

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

На правах рукописи

Рубцов Юрий Петрович

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
КОНТРОЛЯ ЛИМФОПРОЛИФЕРАЦИИ И АУТОИММУНИТЕТА

Специальности

03.01.03 – Молекулярная биология

03.03.03 – Иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Официальные оппоненты:**

**Купраш Дмитрий Владимирович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН,** заведующий Центром высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

**Филатов Александр Васильевич, д.б.н., профессор РАН,** заведующий Лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства

**Апт Александр Соломонович, д.б.н., профессор РАН,** заведующий Лабораторией иммуногенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза Российской академии наук

**Ведущая организация:**

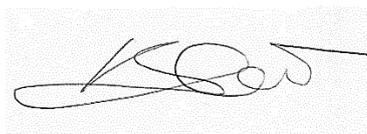
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится 10 февраля 2021 г. в 10:00 на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте Института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,



доктор физико-математических наук Олейников В. А.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Беспрецедентное разнообразие специфичностей рецепторов Т-клеток (ТКР), получившее название репертуара ТКР, обеспечивает распознавание практически любых антигенов. Наряду с неоспоримым преимуществом, гарантирующим узнавание разных по организации патогенов и их компонентов, потенциально Т-клетки могут связывать собственные пептидные антигены, экспонированные на поверхности специализированных клеток в виде комплексов с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Узнавание собственных антигенов приводит к системной активации иммунной системы и связанным с ней воспалительным лимфопролиферативным заболеваниям (например, ревматоидному артриту, псориазу, болезни Крона и другим). Чтобы избежать спонтанной активации Т-клеток в ответ на «свое» существует система негативной селекции Т-клеток в тимусе, которая элиминирует потенциально аутореактивные клетки на стадии созревания до контакта с периферическими антигенами. Однако система негативной селекции несовершенна, что приводит к выходу в ткани аутореактивных Т-клеток. Поэтому, наряду с механизмами центральной «тимусной» толерантности, существуют дополнительные механизмы периферической клеточной толерантности, определяемые специализированными популяциями т.н. регуляторных Т-клеток (Трег) и клетками тканевой стромы мезенхимного происхождения. Эти иммунорегуляторные клетки за счет секреции растворимых факторов или прямых контактов с активированными лимфоцитами успешно предотвращают спонтанную активацию клеток иммунной системы и ассоциированные с ней лимфопролиферацию и воспаление.

Генетические факторы, неблагоприятные внешние воздействия и стрессы приводят к тому, что механизмы иммунологической толерантности оказываются малоэффективными. Это вызывает спонтанную или индуцированную (в случае аллергии и астмы) активацию клеток иммунной системы, особенно Т-клеток, что приводит к развитию тяжелых лимфопролиферативных воспалительных аутоиммунных заболеваний. Доказано, что частичная потеря функций или существенное уменьшение числа Трег ассоциированы с и могут служить причиной развития социально значимых аутоиммунных патологий. Поэтому исследование клеточных и молекулярных механизмов, определяющих системную иммунологическую толерантность (Трег) и локальную толерантность на уровне тканевой стромы (мезенхимные стромальные клетки), является чрезвычайно актуальной. С другой стороны, локальное увеличение количества и функциональной активности

иммуносупрессорных клеток (Трег, опухолевые макрофаги, супрессорные клетки миелоидного происхождения) сопутствует формированию и прогрессии солидных опухолей. Образование опухолевого иммуносупрессорного микроокружения лимитирует успех существующих методов таргетной иммунотерапии. Поэтому исследование молекулярных программ, обеспечивающих деление, поддержание фенотипа и иммуносупрессорные функции специализированных регуляторных клеток, представляет важную фундаментальную и практическую проблему. Возможность регулировать число иммуносупрессорных клеток, а также селективно блокировать молекулы, которые они используют для «угнетения» эффекторных Т-клеток и клеток врожденного иммунитета, позволит существенно расширить возможности терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний. В настоящее время предпринимаются успешные попытки терапии аутоиммунного диабета с помощью трансплантации Трег, а также использования мезенхимных стромальных клеток и их секрета для противовоспалительной терапии.

