

Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YT

В.Г. Субракова^{1,2}✉, С.В. Кулемзин¹✉, Т.Н. Беловежец^{1,2}, А.Н. Чикаев¹, Н.А. Чикаев¹, О.А. Коваль^{1,3},
А.А. Горчаков^{1,2}, А.В. Таранин^{1,2}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: subrakova.vera@gmail.com; skulemzin@mcb.nsc.ru

Аннотация. Одна из самых распространенных причин смертей пациентов в России, наряду с болезнями системы кровообращения, – это онкологические заболевания. Перспективным средством в борьбе с раковыми клетками представляются НК-клетки (естественные киллеры), однако для успешного применения в терапии онкологических заболеваний необходимо обеспечить их накопление в опухолевых очагах, устойчивость к иммуносупрессивному микроокружению, а также более высокую цитотоксическую активность. Известно, что НК-лимфоциты уничтожают раковые клетки, экспрессирующие специфические стресс-лиганды; при этом баланс сигналов от ингибирующих и активирующих рецепторов на поверхности НК-клетки определяет, будет ли запущена цитотоксическая реакция. Один из теоретически возможных способов повышения цитотоксичности состоит в том, чтобы при помощи генетического редактирования усилить активационные сигнальные каскады в НК-клетках и/или ослабить ингибирующие, таким образом сместив баланс сигналов в сторону активации лимфоцитов и лизиса мишеней. НК-клетки с таким модифицированным цитотоксическим потенциалом могут эффективнее уничтожать раковые мишени, обладающие так называемой устойчивостью к лизису. В этой работе мы предлагаем дважды модифицировать НК-клетки. Во-первых, при помощи системы CRISPR/Cas9 проводить нокаут гена *shp-2* (*PTPN11*), кодирующего белок Shp-2 – негативный регулятор активации НК-клеток; во-вторых, при помощи лентивирусных векторов интегрировать кассету, кодирующую CAR (химерный антигенный рецептор), способный специфично связываться с антигенами на поверхности раковой мишени и генерировать активирующий сигнал. В качестве модельной НК-клеточной линии нами была выбрана перевиваемая линия НК-подобного фенотипа YT, поскольку эти клетки не нуждаются в специфических цитокинах для культивирования и могут проявлять перфорин/гранзим-опосредованную цитотоксическую активность. Мы показали, что сочетание нокаута гена *shp-2* и экспрессии CAR повышает цитотоксичность эффекторных клеток на модели НК-устойчивой клеточной линии аденокарциномы простаты человека Du-145, экспрессирующей специфично узнаваемый CAR антиген, белок PSMA. Подобные линии с «усиленным» цитотоксическим фенотипом в перспективе могут быть использованы для нужд противораковой терапии.

Ключевые слова: НК-клетки; CRISPR/Cas9; CAR-NK; Shp-2.

Для цитирования: Субракова В.Г., Кулемзин С.В., Беловежец Т.Н., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А., Коваль О.А., Горчаков А.А., Таранин А.В. Нокаут гена *shp-2* приводит к повышению CAR-опосредованной цитотоксичности НК-клеток линии YT. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(1):80-86. DOI 10.18699/VJ20.598

shp-2 gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells

V.G. Subrakova^{1,2}✉, S.V. Kulemzin¹✉, T.N. Belovezhets^{1,2}, A.N. Chikaev¹, N.A. Chikaev¹, O.A. Koval^{1,3},
A.A. Gorchakov^{1,2}, A.V. Tarantin^{1,2}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: subrakova.vera@gmail.com; skulemzin@mcb.nsc.ru

Abstract. In Russia, cancer is the second leading cause of death following cardiovascular diseases. Adoptive transfer of NK cells is a promising approach to fight cancer; however, for their successful use in cancer treatment, it is necessary to ensure their robust accumulation at tumor foci, provide resistance to the immunosuppressive tumor microenvironment, and to engineer them with higher cytotoxic activity. NK lymphocytes are known to kill cancer cells expressing a number of stress ligands; and the balance of signals from inhibitory and activating receptors on the surface of the NK cell determines whether a cytotoxic reaction is triggered. We hypothesized that stronger cytotoxicity of NK cells could be achieved via gene editing aimed at enhancing the activating signaling cascades and/or weakening the inhibitory ones, thereby shifting the balance of signals towards NK cell activation and target cell lysis. Here, we took advantage of the CRISPR/Cas9 system to introduce mutations in the coding sequence of the *shp-2* (*PTPN11*) gene encoding the

signaling molecule of inhibitory pathways in NK cells. These *shp-2* knock-out NK cells were additionally transduced to express a chimeric antigen receptor (CAR) that selectively recognized the antigen of interest on the target cell surface and generated an activating signal. We demonstrate that the combination of *shp-2* gene knockout and CAR expression increases the cytotoxicity of effector NK-like YT cells against human prostate cancer cell line Du-145 with ectopic expression of PSMA protein, which is specifically targeted by the CAR.

Key words: NK cells; CRISPR/Cas9; CAR-NK; Shp-2.

