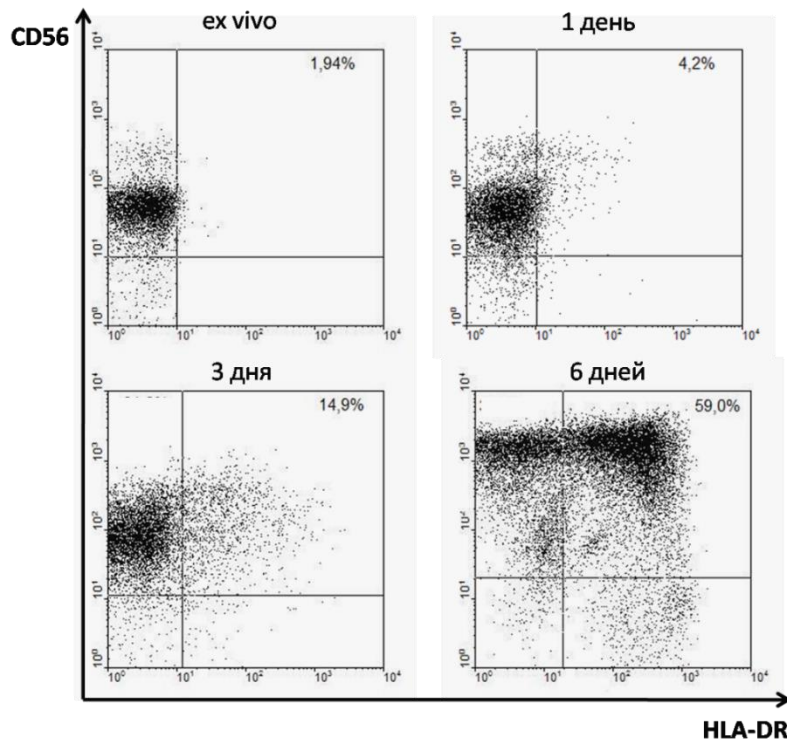


Рис. 15. Изменение экспрессии HLA-DR на НК-клетках в процессе культивирования с IL-2 и K562-mbIL21.

3.8. Стимуляция IL-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

Нашей следующей задачей было проверить, происходит ли увеличение доли HLA-DR-положительных NK-клеток вследствие пролиферации чувствительной к цитокинам субпопуляции HLA-DR⁺, как это показано Evans с соавторами [Evans и др., 2011], или же стимуляция IL-2+K562-mbIL21 индуцирует экспрессию HLA-DR в NK-клетках *de novo*.

3.8.1. NK-клетки экспрессируют HLA-DR *de novo* в процессе активации

В первой серии экспериментов была изучена возможность появления молекул HLA-DR на поверхности NK-клеток *de novo*. В начале, была проанализирована экспрессия гена α -субъединицы HLA-DR в NK-клетках с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР до и после стимуляции IL-2 либо IL-2+K562-mbIL21. В свежевыделенных NK-клетках уровень мРНК α -субъединицы HLA-DR был довольно низким, но он увеличивался после 6 дней стимуляции (рис. 16Б). При этом, экспрессия данного гена была значительно выше, когда для стимуляции NK-клеток использовалась комбинация IL-2 и K562-mbIL21, по сравнению со стимуляцией только с IL-2.

Далее, были проанализированы изменения в экспрессии HLA-DR в различных условиях стимуляции в отсортированных субпопуляциях NK-клеток HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺ (рис. 4Б). Перед сортировкой NK-клетки были предварительно простимулированы IL-2+K562-mbIL21 в течение 4-х дней для увеличения доли клеток HLA-DR⁺. Как видно из данных цитометрического анализа непосредственно после сортировки (рис. 4Б), субпопуляция HLA-DR⁻ была выделена с высокой чистотой (как правило, не менее 90%), тогда как субпопуляцию HLA-DR⁺ удавалось только значительно обогатить. Это связано с тем, что в общей популяции свежевыделенных NK-клеток, как правило, не

удается четко выделить HLA-DR-позитивную субпопуляцию из-за низкой экспрессии данной молекулы. Кажущееся снижение экспрессии маркеров в уже отсортированных субпопуляциях может быть связано с выгоранием конъюгированных с антителами флуорохромов в процессе клеточной сортировки (рис. 4Б).

Анализ уровня мРНК гена α -субъединицы HLA-DR непосредственно после сортировки подтвердил, что в отсортированной субпопуляции HLA-DR⁻ экспрессия данного гена отсутствовала, тогда как в субпопуляции HLA-DR⁺ экспрессия была отчетливо видна (рис. 16Б).

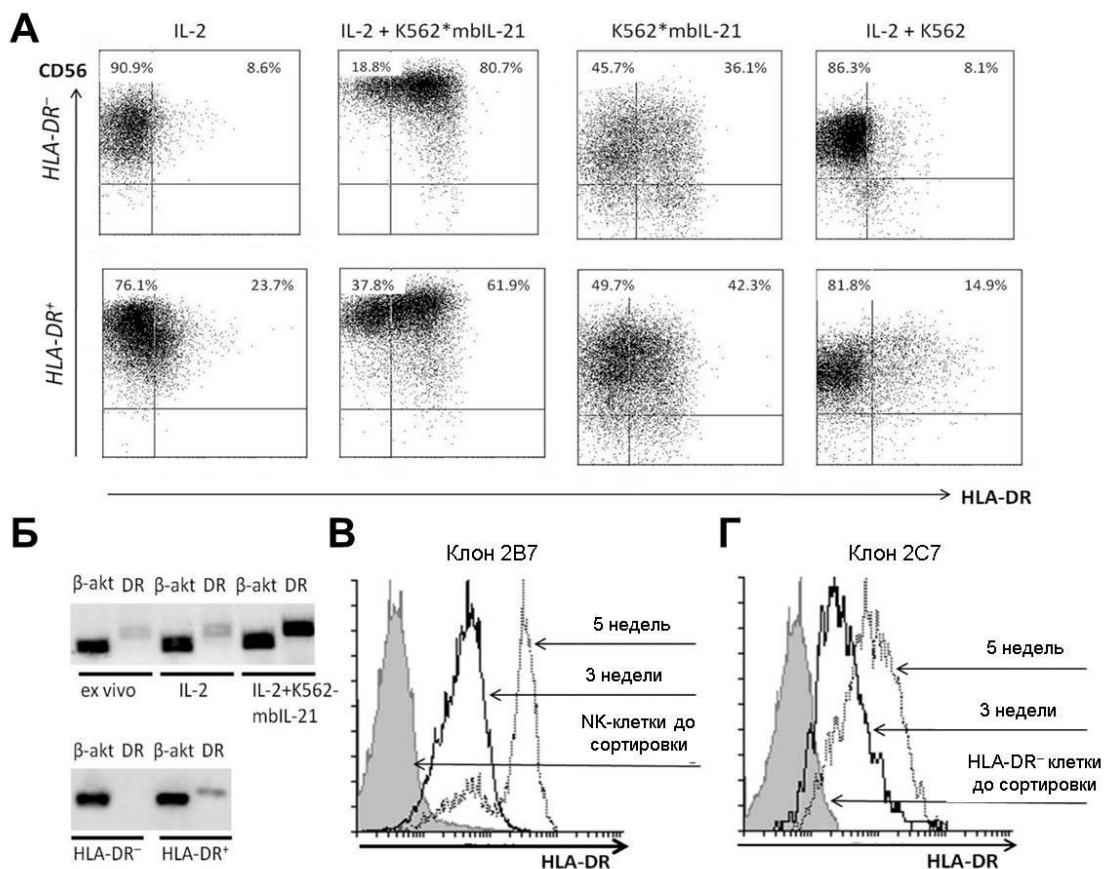


Рис. 16. Стимуляция NK-клеток IL-2 и/или K562-mbIL21 индуцирует экспрессию HLA-DR на HLA-DR-негативных клетках. (А) Экспрессия HLA-DR в субпопуляциях NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с указанными стимулами. (Б) Уровень мРНК α -субъединицы HLA-DR в NK-клетках, свежесвыделенных и через 6 дней

инкубации с указанными стимулами (верхний ряд), а также в свежевыделенных субпопуляциях HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ непосредственно после сортировки (нижний ряд). (А, Б) Представлены репрезентативные данные одного донора из трех. (В) Изменения экспрессии HLA-DR в клонах, полученных из несортированных НК-клеток. (Г) Изменения экспрессии HLA-DR в клонах, полученных из отсортированной субпопуляции HLA-DR⁻ НК-клеток. Представлены репрезентативные данные, полученные на одном клоне из 20 (В) и 24 (Г) исследованных клонов, соответственно.

Отсортированные субпопуляции НК-клеток HLA-DR⁻ и HLA-DR⁺ культивировали *in vitro* в течение 6 дней с IL-2, IL-2+K562-mbIL21, только K562-mbIL21 или IL-2 и немодифицированными K562 (рис. 16А). Данные, полученные при стимуляции только немодифицированными клетками K562, не представлены, так как в данных условиях на 6-й день в образцах практически не оставалось живых НК-клеток.

HLA-DR-позитивные НК-клетки появлялись в субпопуляции HLA-DR⁻ при всех видах стимуляции, но доля полученных HLA-DR⁺ клеток в образцах была разной (рис. 16А). Ответ HLA-DR-негативных НК-клеток на IL-2 зависел от особенностей донора: доля HLA-DR⁺ НК-клеток после 6 дней стимуляции варьировала от 6,1 до 40,9%. Когда HLA-DR⁻ НК-клетки стимулировали IL-2 и K562-mbIL21, уровень HLA-DR⁺ клеток на 6-й день был самым высоким по сравнению со всеми другими видами стимуляции.

В образцах с клетками HLA-DR⁻, которые 6 дней инкубировались с IL-2 и немодифицированными клетками линии K562, было также зарегистрировано небольшое повышение доли HLA-DR-позитивных клеток (рис. 16А). Это также свидетельствует о том, что контакт с фидерными клетками сам по себе

вносит свой вклад в индукцию экспрессии HLA-DR на NK-клетках.

Интересно, что в субпопуляции NK-клеток HLA-DR⁺ уровень экспрессии HLA-DR, измеренный после 6 дней культивирования *in vitro*, во всех образцах был ниже, чем непосредственно после сортировки (рис. 16А). Причиной наблюдаемого снижения может быть, по крайней мере частично, интернализация молекул HLA-DR, связавшихся с антителом, используемым для сортировки. Кроме того, будучи уже активированными, клетки HLA-DR^{hi} могли стать менее чувствительными к стимуляции.

Дополнительно к отсортированным субпопуляциям были получены и охарактеризованы клонально размноженные популяции NK-клеток (клоны). Было показано, что клоны, полученные как из общей популяции NK-клеток, так и из субпопуляции CD56⁺HLA-DR⁻ увеличивали (либо приобретали) экспрессию HLA-DR в условиях стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 на третьей/пятой неделе культивирования. В некоторых полученных культурах практически 100% клеток клона высоко экспрессировали данную молекулу (Рис. 16В, Г).

Таким образом, разными методами было показано, что экспрессия HLA-DR индуцируется в NK-клетках, изначально отрицательных по этому маркеру, при стимуляции IL-2 + K562-mbIL21.

3.8.2. HLA-DR-позитивные NK-клетки интенсивнее пролиферируют в ответ на стимуляцию

Во второй серии экспериментов, для проверки гипотезы о повышенной пролиферативной активности NK-клеток HLA-DR⁺ в ответ на стимуляцию, было проведено сравнение данного параметра у HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных NK-клеток в различных стимулирующих условиях: в присутствии IL-2, IL-21, клеток K562-mbIL21, IL-2 + IL-21, IL-2 + K562 (немодифицированные), IL-2 + K562-mbIL21. После 7 дней инкубации с

указанными стимулами доля пролиферирующих НК-клеток в HLA-DR-позитивной субпопуляции была высокой в ответ на все используемые стимулы, с особенно высокими значениями в образцах с фидерными клетками K562-mbIL21 (рис. 17А, Б). HLA-DR-негативные НК-клетки демонстрировали довольно интенсивную пролиферацию в образцах с IL-2 и IL-2 + K562-mbIL21; в других образцах пролиферация этих клеток была очень слабой (K562-mbIL21, IL-2 + IL-21, IL-2 + K562) или отсутствовала вовсе (IL-21). Однако при всех рассматриваемых способах стимуляции интенсивность пролиферации клеток HLA-DR⁺ была либо достоверно выше, чем клеток HLA-DR⁻, либо, по крайней мере, наблюдалась такая тенденция (рис. 17А, Б). Таким образом, экспрессия HLA-DR тесно связана с пролиферацией НК-клеток, и особенно интенсивная экспансия наблюдается в ответ на стимуляцию фидерными клетками K562-mbIL21. Возможно, это связано с преобладанием в выращенной *in vitro* HLA-DR-экспрессирующей субпопуляции НК-клеток CD56^{bright} (рис. 13А), которые экспрессируют более высокоаффинный рецептор к IL-2 [Ярилин, 2010], и, как следствие, интенсивнее отвечают на стимуляцию.

В дополнительных экспериментах было выявлено, что доля CD57⁺ НК-клеток уменьшалась во время культивирования с цитокинами и фидерными клетками (рис. 17В), причем самый сильный эффект наблюдался именно в образцах с IL-2+K562-mbIL21 и только K562-mbIL21. Традиционно, появление CD57 на поверхности НК-клеток в процессе дифференцировки считается необратимым [Björkström и др., 2010]. В таком случае причиной наблюдаемого эффекта должно быть преимущественное выживание и пролиферация менее дифференцированных CD57-негативных НК-клеток. Однако, относительно недавно было показано, что в определенных условиях CD57 может исчезать с поверхности НК-клеток, и такие клетки переходят из более дифференцированного состояния в менее дифференцированное, вероятно, приобретая большую чувствительность к цитокинам и пролиферативную активность [Kobyzeva и др., 2020; Streltsova и др., 2018b]. Возможно, в

условиях стимуляции IL-2+K562-mbIL21 наблюдается тот же самый эффект. В образовавшейся фракции NK-клеток CD57⁻ 30-80% клеток были HLA-DR-позитивными (данные не представлены). Таким образом, экспрессия HLA-DR во время активации NK-клеток *in vitro* связана главным образом с CD57-негативными клетками, которые пролиферируют в первую очередь в ответ на стимуляцию IL-2 и/или K562-mbIL21.