Представленная работа посвящена исследованию фундаментальных аспектов функционирования иммуносупрессорных клеток, а также их роли в патогенезе аутоиммунных заболеваний на примере ревматоидного артрита. Важным вкладом является создание генетических мышинных моделей, которые позволяют селективно на уровне геномной ДНК инактивировать отдельные молекулы, участвующие в иммуносупрессорной программе регуляторных Т-клеток. Использование этих моделей впервые позволило: (i) определить роль секретируемого Трег интерлейкина-10 в развитии спонтанного колита и реакций иммунологической гиперчувствительности в барьерных тканях (слизистой кишечника, легких, коже); (ii) с помощью генетического маркирования доказать стабильность фенотипа и функций, т.н. «натуральных», Трег на протяжении жизни трансгенных животных; (iii) доказать связь числа и поверхностного фенотипа Трег пациентов с ревматоидным артритом с тяжестью заболевания, прогнозом и ответом на терапию; (iv) установить функцию транскрипционного фактора Foxp1 в поддержании фенотипа и функции Трег с помощью специфического нокаута его гена в мышах. Кроме того, исследование иммуносупрессорного потенциала мезенхимных стромальных клеток человека (МСК) в культурах *in vitro* выявило чрезвычайно важную роль молекулы ICAM-1 на поверхности клеток в способности МСК ингибировать активацию Т-лимфоцитов.

**Цель работы и основные задачи исследования.** Цель настоящей работы состояла в исследовании клеточных и молекулярных механизмов функционирования разных типов клеток, участвующих в поддержании локальной тканевой и системной иммунологической толерантности, а именно регуляторных Т-клеток (Трег) и мезенхимных стромальных клеток (МСК), с помощью клеточных моделей *in vitro*, в лабораторных инбредных линиях

трансгенных мышей, а также на образцах из крови пациентов с ревматоидным артритом, содержащих циркулирующие лимфоциты.

Для достижения данной цели был поставлен и реализован ряд задач:

1) создать и охарактеризовать фенотип новых линий мышей, несущих трансгены, необходимые для осуществления Cre-зависимой рекомбинации кондиционных аллелей генов исключительно в Трег с момента рождения или под действием тамоксифена во взрослых мышах;

2) определить специфичность и эффективность делеции фрагментов генов интереса с помощью созданных трансгенов в лабораторных мышах;

3) создать конструкцию и провести таргетирование гена *Foxp1* с целью создания кондиционного аллеля, который можно было бы использовать для выключения функции *Foxp1* в Cre-зависимой манере исключительно в Трег;

4) установить функцию *Foxp1* в Трег мыши путем характеристики изменений в структуре хроматина, транскрипционных изменений и функциональных дефектов популяции Трег с выключенным *Foxp1* по сравнению с Трег с нормальным геном *Foxp1*;

5) установить роль секреции IL-10 Трег в поддержании системной и локальной иммунологической толерантности путем изучения фенотипа мышей с кондиционным Трег-специфическим нокаутом гена *Il-10*;

6) определить *in vivo* с помощью наследуемого генетического мечения стабильность и изучить внешние факторы (лимфопения, инфекция, сильный иммунный ответ, индуцированный недостаток IL-2), влияющие на поддержание популяции натуральных Трег мыши в физиологических условиях;

7) изучить связь между числом и фенотипом циркулирующих Трег пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом с тяжестью симптомов, эффективностью ответа на лечение метотрексатом и прогнозом;

8) выяснить роль молекул адгезии, в частности ICAM-1, в опосредованной МСК человека супрессии активации и деления стимулированных лимфоцитов *in vitro*.

#### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В настоящей работе были созданы новые трансгенные линии мышей, которые позволили изучить различные аспекты клеточной биологии популяции Трег мыши. Впервые в мире была получена и охарактеризована линия мышей для Трег-специфического нокаута генов с помощью системы Cre-loxP, а также новая линия мышей с фланкированными сайтами loxP экзонами гена фактора транскрипции *Foxp1*, которые кодируют домены этого белка, участвующие в гомо- и гетеродимеризации с другими белками семейства forkhead box. Были получены животные с Трег-специфическим нокаутом гена иммуносупрессорного цитокина IL-10 и фактора транскрипции *Foxp1*, роль которых в иммуносупрессорной программе и поддержании фенотипа и функций Трег не

была изучена. В результате убедительно доказано, что секреция IL-10 Трег важна для поддержания локальной иммунологической толерантности в барьерных тканях и органах мышц. Продукция этого важного цитокина Трег мало влияет на поддержание системной иммунологической толерантности. Создание мышей с нокаутом гена Foxp1 в Трег позволило определить, что этот фактор транскрипции участвует в поддержании иммуносупрессорной функции Трег и их фенотипа, усиливая связывание ключевого для Трег фактора транскрипции Foxp3 с хроматином. Foxp1 также нужен для поддержания наивного состояния Трег, поскольку его нокаут приводит к образованию клеток с активированным фенотипом, которые, несмотря на ускоренную пролиферацию, более чувствительны к спонтанному апоптозу и обладают сниженным иммуносупрессорным потенциалом.

Впервые создана линия мышей для индуцируемого тамоксифеном Трег-специфического нокаута генов. Её использование позволяет индуцировать нокаут у взрослых животных с нормально сформировавшейся иммунной системой. Полученную линию использовали для необратимого генетического маркирования Трег взрослых мышей. В результате установлена стабильность фенотипа Трег в течение жизни, а также при действии внешних стимулов (индуцированная облучением лимфопения, активация сильного Th1 ответа путем введения антител к белку CD40, инфекция *Listeria monocytogenes*, индуцированная моноклональными антителами блокада IL-2). Полученные результаты доказывают, что синтез Foxp3 и поддержание фенотипа натуральных Трег закреплены в течение продолжительности жизни животных (более 5 месяцев). Внешние факторы, перечисленные выше, за исключением блокады IL-2 (ключевого цитокина для Трег), оказались неспособны существенно изменить уровень Foxp3 в Трег, а также количество и пропорцию этих клеток у взрослых мышей. Этот факт крайне важен для использования Трег для аутологичной трансплантации пациентам с аутоиммунными заболеваниями.

Проведено клиническое исследование фенотипа и численного содержания Трег крови у пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом (РА) до и в ходе терапии метотрексатом. Установлена прямая корреляция между снижением числа Трег и уровнем маркеров активации на поверхности Трег с тяжестью симптомов и клинических проявлений заболевания. Показано, что у пациентов, отвечающих на метотрексат, восстанавливается число и пропорция Трег, а также возрастает пропорция клеток с повышенным уровнем маркеров активации. Это наблюдение позволяет рассматривать Трег крови пациентов с РА в качестве прогностического маркера и индикатора эффективного ответа на терапию метотрексатом.

В последней части исследованы молекулярные механизмы, определяющие способность мезенхимных клеток из стромы тканей (висцерального жира) ингибировать

активацию Т-клеток человека *in vitro*. Впервые показано, что молекула клеточной адгезии ICAM-1 необходима для обеспечения эффективной иммуносупрессии лимфоцитов мезенхимными клетками. Этот факт можно использовать для создания новых подходов к терапии аутоиммунных заболеваний, основанных на трансплантации мезенхимных клеток с улучшенными иммуносупрессорными свойствами.

Таким образом, в работе исследованы разные аспекты механизмов регуляции иммунного ответа и поддержания иммунологической толерантности на уровне отдельных тканей или целого организма. Получены новые ценные с теоретической и практической точки зрения данные.

