

## СВОЙСТВА СУБПОПУЛЯЦИЙ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ ЧЕЛОВЕКА, ОБЛАДАЮЩИХ МАРКЕРАМИ АДАПТИВНЫХ КЛЕТОК

©2019 г. П. А. Кобызева, М. А. Стрельцова, С. А. Ерохина,  
Е. И. Коваленко\*

\*E-mail: lenkovalen@mail.ru

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина  
и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Натуральные киллеры относят к лимфоцитам врожденного иммунитета, поскольку они способны проявлять спонтанную противоопухолевую активность без предварительной активации. Согласно недавним исследованиям, у человека некоторые вирусные инфекции, в первую очередь, цитомегаловирусная инфекция, ассоциированы с увеличенным, по сравнению с неинфицированными людьми, количеством циркулирующих НК-клеток с фенотипом CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>. Предполагается, что клетки данной субпопуляции обладают характеристиками адаптивных клеток и иммунологической памятью к инфекции HCMV. Данная работа посвящена изучению свойств субпопуляций НК-клеток человека, отобранных по маркерам CD57 и NKG2C, при стимуляции IL-2 и мембраносвязанным IL-21.

**Ключевые слова:** адаптивные НК-клетки, цитомегаловирус, HCMV, CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> субпопуляция, HLA-DR, K562-mbIL21, противоопухолевая иммунотерапия

DOI: 10.31857/S102872210006695-9

**Адрес:** 117997, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, лаборатория клеточных взаимодействий, Коваленко Елена Ивановна.  
Тел.: +7(915)2445626 (моб.).

**E-mail:** lenkovalen@mail.ru

**Авторы:**

**Кобызева П. А.**, бакалавр, лаборатория клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

**Стрельцова М. А.**, м.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

**Ерохина С. А.**, аспирант, лаборатория клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия;

**Коваленко Е. И.**, к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточных взаимодействий, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», РАН, Москва, Россия.

Натуральные киллеры (НК-клетки) традиционно определяются как лимфоциты врожденного иммунитета из-за их способности быстро

и эффективно элиминировать поврежденные или трансформированные клетки организма без предварительной активации. В отличие от Т- и В-лимфоцитов, НК-клетки обладают иным механизмом распознавания мишени, называемым «missing self recognition», который не требует участия антиген-специфических рецепторов и запускается при отсутствии молекул главного комплекса гистосовместимости первого класса на клетках-мишенях. Это позволяет использовать натуральные киллеры в качестве эффективного противоопухолевого агента без риска развития активной формы болезни «трансплантат против хозяина» [1].

Несмотря на видимый прогресс в области НК-клеточной иммунотерапии, такие факторы как малая численность НК-клеток в крови, низкий пролиферативный потенциал активированных клеток, ингибирование цитотоксического ответа при взаимодействии с клетками некоторых опухолей ограничивают эффективность их применения в клинической практике. Альтернативный путь для поиска новых стра-

тегий в области лечения рака появился после обнаружения адаптивных свойств у определенной группы НК-клеток. Было показано, что эти клетки проявляют увеличенную функциональную активность при взаимодействии с опухолевыми клетками [2].

Данная субпопуляция НК-клеток характеризуется высокой экспрессией активирующего лектин-подобного рецептора CD94/NKG2C и маркера терминальной дифференцировки CD57. Численность этой субпопуляции в периферической крови пациентов возрастает под действием цитомегаловирусной инфекции (HCMV) [3].

Клетки субпопуляции CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> специализируются на высокоэффективном иммунном ответе на определенные раздражители, и обладают следующими свойствами: сниженной натуральной цитотоксичностью и чувствительностью к цитокинам IL-12, IL-18, продуцируемым клетками врожденного иммунитета, и увеличенной антителозависимой цитотоксичностью и продукцией IFN- $\gamma$  в ответ на соответствующие стимулы, а также длительным персистированием в организме (от 4 месяцев до 1 года) [4]. Совокупность этих функциональных особенностей соответствует клеткам памяти и позволяет считать, что именно субпопуляция НК-клеток NKG2C<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> обладает свойствами адаптивности.