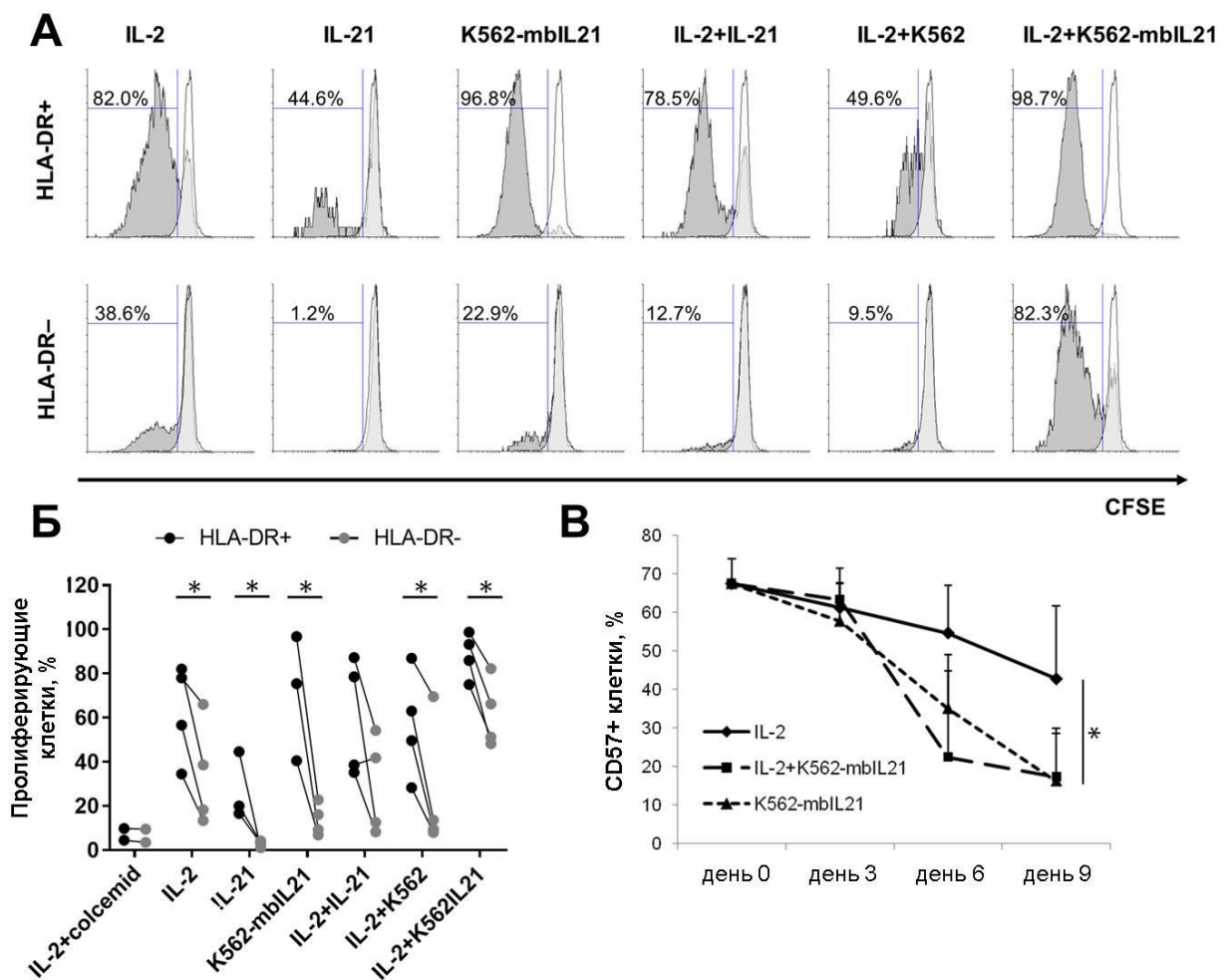


Рис. 17. Пролiferация NK-клеток при различных методах стимуляции. Пролiferацию NK-клеток оценивали по потере окрашивания CFSE после 7 дней инкубации с указанными стимулами. Представлено репрезентативное окрашивание (А) и суммированные данные четырех независимых экспериментов (Б). (А) Белая гистограмма – интенсивность флуоресценции в контрольном образце IL-2+колцемид, темно-серая гистограмма – в экспериментальном образце. (Б) Символы, обозначающие HLA-DR-

позитивные и негативные клетки от одного и того же донора, соединены между собой чертой. Статистическую достоверность различий оценивали парным t-тестом. (В) Динамика экспрессии CD57 во время инкубации НК-клеток с указанными стимулами. Представлены среднее±SD трех независимых экспериментов. Статистическую достоверность оценивали парным t-тестом для данных, полученных на 9-й день.

3.9. Анализ механизма индукции экспрессии HLA-DR в НК-клетках

Нашей следующей задачей было определить механизм индукции экспрессии HLA-DR *de novo* в НК-клетках, не являющихся профессиональными антиген-презентирующими клетками, в используемых нами условиях стимуляции (IL-2 + растворимый IL-21 или IL-2 + K562-mbIL21). Для этого, было необходимо:

- 1) определить, происходит ли индукция экспрессии HLA-DR напрямую в результате лигирования рецептора IL-21, или экзогенная стимуляция запускает синтез цитокинов в самих НК-клетках (в первую очередь, IFN γ), и уже они индуцируют экспрессию HLA-DR (аутоstimуляция);
- 2) на внутриклеточном уровне, оценить участие в этом процессе сигнальных путей, опосредованных транскрипционными факторами STAT1, STAT3 или ERK1/2;
- 3) определить изоформу СИПА, главного регулятора генов МНС II, которая экспрессируется в НК-клетках и, следовательно, контролирует экспрессию в них HLA-DR.

Для реализации пунктов 1 и 2 были подобраны селективные блокаторы, нарушающие связывание цитокинов с рецепторами (растворимая рекомбинантная внеклеточная часть рецептора к IL-21 – rhIL-21R, и антитело к рецептору IFN γ - anti-IFN γ R1); а также коммерческие соединения,

блокирующие фосфорилирование указанных выше транскрипционных факторов (флурадабина фосфат – ингибитор STAT1, Cryptotanshinone (криптотаншинон) – ингибитор STAT3, FR 180204 – ингибитор ERK 1/2). Для реализации пункта 3 были подобраны селективные праймеры, распознающие изоформы 1, 3 и 4 кДНК, полученной с мРНК гена СИТА.

3.9.1. Экспрессию HLA-DR в NK-клетках индуцирует как IL-21, так и эндогенный IFN γ

Было выявлено, что при стимуляции NK-клеток IL-2 и растворимым IL-21 в течение 6 дней в присутствии rhIL-21R блокируется IL-21-обусловленный эффект повышения экспрессии HLA-DR уже начиная с концентрации 5 мкг/мл rhIL-21R, и процентная доля HLA-DR-экспрессирующих клеток достигает уровня образца с IL-2 (рис. 18А, Б). В то же время, при стимуляции NK-клеток IL-2 и фидерными клетками K561-mbIL21 ингибирующий эффект растворимой формы rhIL-21R был гораздо ниже, либо, в некоторых экспериментах, отсутствовал вовсе (рис. 19А), вероятно, ввиду более сложного механизма активации NK-клеток с участием множества межмолекулярных взаимодействий с поверхностью фидерных клеток.

Отсутствие статистически значимых различий между контрольным образцом только с IL-2 и образцами с IL-2 и rhIL-21R в различных концентрациях свидетельствует в пользу того, что выбранный нами блокатор rhIL-21R взаимодействует только с IL-21, существенно не влияя на стимуляцию NK-клеток через IL-2 (рис. 18Б).

По литературным данным, экспрессия HLA-DR в NK-клетках часто ассоциирована с продукцией IFN γ [Evans и др., 2011; Loyon и др., 2016; Yano и др., 1996]. Кроме того, известно, что транскрипция с одного из промоторов гена СИТА, непосредственного активатора генов МНС II, запускается именно

под действием $IFN\gamma$ [Muhlethaler-Mottet и др., 1998]. В связи с этим нами была сформулирована гипотеза о том, что экспрессия HLA-DR в NK-клетках может индуцироваться $IFN\gamma$, синтезированным самими NK-клетками в ответ на стимуляцию IL-2 и IL-21, так как известно, что оба этих цитокина усиливают продукцию $IFN\gamma$ NK-клетками [Park и др., 2012; Skak, Frederiksen, Lundsgaard, 2008].

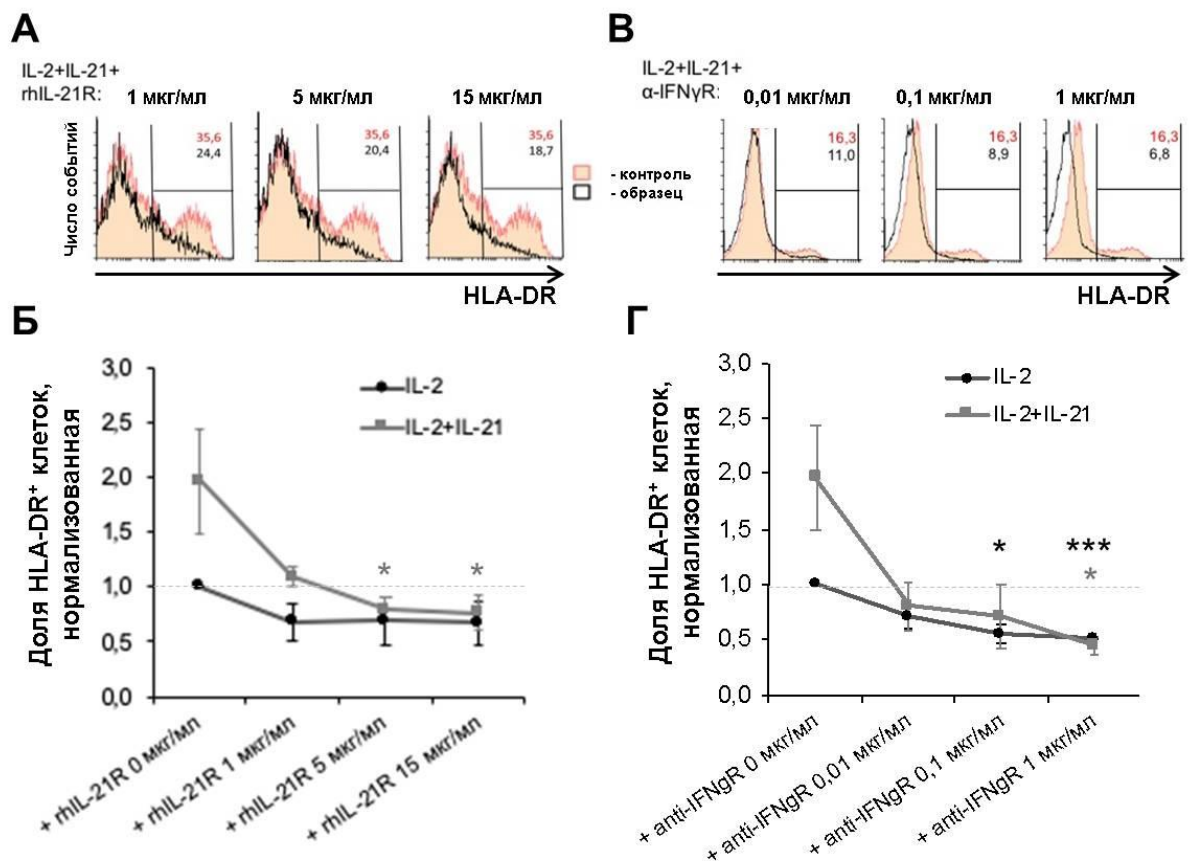


Рис. 18. Влияние блокаторов rhIL-21R и anti-IFN γ R1 на экспрессию HLA-DR на NK-клетках при стимуляции IL-2±IL-21. (А, В) Репрезентативные цитометрические данные и (Б, Г) суммированные данные (среднее±SEM) по трем независимым экспериментам, демонстрирующие влияние rhIL-21R и антител к IFN γ R1, соответственно, в указанных концентрациях на процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в культуре. Статистическую достоверность полученных различий оценивали парным *t*-тестом. Черные звездочки – достоверность различий между образцами, стимулированными IL-2, серые звездочки – достоверность различий между образцами, стимулированными IL-2+IL-21. Пунктирной линией обозначено нормализованное значение в контрольном образце только с IL-2 (единица)

При стимуляции NK-клеток IL-2 и растворимым IL-21 в присутствии антител к IFN γ R1 в концентрации 1 мкг/мл и выше было зарегистрировано достоверное снижение доли HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток и интенсивности экспрессии данной молекулы по сравнению с образцами без блокатора (рис. 18В, Г). Кроме того, при концентрации антител к IFN γ R1 0,1 и 1 мкг/мл наблюдалось достоверное снижение процентного содержания HLA-DR⁺ NK-клеток также и в образцах, стимулированных только IL-2 (рис. 18Г). 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 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. Подобный путь индукции экспрессии гена альфа-цепи HLA-DR, через IFN γ R1-STAT1-зависимую активацию основного регулятора МНС II класса СИТА, описан в литературе [Muhlethaler-Mottet и др., 1998] и может быть реализован в NK-клетках.

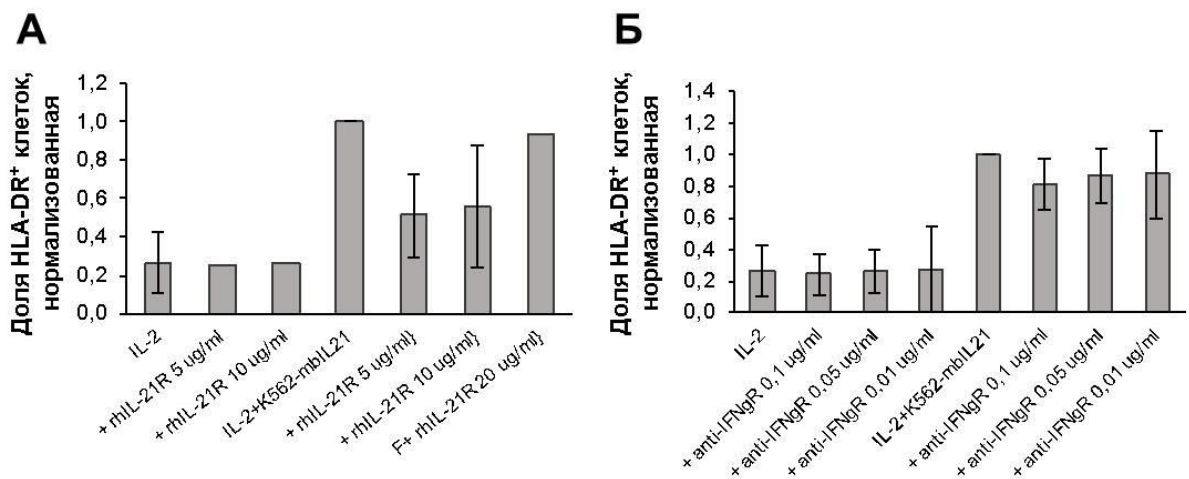


Рис. 19. Влияние блокаторов rhIL-21R и anti-IFN γ R1 на экспрессию HLA-DR на NK-клетках при стимуляции IL-2±K562-mbIL21. Представлены суммированные данные (среднее±SEM) по двум независимым экспериментам, демонстрирующие влияние rhIL-21R (А) и антител к IFN γ R1 (Б) в указанных концентрациях на процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в культуре.

Использование антител к $IFN\gamma R1$ при стимуляции NK-клеток IL-2 и фидерными клетками K561-mbIL21 дало неоднозначные результаты: в некоторых экспериментах была отмечена немного сниженная доля HLA-DR-позитивных клеток по сравнению с образцом без блокатора, тогда как в части экспериментов, наоборот, в образцах с антителом к $IFN\gamma R1$ процентное содержание HLA-DR-позитивных клеток было выше (рис. 19Б). Как упомянуто выше, возможной причиной наблюдаемого эффекта может быть сложная взаимосвязь сигналов в данной системе стимуляции: помимо mbIL-21, другие молекулы на поверхности фидерных клеток K561-mbIL21 могут вносить свой вклад в активацию NK-клеток, и, как следствие, в индукцию экспрессии HLA-DR. Блокирование передачи сигнала через рецептор $IFN\gamma$ может усиливать одни сигнальные пути и ингибировать другие, приводя к противоречивым эффектам в зависимости от баланса сигнала.

3.9.2. STAT3- и ERK1/2-опосредованные внутриклеточные пути передачи сигнала участвуют в запуске экспрессии HLA-DR в NK-клетках

Известно, что сигнал от IL-21R поступает в ядро клетки преимущественно через сигнальные пути JAK1/3-STAT3 и Ras/Raf/Mek/ERK1/2 [Zeng и др., 2007]. Сигнал от $IFN\gamma R$ может передаваться в ядро в основном через сигнальные пути с участием JAK1/3-STAT1 и Ras/Raf/Mek/ERK1/2 [Gough и др., 2008; Ivashkiy, 2018].

Для оценки участия компонентов указанных выше сигнальных путей в индукции экспрессии HLA-DR нами были выбраны селективные ингибиторы факторов STAT1, STAT3 и ERK1/2 – флударабина фосфат, криптаншинон и FR180204, соответственно. Также было необходимо подобрать условия культивирования, концентрации и временной интервал добавления ингибиторов соответствующих транскрипционных факторов к NK-клеткам. В литературных источниках рекомендованный временной интервал добавления ингибиторов для оценки их воздействия на культуру свежесыведенных

лимфоцитов человека в среднем варьирует от 24 до 48 часов [Hanafi и др., 2014; Honda и др., 2012]. На основании подготовительных экспериментов для ингибиторов флударабина фосфат и криптотаншинон были выбраны следующие концентрации: 0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, для FR180204 – 0,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 50 мкг/мл. Ингибиторы добавлялись на третий день культивирования NK-клеток с указанными стимулами, так как именно после третьего дня наблюдается интенсивный рост экспрессии HLA-DR (рис. 15), после чего клетки анализировали на цитометре через 36 часов (рис. 20А, Б).