Практическая значимость работы состоит в создании новых линий мышей для исследования роли отдельных молекул в иммуносупрессорной программе Трег мыши. Эти линии с успехом применены для исследования роли рецепторов, сигнальных молекул и факторов транскрипции в поддержании иммуносупрессорной программы Трег. В настоящее время эти линии являются коммерчески доступными, поскольку депонированы для хранения и распространения в коллекцию лабораторных животных Jackson Laboratories (США). Разработаны (совместно с доктором Хендерсоном) оригинальные подходы для изучения гиперчувствительного ответа в легких на вакцинацию овалбумином и индукцию воспаления с помощью аэрозоля метахолина.

#### **Публикация и апробация работы**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 21 статье в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, из них – 3 обзора, имеется 2 патента. Результаты работы представлены на престижных российских и международных научных конференциях.

#### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 211 страницах и содержит 62 рисунка, 4 таблицы и 421 источник литературы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **I. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ТРЕГ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО НОКАУТА ГЕНОВ В МЫШАХ**

**Создание генетической модели для специфического нокаута генов в Трег**

Проблема при изучении Трег заключается в том, что большинство поверхностных маркеров, определяющих популяцию Трег, например CD25, в больших количествах присутствуют также на поверхности активированных эффекторных Т-клеток. Этот факт чрезвычайно затрудняет исследование Трег, как *ex vivo*, так и *in vivo*, поскольку выделение клеток методами сортировки в процессе FACS-анализа или иммуномагнитная сепарация неизменно приводят к получению обогащенной Трег популяции, загрязненной активированными Т-хелперами. В ряде случаев этим загрязнением (5-10%) можно пренебречь, однако для получения однозначно интерпретируемых результатов требуется специфически определить и выделить популяцию функциональных Трег. Сделать это позволяет создание трансгенных животных, в которых природный ген Foxp3 заменен на рекомбинантный ген, кодирующий химерный белок Foxp3 с флуоресцентным белком GFP (Fontenot, 2005) или его аналогами. При этом, одновременно с сохранением ядерной локализации Foxp3 и подавляющего большинства его биологических функций, флуоресценция ковалентно-связанного с Foxp3 GFP позволяет идентифицировать и выделить Трег с фенотипом CD4+Foxp3+. Подобный подход логично использовать и для создания трансгенных knock-in животных, которые бы одновременно с синтезом Foxp3 синтезировали рекомбиназу Cre, которая вырезает ДНК, расположенную между сайтами узнавания loxP в одинаковой ориентации (т.н. «флуксированных» аллелей). В дополнение к введению кДНК рекомбиназы Cre в 3'-нетранслируемую область гена Foxp3 можно декорировать Cre молекулой YFP, что должно облегчить идентификацию Cre+ клеток, в которых произошел нокаут гена интереса, и их выделение из смесей.

Для создания мышей с селективной инактивацией генов исключительно в Трег встроили последовательность ДНК, кодирующую вирусный IRES, и кДНК химерного белка Cre и YFP (далее YFP-Cre) в 3'UTR локуса Foxp3 (рис. 1А). Место для knock-in было выбрано, исходя из анализа последовательности 3'-UTR Foxp3, с 3'-конца от участка терминации транскрипции. Структура таргетирующей 3'UTR Foxp3 в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) конструкции на основе фрагмента ВАС клона, несущего 3'-концевую часть геномного локуса Foxp3, показана на рис. 1А.

Путем введения линейаризованной конструкции в ЭСК и селекции были получены клоны, несущие модифицированные аллели локуса Foxp3. Модифицированные ЭСК использовали для получения химерных бластоцистов, а затем, соответственно, химерных мышей, которых проверяли на способность передачи желаемого аллеля потомству. Кассету Neo<sup>f</sup> удаляли, скрещивая химерных мышей с линией, несущей рекомбиназу FLPe (рис. 1Б). Neo<sup>f</sup>-негативное потомство многократно скрещивали с мышами C57/BL6 (Jackson Labs), в клетках получающихся в результате мышей Foxp3<sup>YFP-Cre</sup> анализировали экспрессию белков YFP-Cre и Foxp3 (рис. 1В).