For citation: Subrakova V.G., Kulemzin S.V., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Chikaev N.A., Koval O.A., Gorchakov A.A., Taranin A.V. *shp-2* gene knockout upregulates CAR-driven cytotoxicity of YT NK-cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(1):80-86. DOI 10.18699/VJ20.598

Введение

Клетки – естественные киллеры (НК) представляют собой цитотоксические лимфоциты, способные уничтожать инфицированные или трансформированные клетки. Цитотоксическая активность НК-лимфоцитов регулируется взаимодействием активирующих и ингибирующих рецепторов с лигандами на поверхности клеток-мишеней (Malarkannan, 2006; Lee, Gasser, 2010; Becker et al., 2016; Del Zotto et al., 2017).

Ингибирующие рецепторы играют важную роль в функционировании НК-клеток, поскольку лигандами большинства из них являются молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС-I, присутствующие на поверхности большей части клеток организма, но, как правило, отсутствующие на опухолевых или зараженных вирусом клетках (Hewitt, 2003; de Charette et al., 2016). Таким образом, клетки организма не подвергаются уничтожению, а клетки, утратившие МНС-I, уничтожаются (Kärre et al., 1986; Hanke et al., 1999). Однако способность НК-клеток к лизису мишеней не всегда коррелирует с отсутствием экспрессии МНС-I и зависит также от наличия лигандов к активирующим рецепторам (Serwenka et al., 2001; Paul, Lal, 2017). Передача сигналов от ингибирующих рецепторов осуществляется с помощью фосфатаз, в основном таких, как SH2-содержащая инозитолфосфатаза-1 (SHIP-1), и тирозинфосфатаз Shp-1 и Shp-2. Происходит это за счет дефосфорилирования фосфатазами тирозинов в ITAM-мотивах активирующих рецепторов, после чего передача активирующего сигнала прекращается (Rehman et al., 2018).

Естественные киллеры успешно используют в терапии онкологических заболеваний (Rezvani et al., 2017). Тем не менее вследствие иммуносупрессии, вызванной опухолевыми клетками и опухолевым микроокружением, цитотоксичность НК-клеток заметно снижается (Mamessier et al., 2011; Pasero et al., 2016; Suen et al., 2018). Усиление их цитотоксичности может быть достигнуто различными способами: модификацией сигнальных путей, рецепторов НК-клеток или опосредованной цитокинами активацией НК-клеток (Igarashi et al., 2004; Childs, Carlsten, 2015; Yang et al., 2017; Freund-Brown et al., 2018; Nauyar et al., 2019). Мы предположили, что модификация ингибирующего сигнального пути через нокаут гена *shp-2* приведет к значительному ослаблению ингибирующего сигналинга и, соответственно, усилению цитотоксической активности модельных НК-клеток.

Материалы и методы

Клеточные линии и их культивирование. Клеточные линии YT, Du-145-PSMA и HEK293T культивировали

в среде Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Конструирование векторов. Для конструирования протоспейсеров *shp-2* специфичных сгРНК (единой направляющей РНК) был проведен поиск последовательностей сгРНК с помощью нескольких инструментов, предсказывающих эффективность гРНК (направляющей РНК) (Mogeno-Mateos et al., 2015; Doench et al., 2016). Выбраны следующие две последовательности мишеней: gtgcagatcctacctctgaaagg и acagtactacaactcaagcagg (PAM-сайт выделен подчеркиванием).

Для экспрессии Cas9 и сгРНК использовали вектор lentiCRISPRv2, предоставленный проф. Feng Zhang (Addgene #52961, США) (Sanjana et al., 2014). Синтезированные олигонуклеотиды, соответствующие выбранным мишеням, переводили попарно в дуплексное состояние денатурацией на кипящей водяной бане с последующей медленной ренатурацией и клонировали в вектор lentiCRISPRv2 по сайтам рестрикции BsmBI.

Плазмидная ДНК клонов lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2, включающих в себя *shp2*-специфичные сгРНК1 и сгРНК2, была смешана с ДНК вспомогательных плазмид psPAX2 и pMD2.G (предоставлены проф. D. Trono) в массовом соотношении 10:10:7.5:2.5, в суммарном количестве 3 мкг. С помощью метода кальций-фосфатной трансфекции (Kutner et al., 2009) полученная смесь плазмидных ДНК была доставлена в клетки линии HEK293T. Супернатанты, содержащие псевдотипированные лентивирусные частицы, собирали через 48 ч после трансфекции, фильтровали через PES-фильтры 0.45 мкм и использовали в свежем виде либо хранили при –70 °С.

Трансдукция клеток YT. Для улучшения трансдукции применяли протокол спинокуляции (O'Doherty et al., 2000). Клетки YT высевали в 24-луночные планшеты (1 × 10⁵ клеток) в присутствии полибрена (8 мкг/мл) с последующим добавлением супернатантов, содержащих псевдотипированные лентивирусные частицы. Клетки центрифугировали при 500 g в течение 40 мин при 32 °С и инкубировали 16 ч в CO₂-инкубаторе. На следующий день супернатант заменяли свежей культуральной средой. Через 3 дня проводили селекцию в 5 мг/мл пурамицина (Invitrogen, США) в течение 1 недели; нетрансдуцированные клетки использовали в качестве контроля.