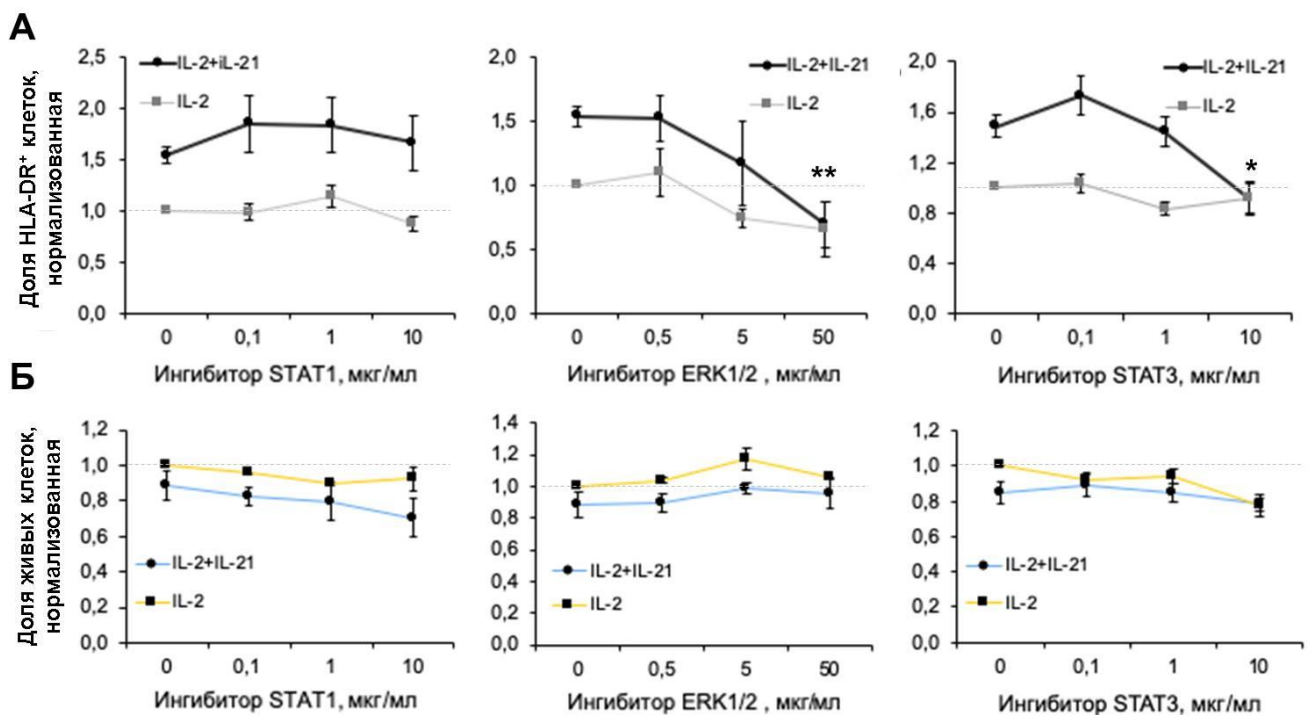


Рис. 20. Анализ участия внутриклеточных сигнальных молекул в индукции экспрессии HLA-DR в NK-клетках при стимуляции IL-2±IL-21. (А-Б) Влияние ингибиторов транскрипционных факторов STAT1, ERK1/2 и STAT3 в указанных концентрациях на (А) уровень экспрессии HLA-DR на NK-клетках и (Б) на жизнеспособность NK-клеток на 5-й день стимуляции. (А-Б) Представлены суммарные данные пяти экспериментов, нормализованные на значения в контрольных образцах только с IL-2, среднее±SEM. Пунктирной линией обозначено нормализованное значение в контрольном образце только с IL-2 (единица). Во все образцы без ингибиторов (концентрация 0 мкг/мл) добавлялось соответствующее количество растворителя – ДМСО. Статистическую достоверность различий оценивали парным *t*-тестом.

Добавление блокатора STAT1 в ростовую среду для лимфоцитов не вызывало достоверного ингибирования экспрессии HLA-DR на NK-клетках по сравнению с контрольным образцом IL-2+IL-21+ДМСО, напротив, была видна тенденция к небольшому увеличению экспрессии (рис. 20А). Таким образом, можно заключить, что активация сигнального пути JAK1/3-STAT1 при взаимодействии IFN γ -IFN γ R не влияет на экспрессию HLA-DR в NK-клетках, либо при его блокировке активно задействуются компенсаторные пути, например, Ras/Raf/Mek/ERK1/2.

Согласно данным, полученным в экспериментах с ингибитором ERK1/2, наблюдалось снижение экспрессии HLA-DR уже начиная с концентрации ингибитора 5 мкг/мл. При концентрации 50 мкг/мл снижение становилось статистически достоверным, по сравнению с контрольным образцом IL-2+IL-21+ДМСО, и доля HLA-DR⁺ NK-клеток достигала уровня образца, содержащего только с IL-2+ДМСО (рис. 20А). Это указывает на то, что активация сигнального пути Ras/Raf/Mek/ERK1/2, являющегося общим для IFN γ R и IL-21R, необходима для индукции экспрессии HLA-DR. Возможно, блокировка флуодарабином JAK1/3-STAT1-пути усиливает проведение сигнала по данному MAP-киназному пути. При этом, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии HLA-DR и в контрольных образцах только с IL-2, начиная с концентрации FR180204 5 мкг/мл (рис. 20А). Это обусловлено тем, что Ras/Raf/Mek/ERK1/2-зависимый сигнальный путь также участвует в передаче сигнала от IL-2R, тем самым влияя на IL-2-опосредованное увеличение доли HLA-DR-экспрессирующих клеток.

При добавлении криптотаншинона – ингибитора транскрипционного фактора STAT3 – в концентрации 10 мкг/мл наблюдалось достоверное уменьшение экспрессии HLA-DR на поверхности NK-клеток. Следовательно, сигнальный путь JAK1/3-STAT3, который является основным при передаче сигнала от IL-21R, по крайней мере частично задействован в индукции экспрессии HLA-DR (рис. 20А). Наблюдаемый эффект согласуется с уже

опубликованными в литературе данными о роли фактора STAT3 в передаче сигнала от IL-21 с последующим увеличением экспрессии HLA-DR и CD86 на NK-клетках [Loyon и др., 2016].

Таким образом, на внутриклеточном уровне запуск экспрессии HLA-DR в NK-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 II – СИТА. Известно, что СИТА является одной из мишеней киназной активности ERK1/2: ERK1/2 фосфорилирует СИТА, что приводит к его моно-убиквитинилированию, транслокации в ядро и последующему запуску экспрессии МНС II [Morgan и др., 2015]. Таким образом, полученные нами данные по участию ERK1/2 в индукции экспрессии HLA-DR на NK-клетках согласуются с опубликованными данными по регулировке экспрессии СИТА. К настоящему времени нами не найдено публикаций, свидетельствующих о прямом влиянии STAT3 на активность или экспрессию СИТА; однако, в одной из работ указано, что STAT3 ответственен за индуцированное тиреотропным гормоном ингибирование IFN γ -опосредованной активации СИТА – то есть, активация STAT3 блокирует IFN γ -индуцированное увеличение экспрессии МНС II за счет блокировки STAT1 пути [Kim и др., 2003]. В нашей работе при низких дозах блокатора STAT3 наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии МНС II – вероятно, в соответствии с результатами упомянутой статьи, блокировка STAT3 «высвобождала» передачу сигнала через STAT1, что приводило к усилению синтеза IFN γ и увеличению экспрессии HLA-DR. Однако, при увеличении концентрации криптотаншинона экспрессия HLA-DR достоверно снижалась (рис. 20А), что указывает и на позитивное влияние фактора STAT3 в регулировке экспрессии МНС II. Такая сложная, кажущаяся в некоторой степени противоречивой картина подтверждает наше предположение, что в используемых нами условиях стимуляции наблюдается синергия сигналов от

экзогенного IL-21 и эндогенного IFN γ : с одной стороны, IL-21-опосредованная активация STAT3 частично блокирует IFN γ -индуцированное увеличение экспрессии HLA-DR на NK-клетках; с другой стороны, фактор STAT3, по-видимому, способен индуцировать экспрессию HLA-DR напрямую через регуляцию СИТА. При этом, не было зарегистрировано влияния на экспрессию HLA-DR блокировки фактора STAT1, для которого показан четкий IFN γ -опосредованный путь запуска экспрессии фактора СИТА через промотор IV [Muhlethaler-Mottet и др., 1998] – вероятно, как раз из-за ингибирования данного пути в результате активации STAT3 [Kim и др., 2003]. Кроме того, блокировка STAT1-опосредованного пути передачи сигнала могла компенсироваться за счет активности дополнительного пути – каскада киназ Ras/Raf/Mek/ERK1/2.

Помимо экспрессии HLA-DR, во всех представленных образцах также оценивали количество живых NK-клеток (рис. 20Б). В целом, во всех образцах, стимулированных IL-2+IL-21, выживаемость NK-клеток была немного ниже, чем в образцах только с IL-2, однако различия были недостоверны. Это может быть обусловлено гиперактивацией части NK-клеток, что приводит к запуску в них апоптоза. Добавление ингибиторов транскрипционных факторов во всех используемых концентрациях также не приводило к достоверному снижению количества живых клеток. Таким образом, описанные выше результаты по влиянию факторов STAT1, STAT3 и ERK1/2 на процентное содержание HLA-DR-позитивных NK-клеток в популяции не были обусловлены гибелью определенных субпопуляций клеток под действием ингибиторов.

3.9.3. Экспрессию HLA-DR в NK-клетках регулирует изоформа 3 транскрипционного фактора СИТА

Молекула СИТА является главным регуляторным фактором экспрессии МНС класса II [LeibundGut-Landmann и др., 2004]. В настоящий момент установлено, что существует четыре изоформы СИТА, отличающиеся

строением первого экзона и нетранслируемой области перед ним (рис. 21А). Экспрессия данных изоформ зависит от типа клетки и, соответственно, активности одного из промоторов [LeibundGut-Landmann и др., 2004]: изоформа I экспрессируется преимущественно в дендритных клетках и моноцитах, изоформа III – в Т- и В-клетках, изоформа IV – в клетках, приобретающих экспрессию МНС II под действием $IFN\gamma$; по экспрессии изоформы II в каком-либо типе клеток нет опубликованных данных. До сих пор в литературе не имеется сведений о том, какая из изоформ присутствует в НК-клетках и участвует в индукции экспрессии HLA-DR. В наши задачи входило определить изоформу СИТА, которая экспрессируется в активированных в НК-клетках и запускает экспрессию HLA-DR, для чего были подобраны праймеры к месту контакта экзонов 1 и 2 изоформ I, III и IV для проведения ОТ-ПЦР анализа.

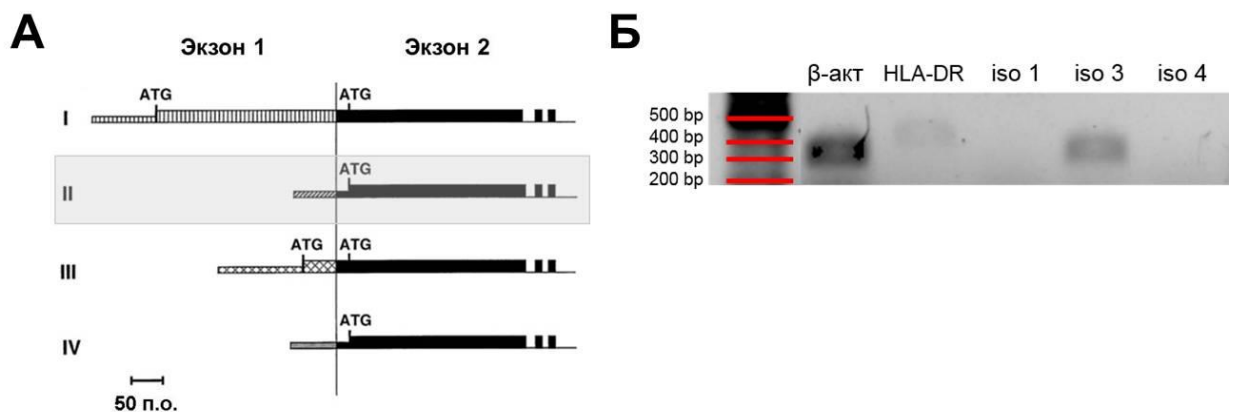


Рис. 21. Определение изоформы транскрипционного фактора СИТА, которая экспрессируется в активированных НК-клетках. (А) Схематическое изображение строения мРНК (первых двух экзонов) описанных в литературе изоформ СИТА. Узкой и широкой полосками обозначены нетранслируемые и транслируемые области, соответственно; ATG – возможные участки инициации трансляции; изоформа II выделена серым как не участвующая в данном исследовании. (Б) Результат ОТ-ПЦР анализа, демонстрирующий экспрессию в НК-клетках изоформы 3 белка СИТА. β -акт - β -актин (положительный контроль).

НК-клетки культивировали в присутствии IL-2+K562mbIL21 в течение 6

дней с целью индуцировать экспрессию HLA-DR, затем из них выделяли тотальную РНК, проводили обратную транскрипцию и ПЦР со специфическим праймерами для СИТА. Полученные ампликоны визуализировали при помощи гель-электрофореза. На рис. 21Б представлены результаты ПЦР репрезентативного эксперимента: полученные данные свидетельствуют об экспрессии изоформы III фактора СИТА в НК-клетках. Таким образом, в НК-клетках экспрессируется та же изоформа, что и в Т-клетках при активации, что, вероятно, является следствием их происхождения из общих клеток-предшественников. Интересно, что экспрессию изоформы IV, характерной для клеток, отвечающих на стимуляцию IFN γ , в НК-клетках зафиксировать не удалось, тогда как, по нашим данным, экспрессия HLA-DR на НК-клетках зависит от взаимодействия IFN γ - IFN γ R (рис. 18 В, Г). Возможно, в данных условиях стимуляции индукция экспрессии СИТА опосредуется через другие пути передачи сигнала от IFN γ R, не зависящие от JAK1/3-STAT1 пути и активации промотора IV, например, через Ras/Raf/Mek/ERK1/2-опосредованный путь, либо STAT1-путь блокируется активацией STAT3, как было описано выше.

3.10. Анализ экспрессии поверхностных маркеров на HLA-DR-позитивных НК-клетках, полученных в культуре

Чтобы выявить отличительные признаки HLA-DR-позитивных НК-клеток, полученных *in vitro*, мы сравнили экспрессию ряда фенотипических маркеров на HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ НК-клетках *ex vivo* (рис. 22А) и через 3 или 6 дней культивирования со следующими комбинациями стимулов: IL-2+K562-mbIL21, IL-2+K562 или IL-2+IL-21 (рис. 22Б). Была измерена поверхностная экспрессия CD107a, CD69, CD57, NKG2A, NKG2D и CD86 на клетках пяти разных доноров.

Было выявлено, что экспрессия CD69, CD57 и NKG2A была схожей как в HLA-DR-позитивных, так и в HLA-DR-негативных НК-клетках (рис. 22Б).

Уровень экспрессии маркера CD69, характеризующего клетки в активированном состоянии, был повышен на 6-ой день культивирования во всех клетках со всеми использованными типами стимуляции. Доля NKG2A-позитивных клеток на 6-й день была высокой в большинстве образцов, но с тенденцией к более высоким значениям в образцах с IL-2+K562-mbIL21. В то же время, доля CD57-позитивных клеток варьировала между образцами с разными стимулами: в образцах с IL-2+K562-mbIL21 большинство клеток, как HLA-DR⁺, так и HLA-DR⁻, были CD57-негативными; в остальных образцах уровень CD57-позитивных клеток был высоким и сравнимым со значениями *ex vivo* (рис. 22А, Б). Полученные данные подтверждают идею о том, что стимуляция IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 приводит к выживанию и пролиферации НК-клеток в основном на более ранних стадиях дифференцировки, которые характеризуются фенотипом CD57-NKG2A⁺ [Björkström и др., 2010]. С другой стороны, такие клетки могут появляться из-за «переключения» фенотипа, так как было показано, что рецептор NKG2A может снова появляться на поверхности при стимуляции после того, как был утрачен во время дифференцировки [Béziat и др., 2010], а маркер CD57 может исчезать с поверхности даже терминально дифференцированных клеток [Streltsova и др., 2018a].

Было установлено, что уровень экспрессии CD107a, NKG2D и CD86 различается между НК-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ (рис. 22Б). 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. 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. Для маркера CD107a представлены данные через 3 дня культивирования, поскольку через 6 дней уровень его экспрессии был очень низким у большинства доноров, вероятно, как следствие истощения пула цитотоксических гранул и обратного захвата молекул CD107a с поверхности.