Для определения специфичности и эффективности рекомбинации созданных мышей скрещивали с репортерной линией, несущей *ROSA26YFP* (R26Y) (Srinivas, 2001). Этот аллель позволяет обнаруживать Cre-опосредованную рекомбинацию на уровне отдельных клеток по флуоресценции YFP, индуцированной вырезанием «флосированной» транскрипционной стоп-кассеты, интегрированной в локус *ROSA26*. Поскольку количество репортера YFP заметно выше, чем белка YFP-Cre, 100% эффективную Cre-опосредованную рекомбинацию в клетках Трег мышей *Foxp3*YFP-Cre несложно детектировать в популяциях CD4+*Foxp3*+.

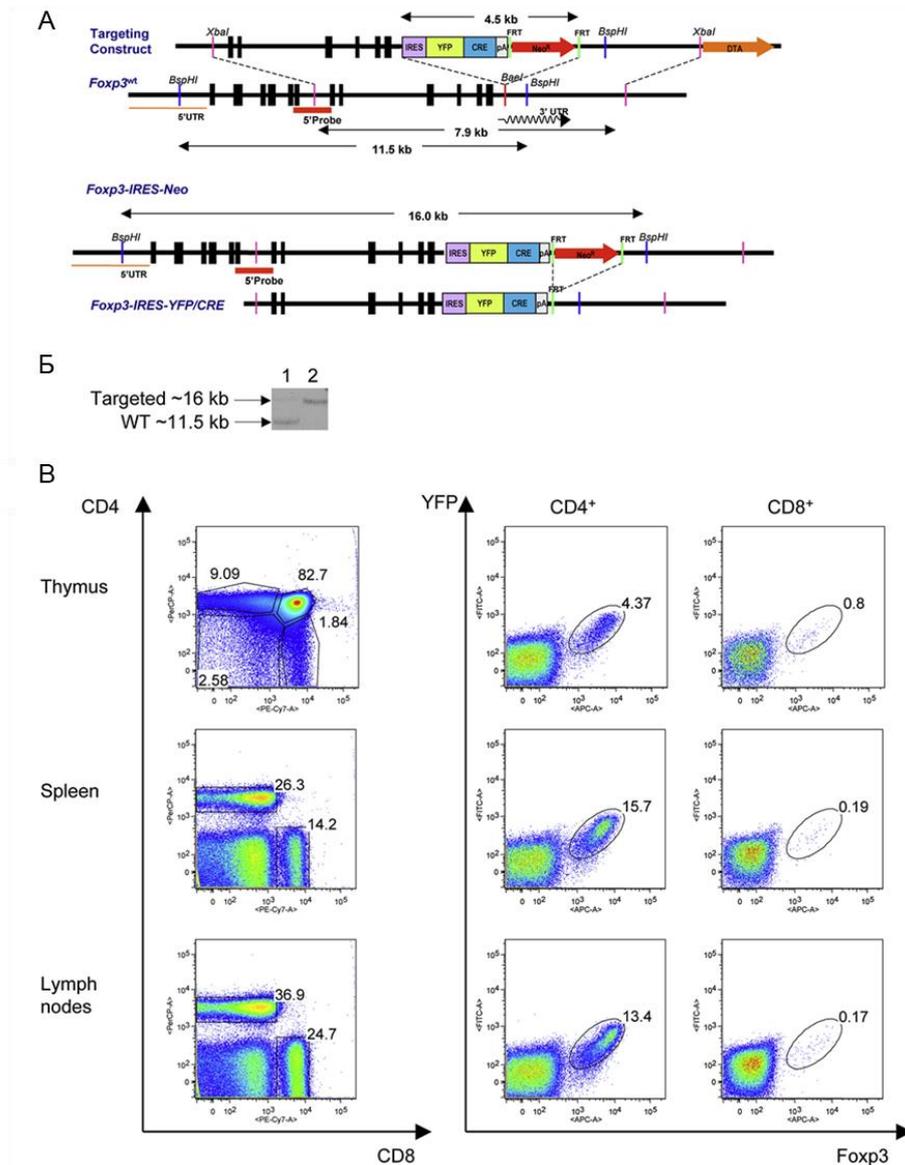


Рисунок 1. Создание и характеристика мышей, несущих мутантный аллель *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup>