Вестерн-блот анализ. Трансдуцированные клетки YT и контрольные нетрансдуцированные клеточные линии YT-wt и HEK293T лизировали в буфере для лизиса (100 мМ Трис, pH 6.8, 2 % SDS, 5 % β-меркаптоэтанол, 15 % гли-

церол). Клеточные лизаты центрифугировали, кипятили на водяной бане в течение 5 мин, разделяли с помощью SDS-PAGE в 10 % полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare, США). Мембрану, заблокированную в 3 % молоке на PBST, инкубировали с моноклональными антителами кролика против Shp-2 (1:3000, #3397S, Cell Signaling Technology, США), а затем с HRP-меченым вторичным антителом «коза-против кролика» (1:8000, лаборатория иммуногенетики). Равномерность загрузки образцов оценивали, используя гибридизацию с контрольными антителами против β -актина (1:3000, #ab3280, Abcam, США). Мембраны визуализировали и документировали с использованием субстрата ECL-prime в соответствии с рекомендациями производителя (GE Healthcare) и прибора Amersham Imager 600 с экспозицией 1 мин.

Проточная цитометрия. Для фенотипирования клеточных линий CAR-YT^{shp-2-/-} 10⁵ клеток промывали в PBS и инкубировали 30 мин в присутствии биотинилированного белка L (3.3 мкг/мл) (M00097, Genscript, США) при температуре 4 °C. Далее клетки отмывали и инкубировали со стрептавидином-APC (Thermo Fisher, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Витальный краситель 7AAD (Biolegend, США) был использован для исключения мертвых клеток из анализа. Образцы анализировали с помощью прибора BD FACSCanto® II (Becton Dickinson and Company) и программного обеспечения BD FACSDiva.

Анализ цитотоксичности в реальном времени (RTCA). Прикрепленные клетки-мишени высевали в 8-луночные сенсорные планшеты (ACEA Biosciences, Корея) в количестве 5 × 10⁴ клеток на лунку и инкубировали 16–18 ч. На следующий день среду удаляли и заменяли свежей, содержащей 1 × 10⁵ клеток-эффекторов. Проводили мониторинг роста клеток в течение 24 ч с помощью системы RTCA iCELLigence для анализа клеток в реальном времени. Цитотоксичность рассчитывали по формуле: [CI (клеток-мишеней без эффекторных клеток) – CI (клеток-мишеней с эффекторными клетками)] × 100/CI (клеток-мишеней без эффекторных клеток), где CI – нормализованное значение импеданса в лунках планшета (Golubovskaya et al., 2017).

Анализ цитотоксичности при помощи проточной цитометрии. Необходимое количество клеток-мишеней метили при помощи агента Cell Proliferation Dye eFluor 670 (Thermo Fisher). В 96-луночный планшет вносили по 50000 клеток-мишеней на лунку, после чего добавляли равное количество эффекторов, оставляя в нескольких лунках клетки-мишени без эффекторов для контроля. Клетки инкубировали 4 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C. После этого в каждую лунку добавляли витальный краситель 7AAD и измеряли процент живых клеток-мишеней на проточном цитофлуориметре BD FACSCantoII.

Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения Prism software (GraphPad version 8.0). С использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) были выявлены различия между контрольными линиями, не несущими нокаута гена *shp-2*, и нокаутными линиями. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты

В качестве модели NK-лимфоцитов нами была выбрана человеческая иммортализованная перевиваемая линия с NK-подобным фенотипом YT. Эти клетки обладают способностью к перфорин-опосредованному лизису мишеней; при этом они не зависят от наличия IL-2 в среде при культивировании и не экспрессируют Fc-рецепторы (Yodoi et al., 1985; Deaglio et al., 2002; Edsparr et al., 2010). Для редактирования гена *shp-2* мы использовали систему CRISPR/Cas9. Были подобраны две специфичные последовательности sgRNA, комплементарные кодирующим участкам гена *shp-2* в области третьего и пятого экзонов. Последовательности ДНК, кодирующие соответствующие протоспейсеры sgRNA, были клонированы в лентивирусный вектор lentiCRISPRv2 (Sanjana et al., 2014). Далее с использованием полученных таким образом конструкций lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2 были наработаны лентивирусные частицы и произведена ко-трандукция клеток YT. Поскольку lentiCRISPRv2-Shp2g1 и lentiCRISPRv2-Shp2g2 несут ген устойчивости к пуromицину, на следующем этапе была проведена селекция пуromицин-устойчивых клеток, экспрессирующих одну или обе целевые кассеты. Далее клетки были моноклонированы, после чего панель моноклонов анализировали таргетным секвенированием целевого района гена *PTPN11* для отбора сублиний с биаллельными мутациями в данном локусе (рис. 1, а).

Получено четыре сублинии (B1, C1, C3, C4), в которых мутации приводят к сдвигу или обрыву рамки считывания в кодирующей области гена *shp-2* (см. рис. 1, а). Для верификации нокаута в этих линиях был проведен вестерн-блот анализ, который подтвердил факт отсутствия полноразмерного белка Shp-2 (см. рис. 1, б).