Достоверная разница в уровне экспрессии была также зарегистрирована в отношении маркера CD86, ко-стимуляторной молекулы, необходимой для активации Т-клеток через взаимодействие молекул МНС и TCR в процессе антигенпрезентации (рис. 22Б). Доля CD86-экспрессирующих клеток была значительно повышена в HLA-DR-позитивной субпопуляции при всех используемых вариантах стимуляции. Полученные результаты свидетельствуют о приобретении HLA-DR⁺ НК-клетками, полученными при стимуляции *in vitro*, дополнительных ко-стимулирующих молекул, необходимых для потенциальной реализации антигенпрезентации. Это согласуется с уже имеющимися работами по особенностям фенотипа HLA-DR-позитивных НК-клеток: показано, что при активации цитокинами экспрессия HLA-DR на НК-клетках может сопровождаться повышенной экспрессией CD80/86, B7-H3 – молекул, играющих важную роль во взаимодействии с Т-клетками и антигенпрезентации [Delso-Vallejo и др., 2017; Loyon и др., 2016; Senju и др., 2018].

На основании полученных данных можно заключить, что HLA-DR-экспрессирующие НК-клетки, полученные после стимуляции *in vitro* – это клетки преимущественно менее дифференцированные, которые характеризуются состоянием повышенной активации. Они демонстрируют более высокий, нежели HLA-DR-негативные НК-клетки, уровень экспрессии активирующего рецептора NKG2D, более интенсивную и быструю дегрануляцию по отношению к фидерным клеткам, и экспрессируют CD86 – молекулу, необходимую для антиген-презентации.

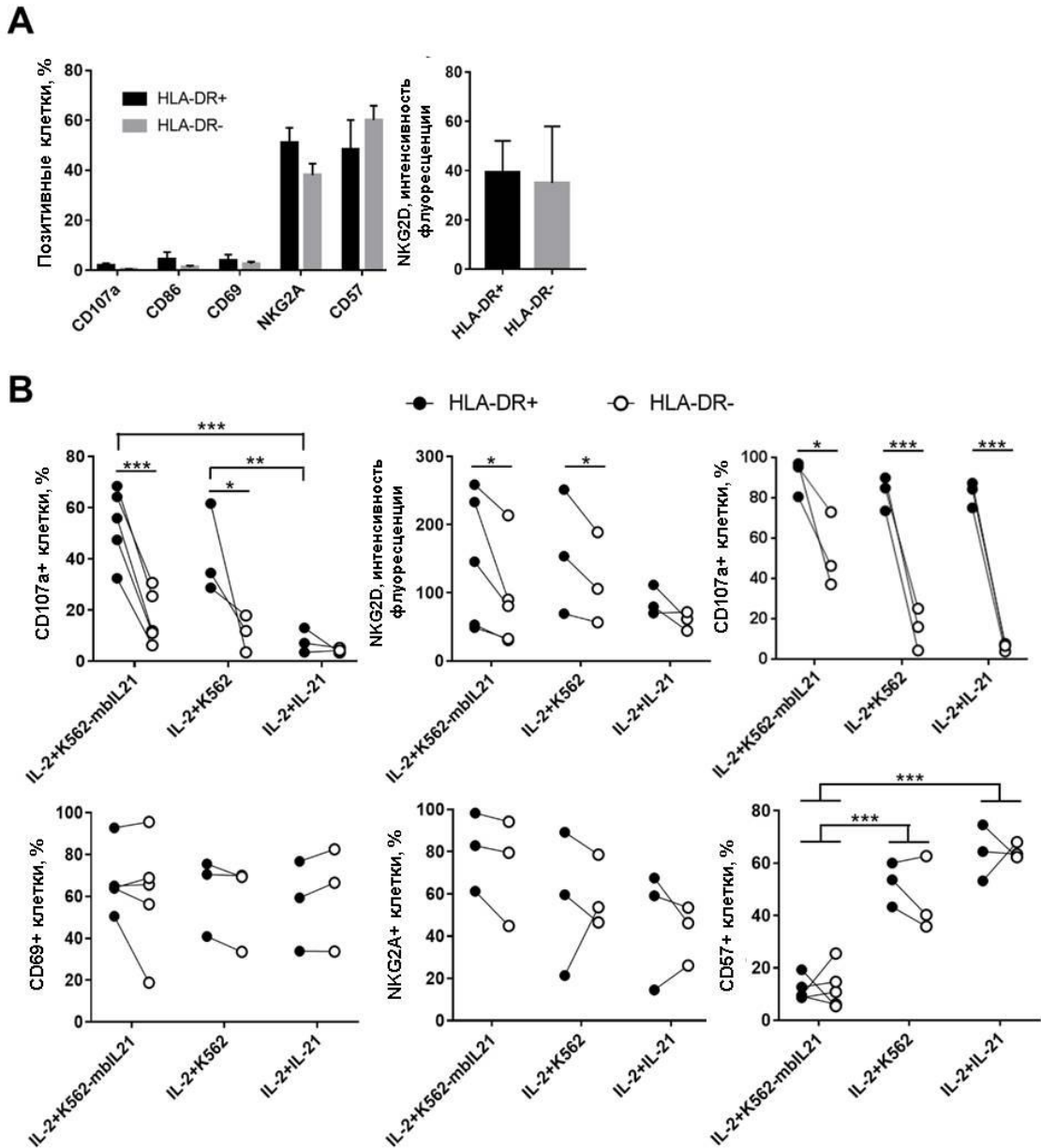


Рис. 22. Экспрессия ряда поверхностных маркеров на HLA-DR-позитивных и HLA-DR-негативных NK-клетках. (А) Процент клеток, экспрессирующих CD107a, CD86, CD69, CD57, NKG2A, и интенсивность экспрессии NKG2D, измеренные в день 0. Представлены средние значения \pm SEM минимум трех независимых экспериментов. (Б) Процент клеток, экспрессирующих CD107a, CD86, CD69, CD57, NKG2A, и интенсивность экспрессии NKG2D, измеренные после 3- или 6-дневной стимуляции IL-2+K562-mbIL21, IL-2+K562 или IL-2+IL-21. Статистическую достоверность различий между NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ в одном образце оценивали с помощью парного t-теста. Статистическую достоверность различий между образцами с разными типами стимуляции оценивали с помощью метода двухсторонних многократных сравнений ANOVA.

3.11. Функциональная активность HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток, полученных *in vitro*

Помимо характеристики свежевыделенных HLA-DR-экспрессирующих НК-клеток, был проведен ряд экспериментов по изучению функциональных свойств НК-клеток HLA-DR⁺, полученных *in vitro* в результате стимуляции, а также проведено сравнения между этими двумя группами клеток. Стимулированные в течение 4 дней IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 НК-клетки сортировали на субпопуляции HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ (рис. 4Б) и оценивали их функциональную активность: продукцию IFN γ и цитотоксичность. Также была проанализирована продукция IFN γ в клонах НК-клеток.

HLA-DR-позитивные НК-клетки демонстрировали более высокую продукцию IFN γ , нежели клетки HLA-DR⁻, после рестимуляции IL-2 или IL-12+IL-15. Интенсивность ответа варьировала у разных доноров (рис. 23А, Б). В дополнение к внутриклеточному окрашиванию, концентрацию IFN γ в супернатантах из тех же образцов измеряли методом ИФА. Суммарные результаты внутри- и внеклеточного анализа показали, что HLA-DR-позитивные НК-клетки лучше продуцируют IFN γ , чем HLA-DR-негативные, у всех обследованных доноров. При стимуляции НК-клеток через рецептор CD16 с использованием клеток C1R и антитела к CD20 (ритуксимаб) обе субпопуляции демонстрировали очень низкую продукцию IFN γ (рис. 23А, Б).

При анализе IFN γ -продуцирующей активности клонов НК-клеток, полученных в условиях стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21, было выявлено, что все клональные популяции НК-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. 23В). В другой серии экспериментов, при стимуляции НК-клеток IL-2 \pm LPS, было показано, что

количество произведенного $IFN\gamma$ увеличивается при добавлении к предварительно отсортированным $HLA-DR^-$ НК-клеткам примеси клеток $HLA-DR^+$, в дозозависимой манере (рис. 23Г). Таким образом, чем больше в культуре $HLA-DR$ -позитивных клеток и чем выше они экспрессируют $HLA-DR$, тем более активно НК-клетки отвечают на стимуляцию цитокинами, продуцируя $IFN\gamma$.

По результатам оценки естественной цитотоксической активности, у трех доноров из четырех НК-клетки $HLA-DR^+$ лизировали больше клеток-мишеней, чем клетки $HLA-DR^-$ (рис. 23Д, Е). Причиной небольшой разницы в уровне цитотоксичности между клетками $HLA-DR^+$ и $HLA-DR^-$ у некоторых доноров могло быть истощение пула гранзима В в $HLA-DR$ -позитивных НК-клетках после 6 дней инкубации с фидерными клетками K562-mbIL21, т.к. они также являются клетками-мишенями.

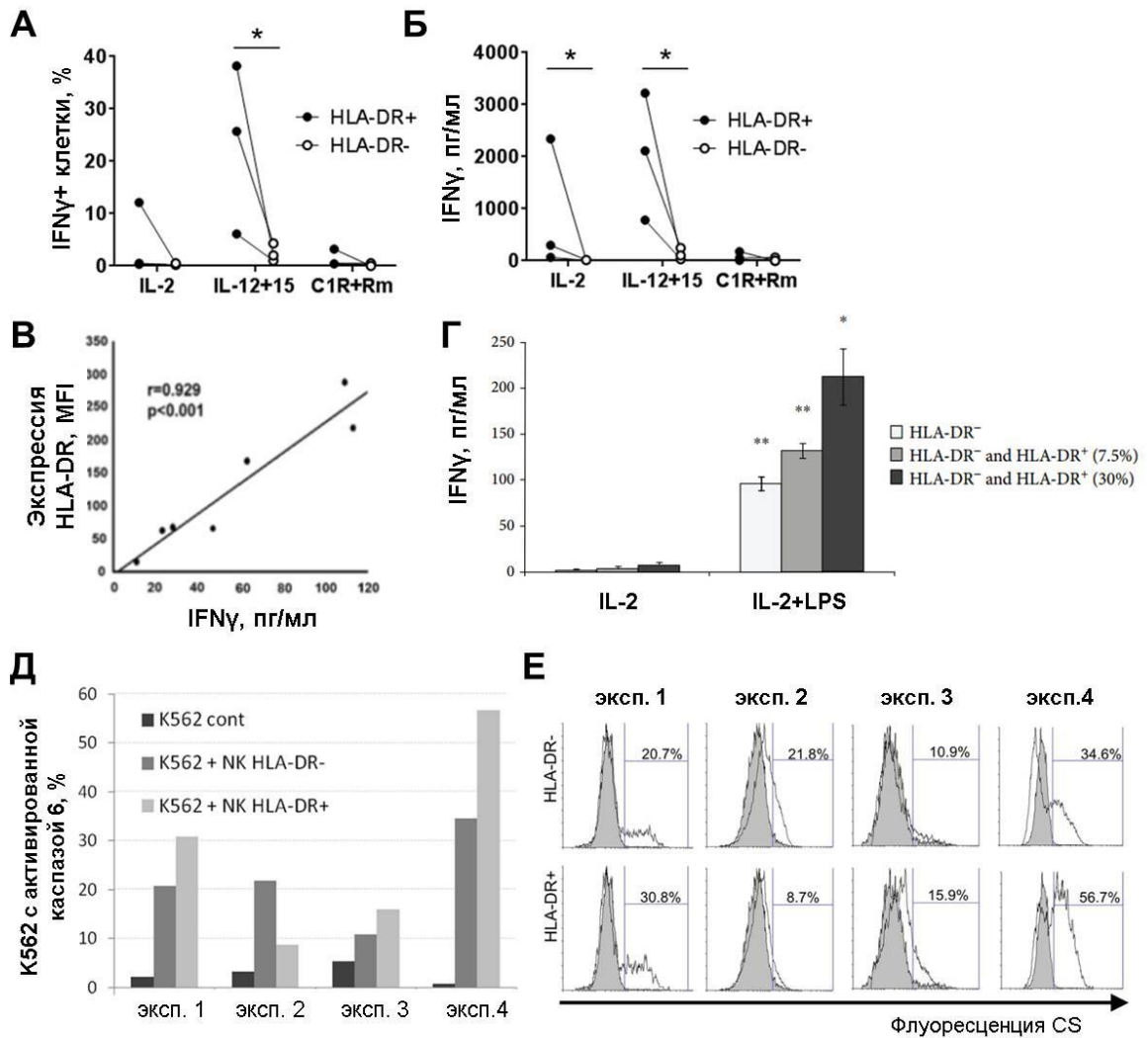


Рис. 23. Продукция $IFN\gamma$ и цитотоксическая активность $HLA-DR$ -позитивных и $HLA-DR$ -негативных NK -клеток, полученных после стимуляции *in vitro*. (А, Б) NK -клетки, отсортированные после 4 дней стимуляции $IL-2$ и $K562-mbIL21$, культивировали в течение 24 часов без стимула и затем повторно ре-стимулировали $IL-2$, $IL-15+IL-12$ или клетками $C1R$ с антителами против $CD20$. Продукцию $IFN\gamma$ измеряли путем внутриклеточного окрашивания (А) и ИФА (Б). Представлены данные трех независимых экспериментов, клетки от одного донора соединены линией. (В) Корреляционная зависимость между экспрессией $HLA-DR$ и продукцией $IFN\gamma$ в клонах NK -клеток, полученных при стимуляции $IL-2+K562-mbIL21$. (Г) Продукция $IFN\gamma$ NK -клетками, стимулированными $IL-2\pm LPS$, в зависимости от доли $HLA-DR^+$ клеток в культуре. Представлены данные одного репрезентативного эксперимента из трех, среднее $\pm SD$ трех повторностей. (Д-Е) Цитотоксическая активность NK -клеток $HLA-DR^+$ и $HLA-DR^-$, измеренная по флуоресценции субстрата каспазы 6 (CS) в клетках-мишенях K562. Представлены данные четырех независимых экспериментов. (Е) Контрольный образец (без эфффекторов) – серая гистограмма, экспериментальный образец – белая гистограмма. Статистическую

достоверность различий в (А), (Б) и (Г) оценивали с помощью парного t-теста.

Таким образом, HLA-DR-позитивные НК-клетки, полученные в результате стимуляции IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 как в общей культуре, так и в клональных культурах, демонстрируют более высокую функциональную активность в ответ на ре-стимуляцию цитокинами, в первую очередь, более интенсивную продукцию IFN γ , по сравнению с HLA-DR-негативными НК-клетками. Кроме того, уровень продукции IFN γ напрямую связан с уровнем экспрессии HLA-DR. В похожей работе [Evans и др., 2011] НК-клетки стимулировали в течение 6 дней IL-2, затем измеряли интенсивность дегрануляции в присутствии клеток линии K562 по экспрессии маркера CD107a, а также внутриклеточную продукцию IFN γ . HLA-DR-позитивные НК-клетки также проявляли более интенсивную дегрануляцию, что соотносится с нашими данными, однако ни в присутствии клеток K562, ни даже в присутствии PMA/иономицина не демонстрировали более высокую, нежели клетки HLA-DR $^-$, продукцию IFN γ . В то же время, в последующих экспериментах было показано, что у доноров, отвечающих на стимуляцию BCG интенсивной продукцией IFN γ , доля НК-клеток HLA-DR $^+$ была значительно выше [Evans и др., 2011]. В данной работе с помощью двух методов показано, что HLA-DR-позитивные НК-клетки, полученные при культивировании с IL-2 и K562-mbIL21, продуцируют и секретируют IFN γ на существенно более высоком уровне, нежели HLA-DR-негативные клетки. Это хорошо соотносится с литературными данными о том, что стимуляция IL-21, как растворимым, так и мембраносвязанным, не только усиливает киллерную активность НК-клеток, но и способствует увеличению продукции различных цитокинов, в том числе IFN γ [Denman и др., 2012; Park и др., 2012]. Вероятно, HLA-DR-позитивные НК-клетки отвечают на данный цитокин лучше, чем HLA-DR-негативные.

По сравнению с циркулирующими в крови HLA-DR-позитивными НК-клетками, НК-клетки HLA-DR $^+$, полученные в культуре при стимуляции IL-2

и K562-mbIL21, демонстрируют сходную способность к более интенсивной продукции IFN γ в ответ на цитокины, однако, помимо этого, еще характеризуются более интенсивным цитотоксическим ответом на фидерные клетки и, в большинстве экспериментов, на новые клетки-мишени после рестимуляции. В то же время, полученные *in vitro* HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки не отвечают на антитело-опосредованную стимуляцию. Данный результат был ожидаем, так как, в соответствии с разделом 1.9, при стимуляции IL-2 и K562-mbIL21 в основном выживают и размножаются NK-клетки на более ранних стадиях дифференцировки с фенотипом CD57⁻NKG2A⁺ (рис. 22), тогда как высокая отвечаемость на стимуляцию через Fc-рецептор характерна для более дифференцированных NK-клеток, а том числе «адаптивных». Тем не менее, хорошая продукция IFN γ и потенциальный естественный цитотоксический ответ (при задействовании соответствующих активирующих рецепторов) делают субпопуляцию HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток перспективной для использования в клеточной адоптивной терапии.