Данная работа посвящена изучению пролиферативной активности и фенотипических различий субпопуляций НК-клеток человека, отобранных по маркерам CD57 и NKG2C. Выделение НК-клеток осуществляли методом отрицательной магнитной сепарации из мононуклеаров периферической крови здоровых доноров. Было проведено сравнение клеток, полученных из общей популяции НК-клеток, так и разделенных методом клеточной сортировки на субпопуляции CD57<sup>-</sup>NKG2C<sup>-</sup>, CD57<sup>-</sup>NKG2C<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>-</sup>, CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>. Клетки культивировали в присутствии 100 ед./мл IL-2 с добавлением фидерных клеток K562, несущих на своей поверхности мембраносвязанный IL-21 (K562-mbIL21). Фенотипический анализ поверхностной экспрессии маркеров CD56, NKG2C, HLA-DR, CD57, NKp30, NKp46, NKG2A, CD16, KIR2DL2/DL3 проводился с помощью метода проточной цитометрии с использованием флуоресцентномеченых антител. Пролиферативную

активность НК-клеток оценивали по уровню свечения витального красителя CFSE.

На разделенных субпопуляциях было показано, что наивысшим пролиферативным потенциалом обладали малодифференцированные CD57-клетки, а из позитивных по CD57 субпопуляций наибольшую пролиферативную способность имели клетки NKG2C<sup>+</sup>. Хотя НК-клетки не относятся к антигенпрезентирующим, в общей популяции НК-клеток *ex vivo* наблюдалось небольшое количество HLA-DR<sup>+</sup> -клеток. Наибольшим уровнем экспрессии HLA-DR обладали NKG2C-позитивные НК-клетки. Оценка динамики уровня экспрессии NKG2C и HLA-DR в общей популяции и разделенных НК-клетках выявила рост уровня экспрессии HLA-DR, при этом, максимальные значения были зарегистрированы в клетках NKG2C<sup>+</sup>. При культивировании в условиях стимуляции в общей популяции наблюдалось увеличение количества клеток, позитивных по NKp30, NKp46, NKG2A и уменьшение количества НК-клеток с фенотипом CD57<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> или KIR<sup>+</sup>.

Таким образом, стимуляция IL-2 и фидерными клетками K562-mbIL-21 активирует НК-клетки, позитивные по маркеру NKG2C, в том числе и клетки субпопуляции CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>. NKG2C<sup>+</sup>-НК-клетки обладают высокой пролиферативной способностью и демонстрируют повышенный активационный статус. Полученные результаты могут быть использованы при получении высокоактивированных и пролиферирующих субпопуляций НК-клеток с целью их дальнейшего применения в иммунотерапии рака.

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 19-15-00439.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Li Y., Yin J., Li T., Huang S., Yan H., Leavenworth J., Wang X. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical application. *Sci China Life Sci.* 2015, 58(12), 1233–45.
2. Peng H., Tian Z. Natural Killer Cell Memory: Progress and Implications. *Front Immunol.* 2017, 8, 1143.
3. Goodier M.R., Jonjić S., Riley E.M., Juranić Lisnić V. CMV and natural killer cells: shaping the response to vaccination. *Eur J Immunol.* 2018, 48(1), 50–65.
4. 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.

**PROPERTIES OF HUMAN NATURAL KILLER CELL SUBPOPULATIONS  
EXPRESSING MARKERS OF ADAPTIVE CELLS**

© 2019 P. A. Kobyzeva, M. A. Streltsova, S. A. Erokhina,  
E. I. Kovalenko\*

\*E-mail: lenkovalen@mail.ru

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,  
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**Received:** 15.03.2019. **Accepted:** 27.03.2019

Natural killer cells are attributed to lymphocytes of innate immunity for their ability of spontaneous antitumor activity without prior activation. However, recent studies have shown that some viral infections, such as human cytomegalovirus, can cause an increase in the number of NK cells with the phenotype CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> compared to healthy donors. It is assumed that cells of this subpopulation have some properties of adaptivity and immunological memory to HCMV infection. This paper is devoted to the study of properties of human NK-cell subpopulations selected for the markers CD57 and NKG2C, when stimulated with IL-2 and membrane-bound IL-21.

*Key words:* adaptive NK-cells, cytomegalovirus, HCMV, CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> subpopulation, HLA-DR, K562-mbIL-21, cancer immunotherapy

**Authors:**

**Kobyzeva P. A.**, bachelor, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

**Streltsova M. A.**, Junior Researcher of Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

**Erokhina S. A.**, PhD Student, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

**Kovalenko E. I.**,  PhD, Senior Researcher of Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. **E-mail:** lenkovalen@mail.ru