Эффективным подходом для специфического перенацеливания цитотоксической активности NK-клеток является эктопическая экспрессия CAR (химерного антигенного рецептора). CAR индуцирует проактивационный сигналинг в NK-клетке после контакта с мишенью, даже если мишень не экспрессирует типичные стресс-маркеры. Мы использовали химерный антигенный рецептор структуры scFv(J591)-CD8шарнир-CD28TM-CD28-CD3z (Kulemzin et al., 2019). Этот CAR второго поколения позволяет перенаправлять активность T- или NK-клеток против клеток-мишеней, экспрессирующих PSMA, поверхностный маркер клеток рака простаты (Chang, 2004; Gorchakov et al., 2019). Нами получены линии клеток с экспрессией указанного CAR на основе клеток YT дикого типа и четырех сублиний YT^{shp-2-/-}. Экспрессия CAR на поверхности полученных линий была верифицирована при помощи проточной цитометрии (рис. 2).

Далее нами была изучена цитотоксическая активность трех из четырех полученных линий – B1-CAR, C1-CAR и C4-CAR. Для этого в качестве мишени выбирались клетки Du-145 с эктопической экспрессией белка PSMA. Линия клеток Du-145 считается резистентной к лизису NK-клетками (Hood et al., 2019) и, как следствие, является хорошим субстратом для оценки активности «усиленных» NK-лимфоцитов. Для анализа специфической цитотоксичности использовали платформу iCELLigence (ACEA Biosciences, Корея). Обнаружено что CAR-YT^{shp-2-/-} клет-

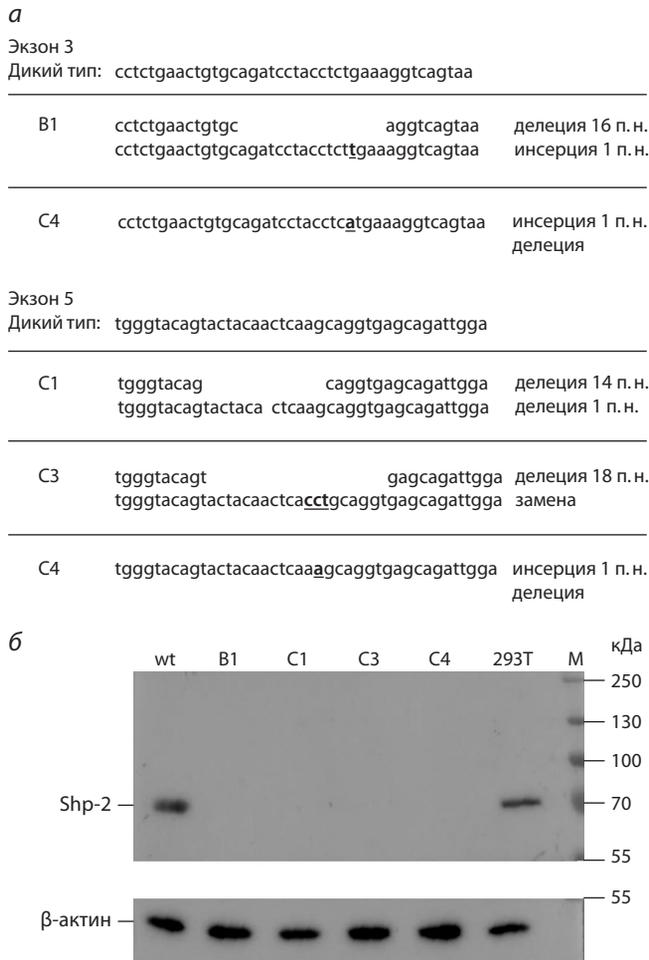


Рис. 1. Подтверждение нокаута гена *shp-2* в моноклональных дериватах НК-клеточной линии YT.

а – нуклеотидные последовательности CRISPR/Cas9-индуцированных мутаций в экзонах 3 и 5 гена *shp-2*; *б* – вестерн-блот гибридизация лизатов клеток, нокаутированных по *shp-2* (B1, C1, C3, C4), а также контрольных линий НЕК293Т (293Т) и YT (немодифицированные клетки линии YT, wt) с антителами против Shp-2 или бета-актина (контроль загрузки).

ки проявляют значимо большую цитотоксичность, чем CAR-YT клетки без мутации в гене *shp-2*, при этом наблюдаемый эффект воспроизводился для всех трех субклонов линий CAR-YT^{*shp-2*-/-}, независимо от природы внесенных мутаций (рис. 3).

Для того чтобы оценить литическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} в отношении клеток здоровых тканей, мы провели цитотоксический тест, в котором мишенями выступали периферические лимфоциты крови здорового донора. Было обнаружено, что гибель клеток-мишеней при коинкубации с CAR-YT^{*shp-2*-/-} клетками достоверно не отличается от таковой в контроле без добавления эффекторов, равно как и от контролей при коинкубации с клетками CAR-YT или YT^{*shp-2*-/-} (рис. 4).