3.12. Энергетический метаболизм HLA-DR-экспрессирующих NK-клеток, свежевыделенных и полученных *in vitro*

Для сравнения энергетического метаболизма HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ NK-клеток был проведен анализ содержания АТФ и объема митохондриальной массы в данных субпопуляциях, свежевыделенных и полученных после предварительной стимуляции *in vitro*. Согласно данным, полученным *ex vivo*, объем митохондриальной массы у HLA-DR-позитивных NK-клеток был выше, чем у HLA-DR-негативных (рис. 24А), что свидетельствует об интенсивной метаболической активности циркулирующих HLA-DR⁺ NK-клеток. При стимуляции IL-2 либо комбинацией IL-2 и растворимого IL-21 уровень митохондриальной массы снижался в обеих субпопуляциях и выравнивался между ними (рис. 24А). Вероятнее всего, это объясняется тем, что, поскольку данные цитокины стимулируют пролиферацию NK-клеток, при делении

количество митохондрий в каждой дочерней клетке снижается, а в HLA-DR-позитивных клетках их количество снижается сильнее, так как они пролиферируют интенсивнее (см. раздел 3.7.2). При стимуляции NK-клеток IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL21 уровень митохондриальной массы оставался на прежнем уровне по сравнению с образцами *ex vivo*, и также был увеличен в субпопуляции HLA-DR⁺, по сравнению с HLA-DR⁻ (рис. 24А). По-видимому, данный способ активации не только запускает интенсивную экспансию NK-клеток, но и способствует более интенсивному биосинтезу, что позволяет клеткам сохранять количество митохондрий на прежнем уровне даже после активной пролиферации.

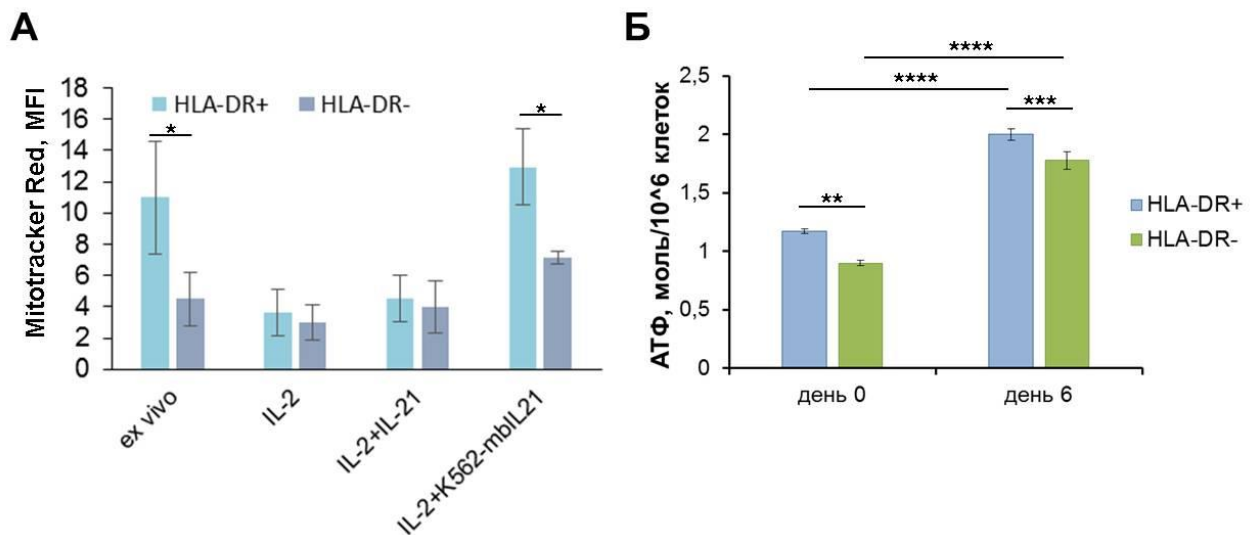


Рис. 24. Сравнение метаболической активности HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ NK-клеток. (А) Объем митохондриальной массы и (Б) содержание АТФ в HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ субпопуляциях непосредственно после выделения и через 6 дней культивирования с указанными стимулами. (А) Представлены результаты трех независимых экспериментов (среднее±SD), статистическую достоверность оценивали с помощью парного t-теста. (Б) Представлены результаты репрезентативного эксперимента (среднее пяти повторностей ±SD), статистическую достоверность оценивали с помощью непарного t-теста.

Для сравнения количества АТФ в HLA-DR-позитивных и негативных NK-клетках, свежевыделенные и инкубированные в течение 6 дней в

присутствии IL-2 и IL-21 NK-клетки сортировали на субпопуляции HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻, затем обрабатывали лизирующим агентом и измеряли содержание АТФ методом билюминесценции. Согласно полученным данным, продукция АТФ в HLA-DR-позитивных NK-клетках достоверно выше, чем в HLA-DR-негативных как непосредственно после выделения, так и после 6 дней культивирования с IL-2+IL-21 (рис. 24Б). Кроме того, продукция АТФ в обеих субпопуляциях увеличивалась на 6-й день активации по сравнению с продукцией *ex vivo*.

Высокий уровень продукции АТФ и увеличенный объем митохондриальной массы характерны для активированных NK-клеток [O'Brien, Finlay, 2019]. Данная метаболическая перестройка позволяет NK-клеткам запускать полноценный функциональный ответ: продукцию IFN γ и реализацию цитотоксической активности [O'Brien, Finlay, 2019; Gardiner, Finlay, 2017]. Таким образом, фракция HLA-DR-позитивных NK-клеток, демонстрирующая более высокий уровень энергетического метаболизма по сравнению с клетками HLA-DR⁻ как *ex vivo*, так и после стимуляции в культуре, более «подготовлена» к реализации своего функционального потенциала.

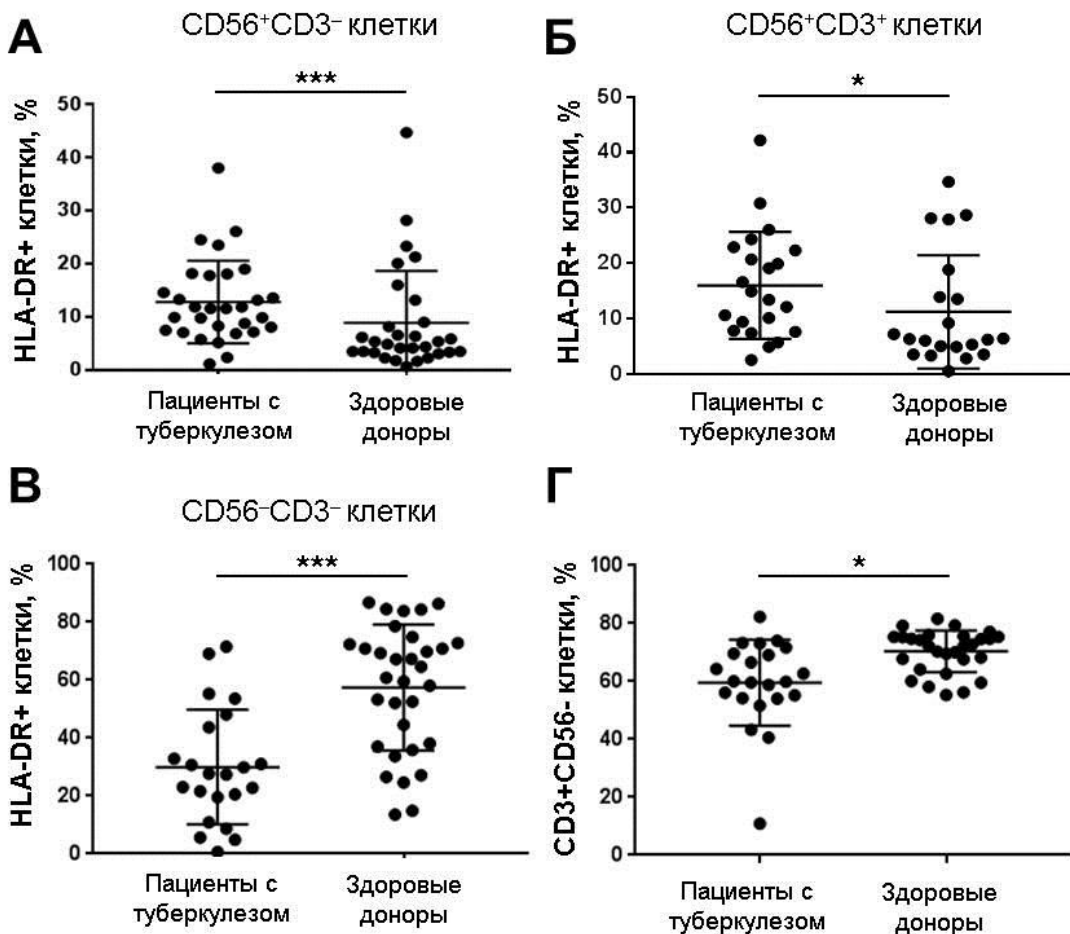
3.13. HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки в иммунном ответе против *M. tuberculosis*

3.13.1. HLA-DR-позитивные NK-клетки в крови пациентов, больных туберкулезом

Для изучения физиологической значимости HLA-DR-позитивных NK-клеток *in vivo* в условиях инфицирования туберкулезом, в первую очередь, было проведено сравнение экспрессии HLA-DR в субпопуляциях лимфоцитов, выделенных из крови больных туберкулезом и здоровых добровольцев. Доля HLA-DR-экспрессирующих клеток среди всех NK-клеток (CD56⁺CD3⁻, рис.

25А), а также NKT-подобных клеток ($CD56^+CD3^+$, рис. 25Б) в среднем у больных туберкулезом оказалась достоверно выше, чем у здоровых доноров. Согласно литературным данным, подобная ситуация наблюдается также в тканях инфицированных легких [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005]. При этом, в когорте здоровых доноров, у некоторых людей также был отмечен высокий уровень $HLA-DR^+$ клеток как в популяции $CD56^+CD3^-$, так и в популяции $CD56^+CD3^+$ (рис. 25А, Б). Это может быть связано с развитием активной фазы иммунного ответа против других патогенов, в том числе латентных, как это показано для адаптивных HCMV-ассоциированных NK-клеток [Costa-García и др., 2019].

Рис. 25. Анализ доли $HLA-DR^+$ клеток в популяциях NK-клеток (А), NKT-подобных



клеток (Б) и во фракции $CD3^-CD56^-$ клеток (В) и сравнение доли $CD3^+CD56^-$ T-клеток (Г) в крови здоровых доноров и пациентов с первично диагностированным туберкулезом.

По нашим данным, 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. 25В) и сниженная доля Т-клеток CD3⁺CD56⁻ (рис. 25Г), что в целом указывает на угнетенное состояние адаптивной иммунной системы. Можно предположить, что в данных условиях HLA-DR-позитивные NK-клетки будут играть важную роль при развитии иммунного ответа против *M. tuberculosis*, в том числе, возможно, компенсируя недостатки адаптивного звена. На основании этих данных в последующих экспериментах было принято решение использовать разрушенные ультразвуком *M. tuberculosis* (соникат) в качестве модельной смеси антигенов для исследования функционального ответа HLA-DR-позитивных NK-клеток на присутствие микобактерий.

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

Для оценки функционального ответа HLA-DR-позитивных и негативных NK-клеток на *M. tuberculosis* была измерена продукция IFN γ в клетках после стимуляции соникатом микобактерий. Эксперименты проводились в культуре PBMC от здоровых добровольцев и пациентов с туберкулезом и в культуре изолированных NK-клеток от здоровых добровольцев.

Как у здоровых, так и у больных туберкулезом доноров, в культуре PBMC HLA-DR-позитивные NK-клетки демонстрировали более интенсивную продукцию IFN γ в ответ на 24-часовую стимуляцию соникатом, по сравнению с HLA-DR-негативными NK-клетками (рис. 26А). Как было показано выше, у больных туберкулезом выше процентное содержание в периферической крови субпопуляции HLA-DR-позитивных NK-клеток; также, по литературным данным, данная субпопуляция увеличена в инфицированных легких [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005]. Учитывая существенно сниженное содержание Т-клеток CD3⁺CD56⁻ среди PBMC у обследованных нами доноров,

НК-клетки HLA-DR⁺ могут быть важны при иммунном ответе на туберкулезную инфекцию как продуценты IFN γ . Показано, что интерфероновый ответ НК-клеток может быть важен в случае недостатков или нарушения в функционировании адаптивного звена иммунного ответа против *M. tuberculosis*, в частности, специфичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [Allen и др., 2015; Feng и др., 2006]. IFN γ , выделяемый НК-клетками, может стимулировать множество эффекторных механизмов в макрофагах, в том числе выработку активных форм кислорода и азота, увеличение экспрессии Fc γ RI рецептора для более эффективного распознавания и фагоцитоза опсонизированных клеток [Kuwano и др., 2006; Schroder и др., 2004].

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 (рис. 26В). При более низких концентрациях эффекта на продукцию IFN γ отмечено не было. Также в присутствие сониката у всех НК-клеток снижалась естественная цитотоксическая активность (рис. 26Б). В целом, можно заключить, что в отсутствие клеточного микроокружения (PBMC) функционирование и жизнедеятельность как HLA-DR⁺, так и HLA-DR⁻ НК-клеток существенно подавляется продуктами разрушенных микобактерий.

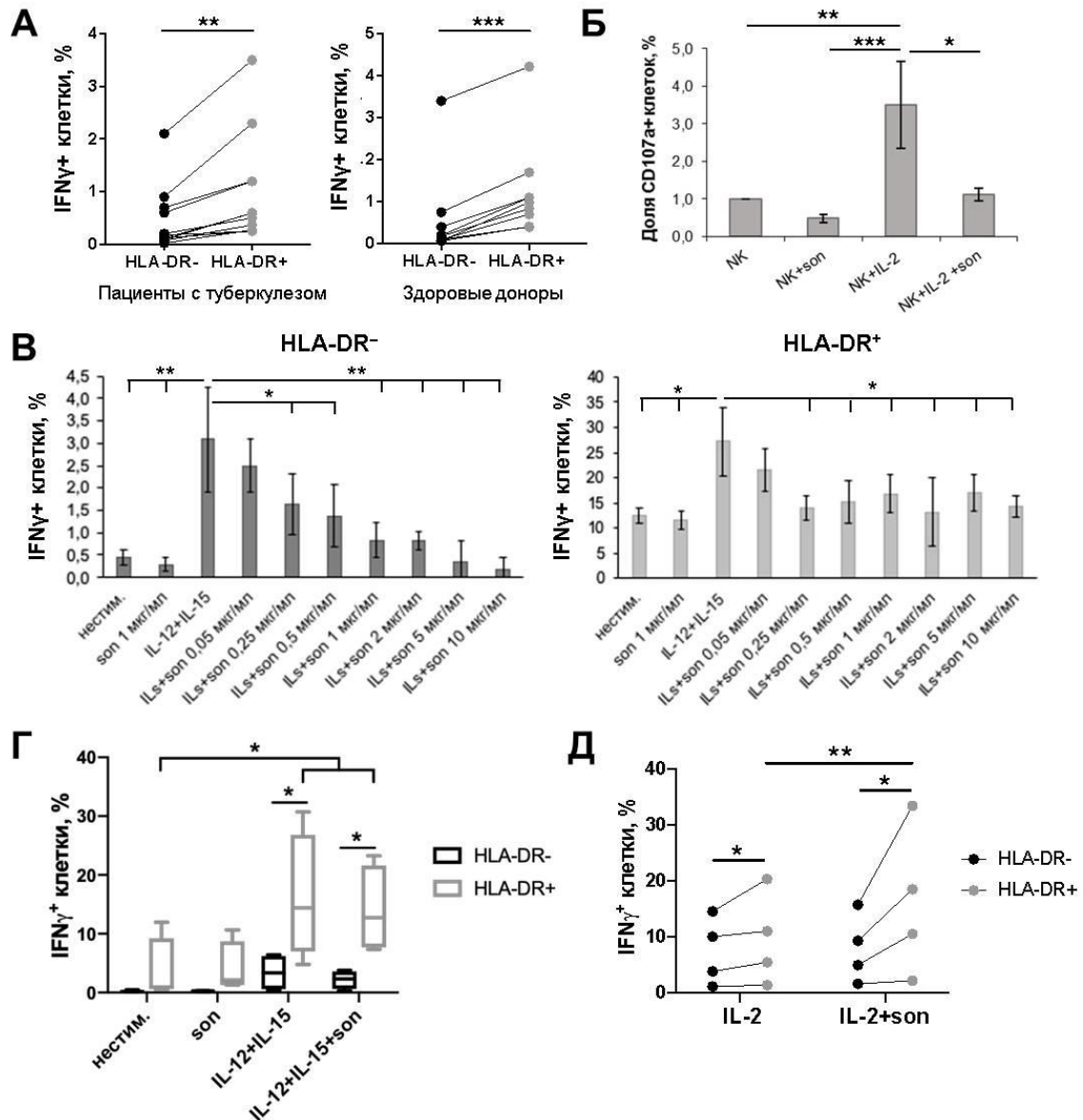


Рис. 26. Функциональный ответ NK-клеток на стимуляцию соникатом *M. tuberculosis*. (А) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ в культуре PBMC пациентов с туберкулезом ($n=9$) и здоровых доноров ($n=8$) в ответ на 24-часовую стимуляцию соникатом. (Б) Цитотоксическая активность NK-клеток по отношению к клеткам K562 после 24 ч стимуляции IL-2 и соникатом. Представлены суммарные данные трех экспериментов (среднее \pm SEM). (В) Продукция IFN γ NK-клетками после 24 ч инкубации с IL-12+IL-15 и указанными концентрациями сониката, в субпопуляциях HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻. Приведены суммарные данные четырех независимых экспериментов (среднее \pm SEM). (Г) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с IL-2+IL-15 и ре-стимуляции IL-12+IL-15 и соникатом. Приведены суммарные данные четырех независимых экспериментов: медиана, 10-90% перцентиль и разброс (Д) Продукция IFN γ NK-клетками HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ после 6 дней инкубации с IL-2+соникат и ре-стимуляции IL-12+IL-15 в течение 20 ч. Приведены суммарные данные четырех независимых экспериментов. (А-Д) Статистическую достоверность оценивали с помощью парного *t*-теста.