(А) Схема 3'-концевой части локуса *foxp3*, строение вектора для таргетирования и расположение зондов для анализа результатов таргетирования; (Б) Результаты блоттинга по Саузерну (скан рентгеновской пленки) фрагментов геномной ДНК, содержащей локус *foxp3* дикого типа и таргетированный локус. (В) Анализ популяций CD4 и CD8 Т-клеток из лимфоидных органов мышей *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup>, синтезирующих YFP и Foxp3, методом проточной цитометрии.

### Генетическая модель для индукции Трег-специфического Cre-loxP нокаута генов во взрослых мышцах

Несмотря на то, что создание мышей линии *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup> позволяет добиться эффективного выключения генов в *Foxp3*+ Т-клетках, данная генетическая модель имеет существенные ограничения. Активация промотора *Foxp3* вскоре (через 3 дня у мышей) после рождения приводит к тому, что сопутствующая синтезу *Foxp3* продукция

рекомбиназы вызывает нокаут выбранного гена во всех Трег организма. В случае, если выключен важный белок, необходимый для развития, либо для развития и функционирования Трег, это приведет к спонтанному воспалению и лимфопролиферации, которая может негативно повлиять на поддержание количества и функций Трег. Хроническое воспаление вызванные нокаутом в раннем постнатальном периоде жизни может существенно исказить и нарушать интерпретацию результатов и препятствовать выяснению функции отдельных молекул у взрослых животных. Чтобы обойти эти затруднения, необходимо создать линию, позволяющую нокаутировать гены интереса в Трег взрослых мышей. Было предложено создать конструкцию, кодирующую представленную выше химеру EGFP-Cre, к которой добавлен фрагмент рецептора эстрогена, удерживающий результирующий белок в цитоплазме, препятствуя рекомбинации в отсутствие лиганда (Palmitter, 2002). При условии, что создаваемая конструкция будет экспрессироваться в составе локуса *Foxp3* только в Трег, можно путем введения мышам индуктора – тамоксифена, добиться перемещения рекомбиназы в ядро клетки, что должно привести к Cre-зависимой рекомбинации во «взрослых» Трег.

Выбранная стратегия таргетирования 3'UTR локуса *Foxp3* (см. выше) позволила создать мышей для индуцибельной рекомбинации Cre/loxP, несущих кассету, содержащую внутренний сайт посадки рибосом (IRES) и последовательность ДНК, кодирующую «тройной» белок, состоящий из зеленого флуоресцентного белка (eGFP), рекомбиназы Cre и мутированного лиганд-связывающего домена рецептора эстрогена человека (ERT2), и встроенную в 3'-нетранслируемую область гена *Foxp3*.

Мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>* скрестили с мышами, которые экспрессировали репортерный аллель *ROSA26*, содержащий фланкированную сайтами loxP кассету, вырезание которой приводит к синтезу YFP (рис. 2). У мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y* белок GFP-CreERT2 локализован в цитозоле и, следовательно, YFP не экспрессируется, но обработка тамоксифеном позволяет направить химеру с Cre в ядро, а также индуцировать конститутивную и наследуемую экспрессию YFP в клетках *Foxp3+* Трег в момент введения тамоксифена. Важно, что, в отличие от непрерывного мечения, эта стратегия позволяет избежать постоянного включения в меченую популяцию клеток, которые временно активируют ген *Foxp3*, и позволяет оценить содержание истинных клеток Трег.