Обсуждение

Цитотоксическая активность НК-клеток регулируется балансом сигналов от ингибирующих и активирующих рецепторов на их поверхности (Lee, Gasser, 2010; Sivori et al., 2019). Цитотоксическая реакция может происходить

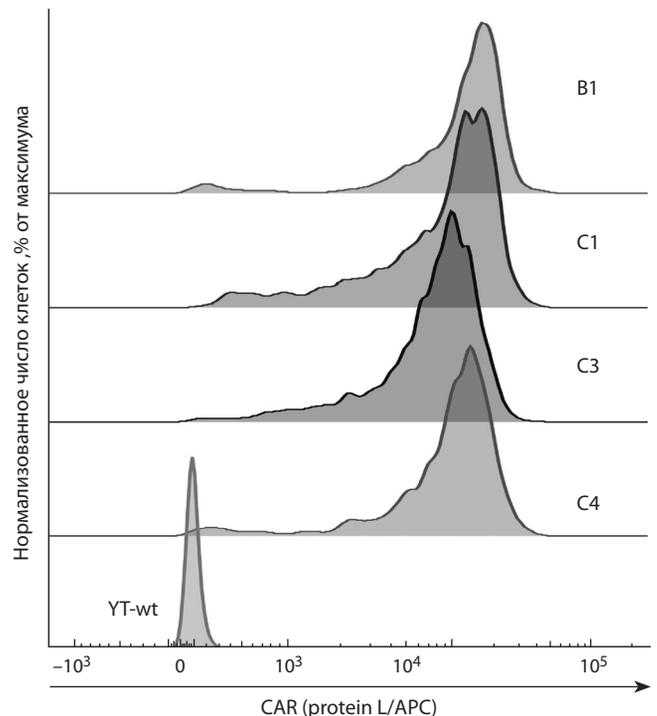


Рис. 2. Детекция уровня поверхностной экспрессии CAR в CAR-YT клетках, нокаутных по *shp-2* (B1, C1, C3, C4), и в негативном контроле (немодифицированная клеточная линия YT (YT-wt)).

лишь в том случае, если присутствует активирующий сигнал, иными словами, если клетка-мишень экспрессирует лиганды активирующих рецепторов и при этом отсутствует или ослаблен ингибирующий сигнал, т. е. клетка-мишень не экспрессирует лиганды ингибирующих рецепторов либо НК-клетка в принципе не имеет ингибирующего рецептора к данному лиганду (Chester et al., 2015; Pasero et al., 2016). В случае, если нет сигналов от активирующих рецепторов или избыточны сигналы от ингибирующих, цитотоксическая реакция не происходит, что применительно к клеточной терапии означает выживание опухоли (Pasero et al., 2016; Del Zotto et al., 2017).

Проблема нехватки активирующего сигнала может быть успешно решена при помощи экспрессии CAR, что уже активно применяется на практике (Imai et al., 2005; Rusakiewicz et al., 2013; Quintarelli et al., 2018; Ingegner et al., 2019), однако клетки-мишени с повышенной экспрессией лигандов ингибирующих рецепторов продолжают оставаться неуязвимыми для НК-клеточного лизиса (Rezvani et al., 2017).

Одним из вариантов решения этой проблемы могло бы стать создание НК-клеток, нокаутных по ингибирующим рецепторам, однако, принимая во внимание разнообразие последних, это потребует внесения множественных мутаций. Более простой путь – удаление фосфатазы Shp-2, которая является одним из ключевых негативных регуляторов НК-клеточной активности (Yusa, Campbell, 2003; Purdy, Campbell, 2009). Полученные нами дериваты НК-клеточной линии YT, нокаутные по гену *shp-2*, продемонстрировали высокий уровень CAR-опосредованной цитотоксичности в отношении НК-устойчивой линии аде-