В другой серии экспериментов изолированные НК-клетки вначале активировали с IL-2+IL-21 в течение 7 дней, а затем ре-стимулировали соникатом *M. tuberculosis* и IL-12+IL-15. После такой предварительной активации HLA-DR-экспрессирующие НК-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. 26Г).

Также были проведены эксперименты по длительной (в течение 7 дней) инкубации НК-клеток с соникатом *M. tuberculosis* и IL-2, либо только с IL-2 в контрольном образце. По истечению этого срока клетки отмывали и после периода покоя рестимулировали IL-12+IL-15 для оценки способности продуцировать IFN γ . Было выявлено, что, во-первых, HLA-DR-позитивные НК-клетки после длительного контакта с разрушенными микобактериями интенсивнее отвечают на рестимуляцию цитокинами путем продукции интерферона, чем клетки, культивировавшиеся без сониката; во-вторых, среди HLA-DR⁺ НК-клеток было больше IFN γ -продуцирующих, чем среди клеток HLA-DR⁻ как в экспериментальном, так и в контрольном образце (рис. 26Д).

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 (вероятнее всего, 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.

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

В процессе длительной семидневной стимуляции NK-клеток соникатом микобактерий был выявлен ряд изменений в фенотипе клеток. На 7-й день было зарегистрировано увеличение доли HLA-DR-позитивных NK-клеток, по сравнению с образцом только с IL-2, в соответствие с увеличением концентрации сониката от 0,25 до 2 мкг/мл (рис. 27А). Анализ снижения флуоресценции ядерного красителя CFSE показал, что в ответ на соникат преимущественно пролиферировали именно клетки HLA-DR⁺ (рис. 27Б). При этом, в субпопуляции HLA-DR-позитивных 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. 27В). 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. Показано, что рецептор NKp46 способен распознавать зараженных *M. tuberculosis* макрофагов [Esin и др., 2013; Esin, Batoni, 2015]. Менее зрелый фенотип размножившихся в ответ на соникат HLA-DR⁺ NK-клеток дает возможность данной субпопуляции активно пролиферировать в ответ на дальнейшую стимуляцию. Следовательно, NK-клетки с описанным выше фенотипом могут быть эффективны в иммунном ответе против *M. tuberculosis*.

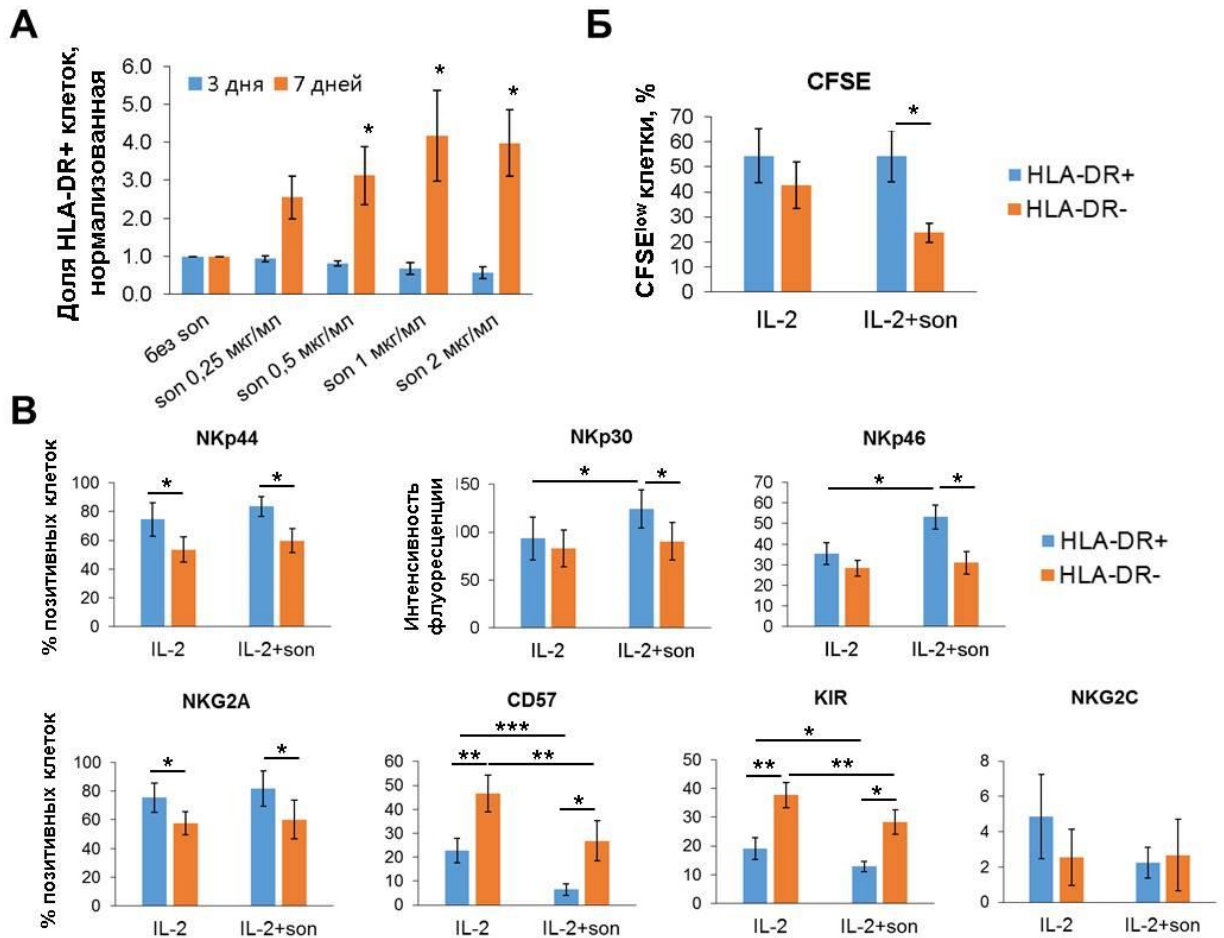


Рис. 27. Фенотипические изменения при культивировании NK-клеток с соникатом *M. tuberculosis*. (А) Изменение процентного содержания HLA-DR-позитивных NK-клеток через 3 и 6 дней инкубации с IL-2 и соникатом в указанных концентрациях. Представлены суммарные данные трех независимых экспериментов (среднее±SD). Статистическую достоверность различий по сравнению с образцом без сониката оценивали с помощью парного *t*-теста. (Б) Анализ пролиферативной активности NK-клеток HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ при стимуляции IL-2 и соникатом. (В) Экспрессия указанных поверхностных маркеров на HLA-DR⁺ и HLA-DR⁻ NK-клетках после 6 дней стимуляции IL-2 и соникатом. (Б-В) Представлены суммарные данные пяти независимых экспериментов (среднее±SD). Статистическую достоверность различий оценивали с помощью парного *t*-теста.

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

В серии экспериментов 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. Через 20 ч активацию Т-клеток оценивали по внутриклеточному уровню IFN γ и TNF. NK-клетки, контактировавшие с разрушенными микобактериями (NKmtb), но не контрольные NK-клетки индуцировали статистически значимое увеличение продукции цитокинов в CD4⁺ Т-клетках (рис. 28). 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 [Latorge и др., 2019; Suni, Picker, Maino, 1998]. При этом, как в образцах Т+DC, так и в образцах Т+NKmtb добавление блокирующего антитела к HLA-DR приводило к снижению продукции обоих цитокинов в Т-клетках.

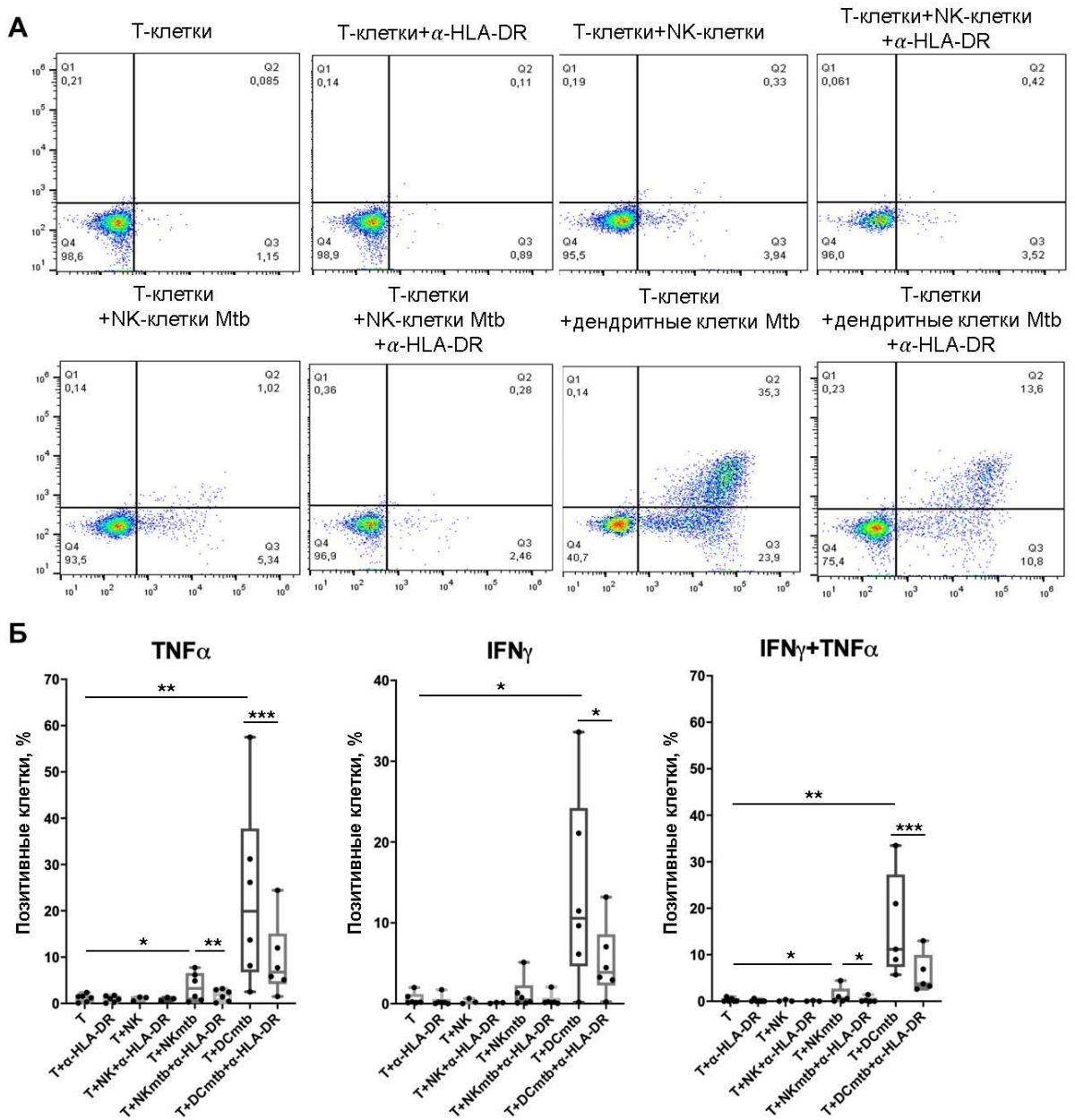


Рис. 28. Антиген-специфическая активация $CD4^+$ T-клеток. (А-Б) Продукция $IFN\gamma$ и TNF T-клетками, измеренная после 20 ч инкубации с антителом против HLA-DR (α -HLA-DR), NK-клетками, пред-инкубированными и не пред-инкубированными с соникатом *M. tuberculosis* (NK и NKmtb), и дендритными клетками, пред-инкубированными с соникатом *M. tuberculosis* (DCmtb) в указанных комбинациях. (А) Цитометрические данные одного репрезентативного донора. (Б) Суммарные данные по шести независимым экспериментам, показана медиана, 10-90% перцентиль и суммарный разброс. Статистическую достоверность оценивали с помощью парного *t*-теста.

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 результаты дополняют уже опубликованные данные, описывающие специфическую активацию Т-клеток НК-клетками, предварительно инкубированными с различными антигенами: столбнячным токсином и аллергеном домашнего пылевого клеща Der pI [Roncarolo и др., 1991], частицами HSV и его гликопротеинами [Kim и др., 2012], частицами HCMV и комплексами HCMV-антитело [Costa-García и др., 2019]. Способность НК-клеток к презентации поглощенных антигенов может реализовываться при развитии локального иммунного ответа в тканях и иммунокомпетентных органах – высокое процентное содержание HLA-DR-позитивных НК-клеток отмечается в лимфоузлах, печени, селезенке [Burt и др., 2009; Mizrahi и др., 2007], а также в легких пациентов с туберкулезом [Pokkali, Das, Selvaraj, 2009; Schierloh и др., 2005]. Данный процесс может быть особенно важен при вторичном иммунном ответе (в том числе на латентных патогенов, таких как HCMV и купированные *M. tuberculosis*), так как позволяет запустить развитие иммунной реакции сразу после распознавания и поглощения патогена или его частей НК-клетками и не требует ко-стимуляции от других иммунных клеток, дополняя таким образом функционал дендритных клеток и моноцитов. Учитывая интерферон-продуцирующую активность и фенотипические перестройки HLA-DR-экспрессирующей фракции НК-клеток в ответ на взаимодействие с разрушенными *M. tuberculosis*, а также способность к антигенпрезентации, предварительно активированные *in vitro* НК-клетки HLA-DR⁺ могут быть рассмотрены как потенциальные агенты для противотуберкулезной клеточной терапии.

Глава 4. Заключение

Полученные результаты позволяют заключить, что HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки могут обладать различающимися характеристиками в зависимости от того, когда возникла экспрессия HLA-DR. На клетках CD56^{bright} *ex vivo* экспрессия HLA-DR может быть частью программы дифференцировки, тогда как на клетках CD56^{dim} это действительно маркер функциональной активации. Активированные HLA-DR-позитивные NK-клетки могут длительно персистировать в организме, в том числе переходя в пул адаптивных NK-клеток. *In vitro* при различных методах стимуляции экспрессия HLA-DR также появляется на наиболее активных NK-клетках, как в плане пролиферативной активности, так и продукции IFN γ , цитотоксического эффекта и экспрессии ряда активирующих рецепторов и ко-стимуляторных молекул. За счет этих свойств, а также поскольку HLA-DR-позитивные NK-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. Интересно, что индукция экспрессии HLA-DR в NK-клетках обеспечивается в том числе эндогенным IFN γ , создающим петлю положительной обратной связи, что, вероятно, необходимо для поддержания активированного состояния NK-клеток длительное время.