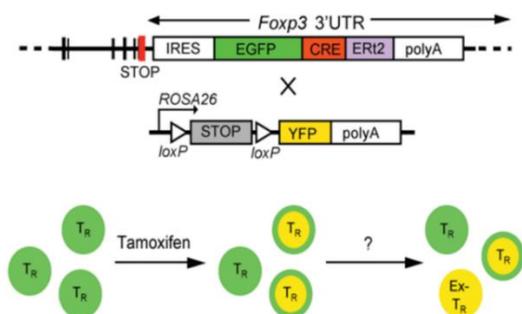


Рисунок 2. Мыши для индуцируемого мечения *Foxp3+* Т-клеток *in vivo*. Схема скрещивания knock-in аллеля *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>* с репортерными мышами R26Y. Введение полученным животным *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y* тамоксифена вызывает появление популяции Т-клеток CD4+ с характерной продукцией GFP и YFP.

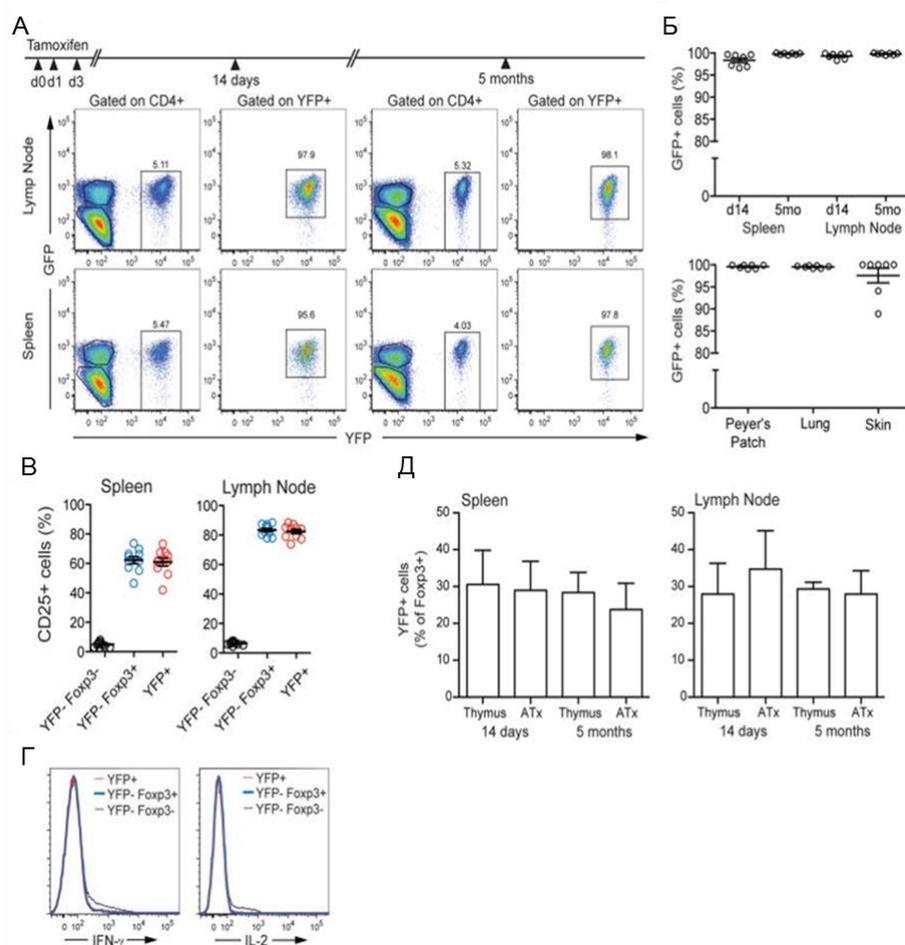


Рисунок 3. Индуцибельное мечение клеток Foxp3+ выявляет стабильность Трег в нормальных условиях.