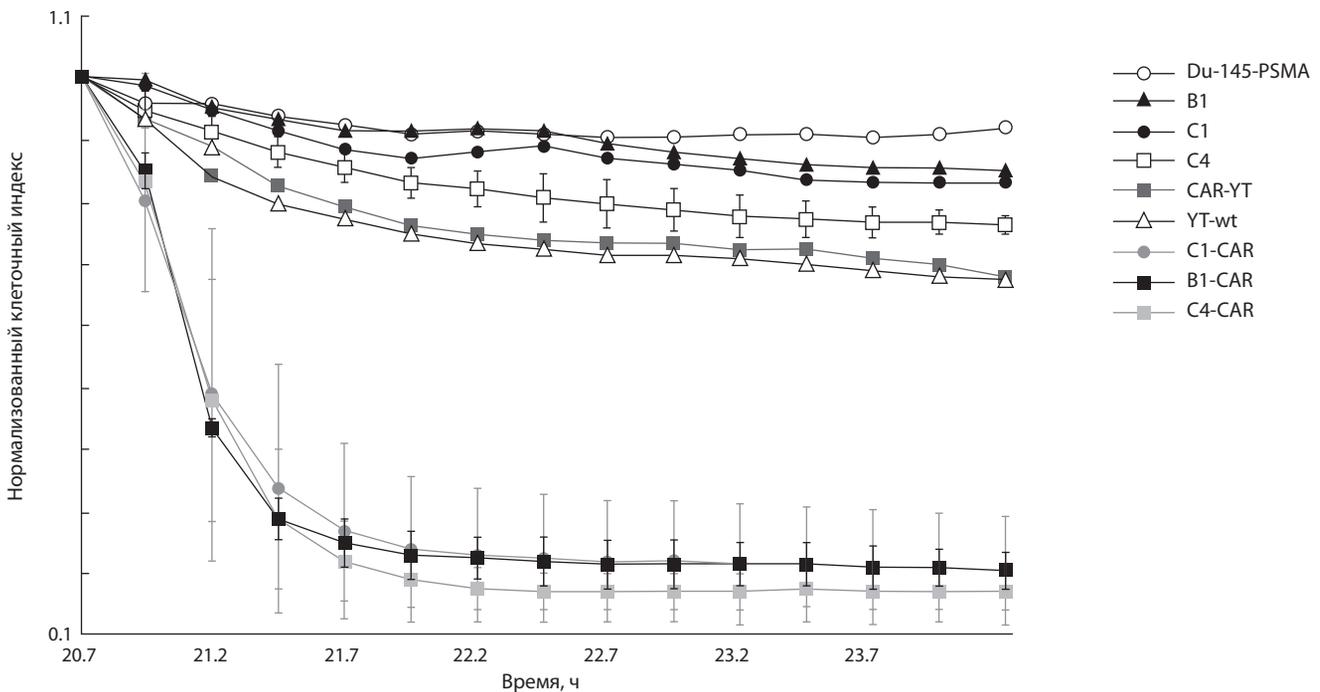


Рис. 3. Анализ цитотоксичности в реальном времени (RTCA) нокаутных по *shp-2* сублиний B1, C1, C4, их CAR-модифицированных вариантов и линий CAR-YT и YT-wt на модели Du-145-PSMA.

График приведен со времени добавления эффекторов к клеткам-мишеням.

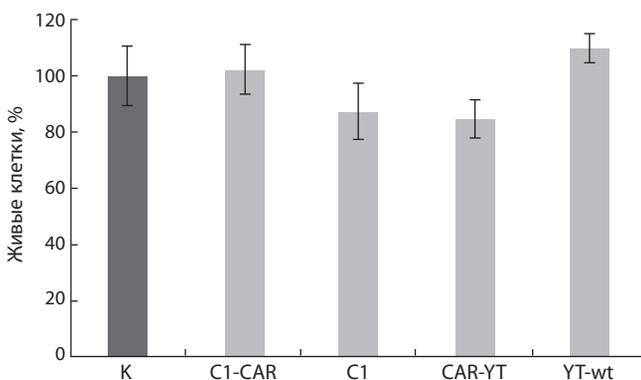


Рис. 4. Анализ цитотоксической активности YT клеток, нокаутных по *shp-2* (C1-CAR, C1), а также CAR-YT и YT дикого типа в отношении лимфоцитов периферической крови здорового донора.

Коинкубация 4 ч в соотношении 1:1. К – инкубация клеток-мишеней без эффекторных клеток. Приведено среднее значение по меньшей мере трех независимых повторностей и стандартная ошибка среднего.

нокарциномы простаты Du-145-PSMA (Hood et al., 2019), при этом CAR-модификация YT клеток дикого типа не увеличила их цитотоксичность (см. рис. 3). Это указывает на тот факт, что линия Du-145-PSMA обладает высокой плотностью лигандов ингибирующих рецепторов, и ингибирующий сигналинг тормозит активирующий, даже с учетом сигналов от CAR. И действительно, известно, что линия Du-145 экспрессирует мало лигандов к активирующим рецепторам NKp30 и NKp46 NK-клеток и значительное количество молекул MHC-I (Pasero et al., 2015).

Немаловажным является вопрос безопасности полученных клеток. Можно предположить, что нокаут по

гену *shp-2*, приводящий к ослаблению ингибирующего сигналинга, вызовет повышение цитотоксической активности NK-клеток в отношении здоровых тканей. Чтобы в полной мере ответить на этот вопрос, необходимо проверить цитотоксическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} клеток в отношении обширной панели нормальных клеток, однако получение многих типов тканей от здоровых доноров является непростой задачей с технической и этической точек зрения. В настоящем исследовании мы проверили цитотоксическую активность CAR-YT^{*shp-2*-/-} клеток в отношении лимфоцитов здорового донора и не обнаружили ее достоверного повышения. Вероятно, ослабление ингибирующего сигналинга не опасно при отсутствии активирующих лигандов на поверхности клетки-мишени. В то же время окончательный ответ на вопрос о безопасности полученных нами клеток может быть дан только после их всестороннего исследования. Возможно, дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в различные типы тканей позволит получить представительную панель здоровых клеток-мишеней для таких исследований.

Заключение

Таким образом, оптимальным вариантом усиления цитотоксической активности NK-клеток может быть экспрессия CAR для индукции активирующих сигналов в сочетании с супрессией ингибирующего сигналинга за счет удаления одного из ключевых его медиаторов – белка Shp-2. В дальнейшем необходимо всесторонне изучить безопасность модифицированных лимфоцитов, в частности исследовать их цитотоксическую активность в отношении большего спектра здоровых тканей.