Проведенные исследования подтверждают существенную роль HLA-DR⁺ NK-клеток в иммунном ответе. На примере инфекции *M. tuberculosis* продемонстрировано, что HLA-DR-экспрессирующие NK-клетки могут являться важным источником IFN γ . При этом, у данной субпопуляции устойчивость к ингибирующему воздействию на функциональную активность продуктов микобактерий выше, чем у клеток HLA-DR⁻. Помимо продукции цитокинов, NK-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 активации CD4⁺ Т-клеток после предварительной инкубации с антигенами *M. tuberculosis*.

По результатам проведенной работы можно сформулировать следующие 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 СПТА.
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 литературы

1. Abel A.M. и др. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization // *Front. Immunol.* 2018. Т. 9. № AUG. С. 1.
2. Allen M. и др. Mechanisms of Control of Mycobacterium tuberculosis by NK Cells: Role of Glutathione. // *Front. Immunol.* 2015. Т. 6. С. 508.
3. Antonioli C.M., Airò P. Dermatomyositis associated with lymphoproliferative disorder of NK cells and occult small cell lung carcinoma // *Clin. Rheumatol.* 2004. Т. 23. № 3. С. 239–241.
4. Aranami T., Miyake S., Yamamura T. Differential Expression of CD11c by Peripheral Blood NK Cells Reflects Temporal Activity of Multiple Sclerosis // *J. Immunol.* 2006. Т. 177. № 8. С. 5659–5667.
5. Azeredo E.L. и др. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease // *Clin. Exp. Immunol.* 2006. Т. 143. № 2. С. 345–356.
6. Baessler T. и др. CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells // *Blood.* 2010. Т. 115. № 15. С. 3058–3069.
7. Bakker A.B.H. и др. NK cell activation: Distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals // *Hum. Immunol.* 2000. Т. 61. № 1. С. 18–27.
8. Bancroft G.J. The role of natural killer cells in innate resistance to infection // *Curr. Opin. Immunol.* 1993. Т. 5. № 4. С. 503–510.
9. Batoni G. и др. Human CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. // *Scand. J. Immunol.* 2005. Т. 62. № 6. С. 498–506.
10. Bauer S. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA // *Science (80-.).* 1999. Т. 285. № 5428. С. 727–729.

11. Becker P.S.A. и др. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell - based immunotherapy // *Cancer Immunol. Immunother.* 2016. Т. 65. № 4. С. 477–484.
12. Benlahrech A. и др. Human NK cell up-regulation of CD69, HLA-DR, interferon γ secretion and cytotoxic activity by plasmacytoid dendritic cells is regulated through overlapping but different pathways // *Sensors.* 2009. Т. 9. № 1. С. 386–403.
13. Beziat V. и др. Fully functional NK cells after unrelated cord blood transplantation. // *Leukemia.* 2009. Т. 23. № 4. С. 721–8.
14. Béziat V. и др. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. // *PLoS One.* 2010. Т. 5. № 8. С. e11966.
15. 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. 3853–64.
16. Björkström N.K. и др. Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. // *J. Exp. Med.* 2011. Т. 208. № 1. С. 13–21.
17. Björkström N.K., Ljunggren H.-G., Sandberg J.K. CD56 negative NK cells: origin, function, and role in chronic viral disease. // *Trends Immunol.* 2010. Т. 31. № 11. С. 401–406.
18. Borrego F. и др. Recognition of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-E Complexed with HLA Class I Signal Sequence-derived Peptides by CD94/NKG2 Confers Protection from Natural Killer Cell-mediated Lysis // *J. Exp. Med.* 1998. Т. 187. № 5. С. 813–818.
19. Braud V.M. и др. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. // *Nature.* 1998. Т. 391. № 6669. С. 795–9.
20. Brill K.J. и др. Human natural killer cells mediate killing of intracellular

Mycobacterium tuberculosis H37Rv via granule-independent mechanisms. // *Infect. Immun.* 2001. Т. 69. № 3. С. 1755–65.

21. Brodin P., Kärre K., Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. // *Trends Immunol.* 2009. Т. 30. № 4. С. 143–9.

22. Brunetta E. и др. Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection // *AIDS.* 2010. Т. 24. № 1. С. 27–34.

23. Buechele C. и др. 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia // *Eur. J. Immunol.* 2012. Т. 42. № 3. С. 737–748.

24. Burt B.M. и др. Circulating HLA-DR+ natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function // *Hum. Immunol.* 2009. Т. 69. № 8. С. 469–474.

25. Caligiuri M. a. Human natural killer cells. // *Blood.* 2008. Т. 112. № 3. С. 461–9.

26. Carrega P. и др. Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in CD56 bright CD16 - cells and display an impaired capability to kill tumor cells // *Cancer.* 2008. Т. 112. № 4. С. 863–875.

27. Caruso A. и др. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation // *Cytometry.* 1997. Т. 27. № 1. С. 71–76.

28. Cerwenka A., Lanier L.L. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. Т. 16. № 2. С. 112–123.

29. Chan A. и др. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts // *J. Immunol.* 2013.

30. Chiesa M. Della и др. Human Cytomegalovirus Infection Promotes Rapid Maturation of NK Cells Expressing Activating Killer Ig-like Receptor in Patients

Transplanted with NKG2C –/– Umbilical Cord Blood // *J. Immunol.* 2014. T. 192. № 4. С. 1471–1479.

31. Chiesa M. Della и др. Features of Memory-Like and PD-1+ Human NK Cell Subsets // *Front. Immunol.* 2016. T. 7. С. 351.

32. Choreño-Parra J.A. и др. Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulate CXCR6+ Natural Killer Cells // *Front. Immunol.* 2020. T. 11. № September. С. 1–13.

33. Cichocki F. и др. ARID5B regulates metabolic programming in human adaptive NK cells // *J. Exp. Med.* 2018. T. 215. № 9. С. 2379–2395.

34. Cook K.D., Waggoner S.N., Whitmire J.K. NK cells and their ability to modulate T cells during virus infections // *Crit. Rev. Immunol.* 2014. T. 34. № 5. С. 359–388.

35. Cooper M.A. и др. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset // *Blood.* 2001. T. 97. № 10. С. 3146–3151.

36. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets // *Trends Immunol.* 2001. T. 22. № 11. С. 633–640.

37. Cosman D. и др. ULBPs, Novel MHC Class I–Related Molecules, Bind to CMV Glycoprotein UL16 and Stimulate NK Cytotoxicity through the NKG2D Receptor // *Immunity.* 2001. T. 14. № 2. С. 123–133.

38. Costa-Garcia M. и др. Antibody-Mediated Response of NKG2Cbright NK Cells against Human Cytomegalovirus // *J. Immunol.* 2015.

39. 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. T. 10. № APR. С. 1–14.

40. Cruz-Gonzales D.D.J. и др. Analysis of the regulatory function of NK cells from patients with systemic lupus erythematosus // *Clin. Exp. Immunol.* 2018. T.

191. № 3. С. 288–300.

41. Culley F.J. и др. Natural killer cell signal integration balances synapse symmetry and migration. // PLoS Biol. 2009. Т. 7. № 7. С. e1000159.

42. D’Orazio J.A., Stein-Streilein J. Human natural killer (NK) cells present staphylococcal enterotoxin B (SEB) to T lymphocytes // Clin. Exp. Immunol. 1996. Т. 104. № 2. С. 366–373.

43. Delso-Vallejo M. и др. Influence of irradiated peripheral blood mononuclear cells on both ex vivo proliferation of human natural killer cells and change in cellular property // Front. Immunol. 2017. Т. 8. № JUL.

44. 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.

45. Dhiman R. и др. IL-22 produced by human NK cells inhibits growth of Mycobacterium tuberculosis by enhancing phagolysosomal fusion. // J. Immunol. 2009. Т. 183. № 10. С. 6639–45.

46. Dowell A.C. и др. Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56 dim NK cells to a CD56 bright phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12 // Cancer Immunol. Immunother. 2012. Т. 61. № 5. С. 615–628.

47. Dulphy N. и др. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. // J. Immunol. 2008. Т. 181. № 3. С. 2227–37.

48. Dunne J. и др. Selective Expansion and Partial Activation of Human NK Cells and NK Receptor-Positive T Cells by IL-2 and IL-15 // J. Immunol. 2001. Т. 167. № 6. С. 3129–38.

49. Esin S. и др. Functional characterization of human natural killer cells responding to Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guérin. // Immunology.

2004. Т. 112. № 1. С. 143–52.

50. Esin S. и др. Interaction of Mycobacterium tuberculosis cell wall components with the human natural killer cell receptors NKp44 and Toll-like receptor 2. // Scand. J. Immunol. 2013. Т. 77. № 6. С. 460–9.

51. Esin S., Batoni G. Natural killer cells: a coherent model for their functional role in Mycobacterium tuberculosis infection. // J. Innate Immun. 2015. Т. 7. № 1. С. 11–24.

52. Evans J.H. и др. A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG // Eur. J. Immunol. 2011. Т. 41. № 7. С. 1924–1933.

53. Evans R.L. и др. Peripheral human T cells sensitized in mixed leukocyte culture synthesize and express Ia-like antigens // J. Exp. Med. 1978. Т. 148. № 5. С. 1440–1445.

54. Fang F., Xiao W., Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer // Semin. Immunol. 2017. Т. 31. С. 37–54.

55. Farrar M.A., Schreiber R.D. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor // Annu. Rev. Immunol. 1993. Т. 11. № 1. С. 571–611.

56. Fehniger T.A. и др. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. // Blood. 2003. Т. 101. № 8. С. 3052–7.

57. Feng C.G. и др. NK Cell-Derived IFN- γ Differentially Regulates Innate Resistance and Neutrophil Response in T Cell-Deficient Hosts Infected with Mycobacterium tuberculosis // J. Immunol. 2006. Т. 177. № 10. С. 7086–7093.

58. Foley B. и др. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C + natural killer cells with potent function // Blood. 2012. Т. 119. № 11. С. 2665–2674.

59. Freud A.G. и др. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity.

// *Immunity*. 2017. Т. 47. № 5.

60. Fu X. и др. Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO- natural killer cells following stimulation with interleukin-12 // *Immunology*. 2011. Т. 134. № 1. С. 41–49.

61. Fu X. и др. Human memory-like NK cells migrating to tuberculous pleural fluid via IP-10/CXCR3 and SDF-1/CXCR4 axis produce IFN- γ in response to Bacille Calmette Guerin // *Clin. Immunol.* 2013. Т. 148. № 1. С. 113–123.

62. Fu X. и др. Memory-Like Antigen-Specific Human NK Cells from TB Pleural Fluids Produced IL-22 in Response to IL-15 or Mycobacterium tuberculosis Antigens // *PLoS One*. 2016. Т. 11. № 3. С. 1–16.

63. Galea-Lauri J. и др. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. // *J. Immunol.* 1999. Т. 163. № 1. С. 62–70.

64. Gardiner C.M., Finlay D.K. What Fuels Natural Killers? Metabolism and NK Cell Responses // *Front. Immunol.* 2017. Т. 8. С. 367.

65. Garff-Tavernier M. Le и др. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. // *Aging Cell*. 2010. Т. 9. № 4. С. 527–35.

66. Goodier M.R. и др. CMV and natural killer cells: shaping the response to vaccination // *Eur. J. Immunol.* 2018. Т. 48. № 1. С. 50–65.

67. Gough D.J. и др. IFN γ signaling—Does it mean JAK–STAT? // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008. Т. 19. № 5–6. С. 383–394.

68. Grégoire C. и др. The trafficking of natural killer cells. // *Immunol. Rev.* 2007. Т. 220. С. 169–82.

69. Guerra C. и др. Control of Mycobacterium tuberculosis growth by activated natural killer cells. // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. Т. 168. № 1. С. 142–52.

70. Guerra N. и др. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. // *Immunity*. 2008. Т. 28. № 4. С. 571–80.
71. Guma M. и др. Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire // *Blood*. 2004. Т. 104. № 12. С. 3664–3671.
72. Habib T. и др. The Common γ Chain (γc) Is a Required Signaling Component of the IL-21 Receptor and Supports IL-21-Induced Cell Proliferation via JAK3[†] // *Biochemistry*. 2002. Т. 41. № 27. С. 8725–8731.
73. 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.
74. Hanafi L.-A. и др. Fludarabine downregulates indoleamine 2,3-dioxygenase in tumors via a proteasome-mediated degradation mechanism. // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 6. С. e99211.
75. Hansasuta P. и др. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. // *Eur. J. Immunol.* 2004. Т. 34. № 6. С. 1673–9.
76. He X.-S. и др. T cell-dependent production of IFN-gamma by NK cells in response to influenza A virus. // *J. Clin. Invest.* 2004. Т. 114. № 12. С. 1812–9.
77. Held W. и др. The function of natural killer cells: education, reminders and some good memories. // *Curr. Opin. Immunol.* 2011. Т. 23. № 2. С. 228–33.
78. Honda M. и др. Mesothelioma cell proliferation through autocrine activation of PDGF- $\beta\beta$ receptor. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2012. Т. 29. № 5–6. С. 667–74.
79. Horowitz A. и др. Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. // *J. Immunol.* 2010a. Т. 184. № 11. С. 6043–52.
80. Horowitz A. и др. NK cells as effectors of acquired immune responses: effector CD4⁺ T cell-dependent activation of NK cells following vaccination. // *J. Immunol.* 2010b. Т. 185. № 5. С. 2808–18.

81. Ivashkiv L.B. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Т. 18. № 9. С. 545–558.
82. Jamieson A.M. и др. The Role of the NKG2D Immunoreceptor in Immune Cell Activation and Natural Killing // *Immunity.* 2002. Т. 17. № 1. С. 19–29.
83. Janssen R.A.J. и др. HLA-Dr-expressing CD8bright cells are only temporarily present in the circulation during subcutaneous recombinant interleukin-2 therapy in renal cell carcinoma patients // *Cancer Immunol. Immunother.* 1993. № 36. С. 198–204.
84. Jiang B. и др. Expansion of NK cells by engineered K562 cells co-expressing 4-1BBL and mMICA, combined with soluble IL-21 // *Cell. Immunol.* 2014. Т. 290. № 1. С. 10–20.
85. Junqueira-Kipnis A.P. и др. Live Vaccines Have Different NK Cells and Neutrophils Requirements for the Development of a Protective Immune Response Against Tuberculosis // *Front. Immunol.* 2020. Т. 11. № April. С. 1–16.
86. Kawahara M., Hasegawa N., Takaku H. Murine splenic natural killer cells do not develop immunological memory after re-encounter with mycobacterium bovis bcg // *PLoS One.* 2016. Т. 11. № 3. С. 1–13.
87. Keating S.E. и др. Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by CD56 bright NK Cells // *J. Immunol.* 2016. Т. 196. № 6. С. 2552–2560.
88. Kim H. и др. Thyrotropin-Mediated Repression of Class II Trans -Activator Expression in Thyroid Cells: Involvement of STAT3 and Suppressor of Cytokine Signaling // *J. Immunol.* 2003. Т. 171. № 2. С. 616–627.
89. Kim M. и др. Herpes Simplex Virus Antigens Directly Activate NK Cells via TLR2, Thus Facilitating Their Presentation to CD4 T Lymphocytes // *J. Immunol.* 2012. Т. 188. № 9. С. 4158–4170.
90. Kleinnijenhuis J. и др. BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for

- non-specific protection to infection // *Clin. Immunol.* 2014. Т. 155. № 2. С. 213–219.
91. Klingemann H.-G., Martinson J. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications. // *Cytotherapy.* 2004. Т. 6. № 1. С. 15–22.
92. Kobzyeva P.A. и др. CD56dimCD57–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.
93. Kovalenko E. и др. Identification of Human Memory-Like NK Cells // *Curr. Protoc.* 2017. Т. 79. С. 9.50.1-9.50.11.
94. Kovanen P.E., Leonard W.J. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma-c-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways // *Immunol. Rev.* 2004. Т. 202. № 1. С. 67–83.
95. Kuwano Y. и др. Interferon- γ activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells // *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 2006. Т. 290. № 2. С. 433–443.
96. Langers I. и др. Natural killer and dendritic cells collaborate in the immune response induced by the vaccine against uterine cervical cancer // *Eur. J. Immunol.* 2014. Т. 44. № 12. С. 3585–3595.
97. Latorre I. и др. Study of CD27 and CCR4 markers on specific CD4+ T-cells as immune tools for active and latent tuberculosis management // *Front. Immunol.* 2019. Т. 10. № JAN. С. 1–11.
98. 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. 1513–25.
99. Leonard W.J., O’Shea J.J. Jaks and STATs: Biological implications // *Annu. Rev. Immunol.* 1998. Т. 16. № 1. С. 293–322.
100. Li Z.Y. и др. IFN- γ induces aberrant CD49b+ NK cell recruitment through

regulating CX3CL1: A novel mechanism by which IFN- γ provokes pregnancy failure // *Cell Death Dis.* 2014. Т. 5. № 11. С. 1–11.

101. Li Z.Y. и др. IFN- γ modulates Ly-49 receptors on NK cells in IFN- γ -induced pregnancy failure // *Sci. Rep.* 2015. Т. 5. № December. С. 1–8.

102. Lichtfuss G.F. и др. Virologically Suppressed HIV Patients Show Activation of NK Cells and Persistent Innate Immune Activation // *J. Immunol.* 2012a. Т. 189. № 3. С. 1491–1499.

103. Lichtfuss G.F. и др. Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation. // *J. Immunol.* 2012b. Т. 189. № 3. С. 1491–9.

104. Liu L.L. и др. Critical Role of CD2 Co-stimulation in Adaptive Natural Killer Cell Responses Revealed in NKG2C-Deficient Humans // *Cell Rep.* 2016. Т. 15. № 5. С. 1088–1099.

105. Lodoen M.B., Lanier L.L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. // *Curr. Opin. Immunol.* 2006. Т. 18. № 4. С. 391–8.

106. Lodolce J.P. и др. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002. Т. 13. № 6. С. 429–39.

107. London L., Perussia B., Trinchieri G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. // *J. Immunol.* 1986. Т. 137. № 12.

108. 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. 3865–74.

109. 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.

110. 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.* 2016. Т. 197. № 1. С. 85–96.
111. Lucia M.B. и др. Lack of correlation between HLA-DR and CD25 «activation» related antigens on CD16⁺ NK cells in HIV infection. // *Eur. J. Histochem.* 1997. Т. 41 Suppl 2. С. 31–32.
112. Lugli E., Marcenaro E., Mavilio D. NK Cell Subset Redistribution during the Course of Viral Infections // *Front. Immunol.* 2014. Т. 5. С. 390.
113. Luo Z. и др. Increased natural killer cell activation in HIV-infected immunologic non-responders correlates with CD4⁺ T cell recovery after antiretroviral therapy and viral suppression // *PLoS One.* 2017. Т. 12. № 1. С. 1–17.
114. Lusty E. и др. IL-18 / IL-15 / IL-12 synergy induces elevated and prolonged IFN- γ production by ex vivo expanded NK cells which is not due to enhanced STAT4 activation // 2017. Т. 88. № January. С. 138–147.
115. Maghazachi A.A. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2010. Т. 341. С. 37–58.
116. Mah A.Y., Cooper M.A. Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ Production. // *Crit. Rev. Immunol.* 2016. Т. 36. № 2. С. 131–147.
117. Marcenaro E. и др. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. // *Int. Immunol.* 2008. Т. 20. № 9. С. 1155–67.
118. Marcenaro E. и др. Bridging innate NK cell functions with adaptive immunity. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. Т. 780. С. 45–55.
119. Marras F. и др. Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate NKp44 on IL-2 stimulation //

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. T. 110. № 29. С. 11970–11975.

120. Martín-Fontecha A. и др. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming // *Nat. Immunol.* 2004. T. 5. № 12. С. 1260–1265.

121. McKay M.M., Morrison D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK // *Oncogene.* 2007. T. 26. № 22. С. 3113–3121.

122. Michel T. и др. Human CD56bright NK Cells: An Update. // *J. Immunol.* 2016. T. 196. № 7. С. 2923–31.

123. Middleton D., Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes // *Immunology.* 2010. T. 129. № 1. С. 8–19.

124. Milush J.M. и др. CD56negCD16+ NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection // *Retrovirology.* 2013. T. 10. С. 158.

125. Mizrahi S. и др. A phenotypic and functional characterization of NK cells in adenoids // *J. Leukoc. Biol.* 2007. T. 82. № 5. С. 1095–1105.

126. Morgan J.E. и др. The class II transactivator (CIITA) is regulated by post-translational modification cross-talk between ERK1/2 phosphorylation, mono-ubiquitination and Lys63 ubiquitination // *Biosci. Rep.* 2015. T. 35. № 4. С. 233.

127. Muhlethaler-Mottet A. и др. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. // *EMBO J.* 1997. T. 16. № 10. С. 2851–60.

128. Muhlethaler-Mottet A. и др. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. // *Immunity.* 1998. T. 8. № 2. С. 157–66.

129. Muntasell A. и др. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: A different perspective of the host-pathogen interaction // *Eur. J. Immunol.* 2013. T. 43. № 5. С. 1133–1141.

130. Nakamura Y. и др. Heterodimerization of the IL-2 receptor β - And γ -chain cytoplasmic domains is required for signalling // *Nature*. 1994. Т. 369. № 6478. С. 330–333.
131. Nakayama M. и др. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011. Т. 108. № 45. С. 18360–18365.
132. Naluyima P. и др. Impaired natural killer cell responses are associated with loss of the highly activated NKG2A⁺CD57⁺CD56^{dim} subset in HIV-1 subtype D infection in Uganda // *Aids*. 2014. Т. 28. № 9. С. 1273–1278.
133. Nandi D., Gross J.A., Allison J.P. CD28-mediated costimulation is necessary for optimal proliferation of murine NK cells. // *J. Immunol.* 1994. Т. 152. № 7. С. 3361–9.
134. Nelson B.H., Lord J.D., Greenberg P.D. Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor β and γ chains mediate the signal for T-cell proliferation // *Nature*. 1994. Т. 369. № 6478. С. 333–336.
135. Ng S.C. и др. A novel population of human CD56⁺ human leucocyte antigen D-related (HLA-DR⁺) colonic lamina propria cells is associated with inflammation in ulcerative colitis: ORIGINAL ARTICLE // *Clin. Exp. Immunol.* 2009. Т. 158. № 2. С. 205–218.
136. O'Brien K.L., Finlay D.K. Immunometabolism and natural killer cell responses // *Nat. Rev. Immunol.* 2019. Т. 19. № 5.
137. Ostaijen-ten Dam M.M. van и др. Preparation of Cytokine-activated NK Cells for Use in Adoptive Cell Therapy in Cancer Patients // *J. Immunother.* 2016. Т. 39. № 2. С. 90–100.
138. Pachnio A. и др. Cytomegalovirus Infection Leads to Development of High Frequencies of Cytotoxic Virus-Specific CD4⁺ T Cells Targeted to Vascular Endothelium // *PLoS Pathog.* 2016. Т. 12. № 9.

139. Parham P. Taking license with natural killer cell maturation and repertoire development. // *Immunol. Rev.* 2006. T. 214. C. 155–60.
140. Park Y.-K. и др. Interleukin-21 increases direct cytotoxicity and IFN- γ production of ex vivo expanded NK cells towards breast cancer cells. // *Anticancer Res.* 2012. T. 32. № 3. C. 839–46.
141. Paust S., Andrian U.H. von. Natural killer cell memory // *Nat. Immunol.* 2011. T. 131. № 6. C. 500–508.
142. Pease J. CCR4 Chemokine Receptor // *xPharm Compr. Pharmacol. Ref.* 2007. C. 1–8.
143. Pegram H.J. и др. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. // *Immunol. Cell Biol.* 2011. T. 89. № 2. C. 216–24.
144. Peng H., Tian Z. Diversity of tissue-resident NK cells // *Semin. Immunol.* 2017. T. 31.
145. Petitdemange C. и др. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. // *PLoS Pathog.* 2011. T. 7. № 9. C. e1002268.
146. 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. T. 159. № 4. C. 993–1008.
147. Pokkali S., Das S.D., Selvaraj A. Differential upregulation of chemokine receptors on CD56⁺ NK cells and their transmigration to the site of infection in tuberculous pleurisy // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009. T. 55. № 3. C. 352–360.
148. Portevin D., Young D. Natural killer cell cytokine response to *M. bovis* BCG Is associated with inhibited proliferation, increased apoptosis and ultimate depletion of NKp44(+)CD56(bright) cells. // *PLoS One.* 2013. T. 8. № 7. C. e68864.

149. Pupuleku A. и др. Elusive role of the CD94/NKG2C NK cell receptor in the response to cytomegalovirus: Novel experimental observations in a reporter cell system // *Front. Immunol.* 2017.
150. Rabinowich H. и др. Expression and function of CD7 molecule on human natural killer cells. // *J. Immunol.* 1994. Т. 152. № 2. С. 517–26.
151. Rinaldi L. и др. Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: Distinctive patterns characterize MRI-active patients // *Brain.* 2006. Т. 129. № 8. С. 1993–2007.
152. Rock K.L., Reits E., Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. // *Trends Immunol.* 2016. Т. 37. № 11. С. 724–737.
153. Roda J.M. и др. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. // *J. Immunol.* 2006. Т. 177. № 1. С. 120–9.
154. Rölle A. и др. CD2–CD58 interactions are pivotal for the activation and function of adaptive natural killer cells in human cytomegalovirus infection // *Eur. J. Immunol.* 2016. Т. 46. № 10. С. 2420–2425.
155. Romagnani C. и др. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. // *J. Immunol.* 2007. Т. 178. № 8. С. 4947–55.
156. Romee R. и др. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia // *Sci. Transl. Med.* 2016. Т. 8. № 357. С. 357ra123-357ra123.
157. Roncarolo M. и др. Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens // *J. Immunol.* 1991. Т. 147. С. 781–787.
158. Roy S. и др. NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen // *J. Immunol.* 2008. Т. 180. № 3. С. 1729–1736.
159. Salgado F.J. и др. Interleukin-dependent modulation of HLA-DR expression on CD4 and CD8 activated T cells // *Immunol. Cell Biol.* 2002. Т. 80. № 2. С.

138–147.

160. Scharon T.M., Scott P. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to leishmania major in mice // *J. Exp. Med.* 1993. Т. 178. № 2. С. 567–578.

161. Schaum N. и др. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris // *Nature*. 2018. Т. 562. № 7727. С. 367–372.

162. Schierloh P. и др. Increased Susceptibility to Apoptosis of CD56 dim CD16 + NK Cells Induces the Enrichment of IFN- γ -Producing CD56 bright Cells in Tuberculous Pleurisy // *J. Immunol.* 2005. Т. 175. № 10. С. 6852–6860.

163. Schroder K. и др. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions // *J. Leukoc. Biol.* 2004. Т. 75. № 2. С. 163–189.

164. Senju H. и др. Effect of IL-18 on the expansion and phenotype of human natural killer cells: Application to cancer immunotherapy // *Int. J. Biol. Sci.* 2018. Т. 14. № 3. С. 331–340.

165. Serti E. и др. Successful Interferon-Free Therapy of Chronic Hepatitis C Virus Infection Normalizes Natural Killer Cell Function // *Gastroenterology*. 2015. Т. 149. № 1. С. 190–200.

166. Shimasaki N., Jain A., Campana D. NK cells for cancer immunotherapy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020. Т. 19. С. 200–218.

167. 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. 575–83.

168. Smith S.G. и др. Whole Blood Profiling of Bacillus Calmette–Guérin-Induced Trained Innate Immunity in Infants Identifies Epidermal Growth Factor, IL-6, Platelet-Derived Growth Factor-AB/BB, and Natural Killer Cell Activation // *Front. Immunol.* 2017. Т. 8. № June. С. 1–11.

169. Spits H. и др. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. //

Nat. Rev. Immunol. 2013. Т. 13. № 2. С. 145–9.

170. Spits H., Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. // Annu. Rev. Immunol. 2012. Т. 30. С. 647–75.

171. Stojanovic A. и др. CTLA-4 Is Expressed by Activated Mouse NK Cells and Inhibits NK Cell IFN- γ Production in Response to Mature Dendritic Cells // J. Immunol. 2014. Т. 192. № 9. С. 4184–4191.

172. 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. 2018a. Т. 13. № 12. С. 1–19.

173. 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. 2018b. Т. 13. № 12.

174. Suck G. и др. Interleukin-15 supports generation of highly potent clinical-grade natural killer cells in long-term cultures for targeting hematological malignancies. // Exp. Hematol. 2011. Т. 39. № 9. С. 904–14.

175. Suliman S. и др. Bacillus Calmette–Guérin (BCG) Revaccination of Adults with Latent Mycobacterium tuberculosis Infection Induces Long-Lived BCG-Reactive NK Cell Responses // J. Immunol. 2016. Т. 197. № 4. С. 1100–1110.

176. Sun J.C., Beilke J.N., Lanier L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. // Nature. 2009. Т. 457. № 7229. С. 557–61.

177. Suni M.A., Picker L.J., Maino V.C. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry // J. Immunol. Methods. 1998. Т. 212. № 1. С. 89–98.

178. Urlaub D. и др. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. // J. Immunol. 2017. Т. 198.

№ 5. С. 1944–1951.

179. Vankayalapati R. и др. NK Cells Regulate CD8⁺ T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen // *J. Immunol.* 2003. Т. 172. № 1. С. 130–137.

180. Vivier E. и др. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. // *Science.* 2011. Т. 331. № 6013. С. 44–9.

181. Voigt J. и др. Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. // *J. Infect. Dis.* 2014. Т. 209. № 4. С. 616–26.

182. Voong L.N. и др. Mitogen-activated protein kinase ERK1/2 regulates the class II transactivator. // *J. Biol. Chem.* 2008. Т. 283. № 14. С. 9031–9.

183. Voynova E. и др. Cutting Edge: Induction of Inflammatory Disease by Adoptive Transfer of an Atypical NK Cell Subset // *J. Immunol.* 2015. Т. 195. № 3. С. 806–809.

184. Voynova E.N., Skinner J., Bolland S. Expansion of an Atypical NK Cell Subset in Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus // *J. Immunol.* 2015. Т. 194. № 4. С. 1503–1513.

185. Vukicevic M. и др. CD56 bright NK cells after hematopoietic stem cell transplantation are activated mature NK cells that expand in patients with low numbers of T cells // *Eur. J. Immunol.* 2010. Т. 40. № 11. С. 3246–3254.

186. Walzer T. и др. Natural-killer cells and dendritic cells: «l'union fait la force». // *Blood.* 2005. Т. 106. № 7. С. 2252–8.

187. Wang X. и др. Membrane-bound interleukin-21 and CD137 ligand induce functional human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells through STAT-3 activation. // *Clin. Exp. Immunol.* 2013. Т. 172. № 1. С. 104–12.

188. Yang S.-H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // *Gene.* 2013. Т. 513. № 1. С. 1–13.

189. Yano N. и др. Increase of HLA-DR-positive natural killer cells in peripheral blood from patients with IgA nephropathy. // *Hum. Immunol.* 1996. Т. 49. № 1. С. 64–70.
190. Young D.B. и др. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. // *J. Clin. Invest.* 2008. Т. 118. № 4. С. 1255–65.
191. Zeng R. и др. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation // *Blood.* 2007. Т. 109. № 10. С. 4135–4142.
192. Zhang H. и др. Activating signals dominate inhibitory signals in CD137L/IL-15 activated natural killer cells // *J. Immunother.* 2011. Т. 34. № 2. С. 187–195.
193. Zhang R. и др. Human NK Cells Positively Regulate gamma-delta T Cells in Response to *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Immunol.* 2006. Т. 176. № 4. С. 2610–2616.
194. Zhang T. и др. Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by FcR γ deficiency. // *J. Immunol.* 2013. Т. 190. № 4. С. 1402–6.
195. Zingoni A. и др. Cross-talk between activated human NK cells and CD4⁺ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. // *J. Immunol.* 2004. Т. 173. № 6. С. 3716–3724.
196. Zufferey C. и др. The Contribution of Non-Conventional T Cells and NK Cells in the *Mycobacterial-Specific IFN γ* Response in Bacille Calmette-Guerin (BCG)-Immunized Infants // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 10. С. 1–9.
197. Абакушина Е.В., Кузьмина Е.Г., Коваленко Е.И. Основные свойства и функции НК-клеток человека // *Иммунология.* 2012. № 4. С. 220–225.
198. Коваленко Е.И., Стрельцова М.А. Адаптивные свойства натуральных киллеров – лимфоцитов врожденного иммунитета // *Биоорганическая химия.* 2016. Т. 42. № 6. С. 649–667.
199. Ярилин А.А. Иммунология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с.