Список литературы / References

- Becker P.S.A., Suck G., Nowakowska P., Ullrich E., Seifried E., Bader P., Tonn T., Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2016;65(4):477-484. DOI 10.1007/s00262-016-1792-y.
- Cerwenka A., Baron J.L., Lanier L.L. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(20):11521-11526. DOI 10.1073/pnas.201238598.
- Chang S.S. Overview of prostate-specific membrane antigen. *Rev. Urol.* 2004;6(Suppl.10):S13-S18.
- Chester C., Fritsch K., Kohrt H.E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2015;6:601. DOI 10.3389/fimmu.2015.00601.
- Childs R.W., Carlsten M. Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015;14:487. DOI 10.1038/nrd4506.
- De Charette M., Marabelle A., Houot R. Turning tumour cells into antigen presenting cells: the next step to improve cancer immunotherapy? *Eur. J. Cancer.* 2016;68:134-147. DOI 10.1016/j.ejca.2016.09.010.
- Deaglio S., Zubiatur M., Gregorini A., Bottarel F., Ausiello C.M., Dianzani U., Sancho J., Malavasi F. Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood.* 2002;99(7):2490-2498.
- Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2017;92(2):100-114. DOI 10.1002/cyto.b.21508.
- Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(2):184-191. DOI 10.1038/nbt.3437.
- Edsparr K., Speetjens F.M., Mulder-Stapel A., Goldfarb R.H., Basse P.H., Lennernäs B., Kuppen P.J.K., Albertsson P. Effects of IL-2 on MMP expression in freshly isolated human NK cells and the IL-2-independent NK cell line YT. *J. Immunother.* 2010;33(5):475-481. DOI 10.1097/CJI.0b013e3181d372a0.
- Freund-Brown J., Chirino L., Kambayashi T. Strategies to enhance NK cell function for the treatment of tumors and infections. *Crit. Rev. Immunol.* 2018;38(2):105-130. DOI 10.1615/CritRevImmunol.2018025248.
- Golubovskaya V., Berahovich R., Zhou H., Xu S., Harto H., Li L., Chao C.C., Mao M.M., Wu L. CD47-CAR-T cells effectively kill target cancer cells and block pancreatic tumor growth. *Cancers (Basel).* 2017;9(10):139. DOI 10.3390/cancers9100139.
- Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Kochneva G.V., Tarani A.V. Challenges and prospects of chimeric antigen receptor T-cell therapy for metastatic prostate cancer. *Eur. Urol.* 2019. DOI 10.1016/j.eururo.2019.08.014.
- Hanke T., Takizawa H., McMahon C.W., Busch D.H., Pamer E.G., Miller J.D., Altman J.D., Liu Y., Cado D., Lemonnier F.A., Bjorkman P.J., Raulat D.H. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity.* 1999;11(1):67-77. DOI 10.1016/S1074-7613(00)80082-5.
- Hewitt E.W. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology.* 2003;110(2):163-169. DOI 10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x.
- Hood S.P., Foulds G.A., Imrie H., Reeder S., Mcardle S.E.B., Khan M., Pockley A.G. Phenotype and function of activated natural killer cells from patients with prostate cancer: patient-dependent responses to priming and IL-2 activation. *Front. Immunol.* 2019;9:3169. DOI 10.3389/fimmu.2018.03169.
- Igarashi T., Wynberg J., Srinivasan R., Becknell B., McCoy J.P., Takahashi Y., Suffredini D.A., Linehan W.M., Caligiuri M.A., Childs R.W. Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* 2004;104(1):170. DOI 10.1182/blood-2003-12-4438.
- Imai C., Iwamoto S., Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood.* 2005;106(1):376-383. DOI 10.1182/blood-2004-12-4797.
- Ingegnere T., Mariotti F.R., Pelosi A., Quintarelli C., De Angelis B., Tumino N., Besi F., Cantoni C., Locatelli F., Vacca P., Moretta L. Human CAR NK cells: a new non-viral method allowing high efficient transfection and strong tumor cell killing. *Front. Immunol.* 2019;10:957. DOI 10.3389/fimmu.2019.00957.
- Kärre K., Ljunggren H.G., Pirotek G., Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319(6055):675-678. DOI 10.1038/319675a0.
- Kulemzin S.V., Matvienko D.A., Sabirov A.H., Sokratyan A.M., Chernikova D.S., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Tarani A.V., Gorchakov A.A. Design and analysis of stably integrated reporters for inducible transgene expression in human T cells and CAR NK-cell lines. *BMC Med. Genomics.* 2019;12(Suppl.2):44. DOI 10.1186/s12920-019-0489-4.
- Kutner R.H., Zhang X.-Y., Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat. Protoc.* 2009;4(4):495-505. DOI 10.1038/nprot.2009.22.
- Lee S.K., Gasser S. The role of natural killer cells in cancer therapy. *Front. Biosci. (Elite Ed).* 2010;2:380-391.
- Malarkannan S. The balancing act: inhibitory Ly49 regulate NKG2D-mediated NK cell functions. *Semin. Immunol.* 2006;18(3):186-192. DOI 10.1016/j.smim.2006.04.002.
- Mamessier E., Sylvain A., Thibault M.-L., Houvenaeghel G., Jacquemier J., Castellano R., Gonçalves A., André P., Romagné F., Thibault G., Viens P., Birnbaum D., Bertucci F., Moretta A., Olive D. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* 2011;121(9):3609-3622. DOI 10.1172/JCI45816.
- Moreno-Mateos M.A., Vejnar C.E., Beaudoin J.D., Fernandez J.P., Mis E.K., Khokha M.K., Giraldez A.J. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting *in vivo*. *Nat. Methods.* 2015;12(10):982-988. DOI 10.1038/nmeth.3543.
- Nayyar G., Chu Y., Cairo M.S. Overcoming resistance to natural killer cell based immunotherapies for solid tumors. *Front. Oncol.* 2019;9:51. DOI 10.3389/fonc.2019.00051.
- O'Doherty U., Swiggard W.J., Malim M.H. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* 2000;74(21):10074-10080. DOI 10.1128/jvi.74.21.10074-10080.2000.
- Pasero C., Gravis G., Granjeaud S., Guerin M., Thomassin-Piana J., Rocchi P., Salem N., Walz J., Moretta A., Olive D. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6(16):14360-14373. DOI 10.18632/oncotarget.3965.
- Pasero C., Gravis G., Guerin M., Granjeaud S., Thomassin-Piana J., Rocchi P., Paciencia-Gros M., Poizat F., Bentobji M., Azario-Cheillan F., Walz J., Salem N., Brunelle S., Moretta A., Olive D. Inherent and tumor-driven immune tolerance in the prostate microenvironment impairs natural killer cell antitumor activity. *Cancer Res.* 2016;76(8):2153. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-15-1965.
- Paul S., Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 2017;8:1124. DOI 10.3389/fimmu.2017.01124.

- Purdy A.K., Campbell K.S. SHP-2 expression negatively regulates NK cell function. *J. Immunol.* 2009;183(11):7234-7243. DOI 10.4049/jimmunol.0900088.
- Quintarelli C., Sivori S., Caruso S., Carlomagno S., Boffa I., Orlando D., Guercio M., Cembrola B., Pitisci A., Di Cecca S., Li Pira G., Vinti L., De Angelis B., Moretta L., Locatelli F. CD19 redirected CAR NK cells are equally effective but less toxic than CAR T cells. *Blood.* 2018;132(Suppl.1):3491. DOI 10.1182/blood-2018-99-118005.
- Rehman A.U., Rahman M.U., Khan M.T., Saud S., Liu H., Song D., Sultana P., Wadood A., Chen H.F. The landscape of protein tyrosine phosphatase (Shp2) and cancer. *Curr. Pharm. Des.* 2018;24(32):3767-3777. DOI 10.2174/1381612824666181106100837.
- Rezvani K., Rouce R., Liu E., Shpall E. Engineering natural killer cells for cancer immunotherapy. *Mol. Ther.* 2017;25(8):1769-1781. DOI 10.1016/j.ymthe.2017.06.012.
- Rusakiewicz S., Semeraro M., Sarabi M., Desbois M., Locher C., Mendez R., Vimond N., Concha A., Garrido F., Isambert N., Chaigneau L., Le Brun-Ly V., Dubreuil P., Cremer I., Caignard A., Poirier-Colame V., Chaba K., Flament C., Halama N., Jäger D., Eggermont A., Bonvalot S., Commo F., Terrier P., Opolon P., Emile J.-F., Coindre J.-M., Kroemer G., Chaput N., Le Cesne A., Blay J.-Y., Zitvogel L. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2013;73(12):3499. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-0371.
- Sanjana N.E., Shalem O., Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods.* 2014;11(8):783-784. DOI 10.1038/nmeth.3047.
- Sivori S., Vacca P., Del Zotto G., Munari E., Mingari M.C., Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* 2019;16(5):430-441. DOI 10.1038/s41423-019-0206-4.
- Suen W.C.W., Lee W.Y.W., Leung K.T., Pan X.H., Li G. Natural killer cell-based cancer immunotherapy: a review on 10 years completed clinical trials. *Cancer Invest.* 2018;36(8):431-457. DOI 10.1080/07357907.2018.1515315.
- Yang L., Shen M., Xu L.J., Yang X., Tsai Y., Keng P.C., Chen Y., Lee S.O. Enhancing NK cell-mediated cytotoxicity to cisplatin-resistant lung cancer cells via MEK/Erk signaling inhibition. *Sci. Rep.* 2017;7(1):7958. DOI 10.1038/s41598-017-08483-z.
- Yodoi J., Teshigawara K., Nikaido T., Fukui K., Noma T., Honjo T., Takigawa M., Sasaki M., Minato N., Tsudo M., Uchiyama T., Maeda M. TCGF (IL 2)-receptor inducing factor(s). I. Regulation of IL-2 receptor on a natural-killer-like cell-line (YT-cells). *J. Immunol.* 1985;134(3):1623-1630.
- Yusa S.-I., Campbell K.S. Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells. *J. Immunol.* 2003;170(9):4539. DOI 10.4049/jimmunol.170.9.4539.

ORCID ID

O.A. Koval orcid.org/0000-0001-7788-2249
A.A. Gorchakov orcid.org/0000-0003-2830-4236
A.V. Taranin orcid.org/0000-0002-9184-4238

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, Соглашение № 075-15-2019-1246, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.10.2019. После доработки 26.11.2019. Принята к публикации 26.11.2019.