(А) Репрезентативный анализ экспрессии Foxp3 через 14 дней и 5 месяцев после обработки тамоксифеном. Показаны субпопуляции YFP+, YFP-GFP+ и YFP-GFP- Т-хелперов и доля клеток GFP+ среди YFP+ клеток. (Б) Процент клеток YFP+, экспрессирующих GFP, в лимфоидных органах, проанализированных как в (А), через 5 месяцев после введения тамоксифена (внизу). (В) Анализ экспрессии CD25 в

субпопуляции клеток CD4+ через 5 месяцев после обработки тамоксифеном. (Г) Спленциты мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y* через 5 месяцев после введения тамоксифена, были стимулированы РМА и иономицином *in vitro*, для определения продукции IFN $\gamma$  и IL-2. Показана экспрессия IFN $\gamma$  и IL-2 в популяциях YFP+Foxp3+, YFP-Foxp3+ и YFP-Foxp3-. (Д) Доля YFP-меченных клеток среди клеток Foxp3+ на периферии тимэктомированных и не-тимэктомированных мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> x R26Y* через 14 дней и 5 месяцев после введения тамоксифена. АТх: тимэктомия у взрослых. Данные представляют результаты трех независимых экспериментов (n $\geq$ 3 на группу) с мышами 6-8 недель.

У мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y* нормальное количество двойных и одиночных положительных тимоцитов CD4 и CD8, и Т-клеток CD4+ и CD8+ во вторичных лимфоидных органах (рис. 3 и 4). Экспрессия мутантного гена *Foxp3* и связанного с ним eGFP были практически неотличимы от экспрессии белка Foxp3 у контрольных мышей. eGFP можно было детектировать только в клетках, синтезирующих Foxp3 (рис. 3 и 5). Продукция YFP не происходила в клетках eGFP+ в отсутствие тамоксифена, а при его введении детектировалась только в клетках, синтезирующих Foxp3 (рис. 5).

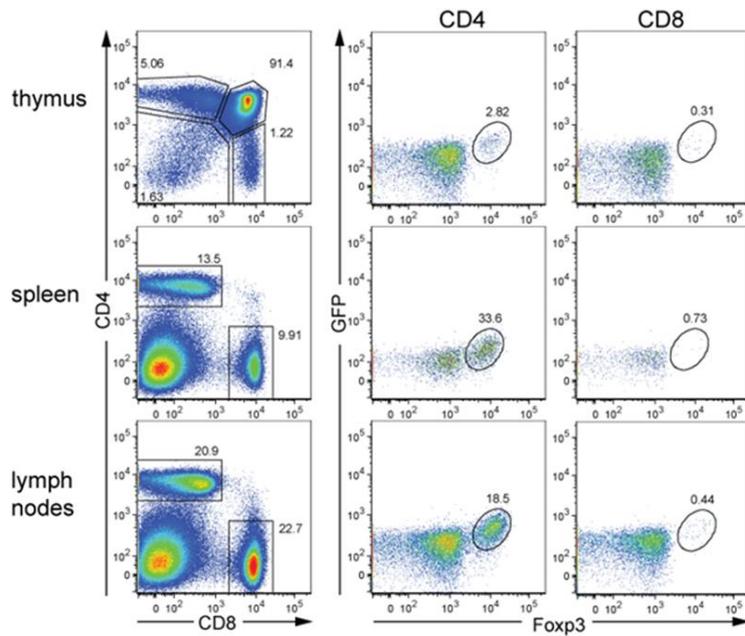


Рисунок 4. Нормальное созревание тимусных и периферических популяций Т-клеток у животных генотипа *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y*. Показаны результаты проточной цитометрии суспензий тимоцитов, спленоцитов и лимфоцитов мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y*, окрашенных на соответствующие маркеры (CD4, CD8 и Foxp3). Видно, что пропорции клеток соответствующих популяций соответствуют нормальным значениям для мышей дикого типа.

Обработка тамоксифеном дает три основные популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток: eGFP-YFPFoxp3<sup>-</sup> или "не-Трег" клетки, eGFP+YFP- клетки Foxp3<sup>+</sup> Трег, в которых не произошло мечение, и меченые клетки eGFP+YFP+Foxp3<sup>+</sup> (рис. 3 и 5). Важно отметить, что как меченные YFP, так и не меченные клетки eGFP+Трег содержали идентичные с контрольными количества Foxp3, а также фенотипических и активационных маркеров, характерных для Трег (рис. 6).

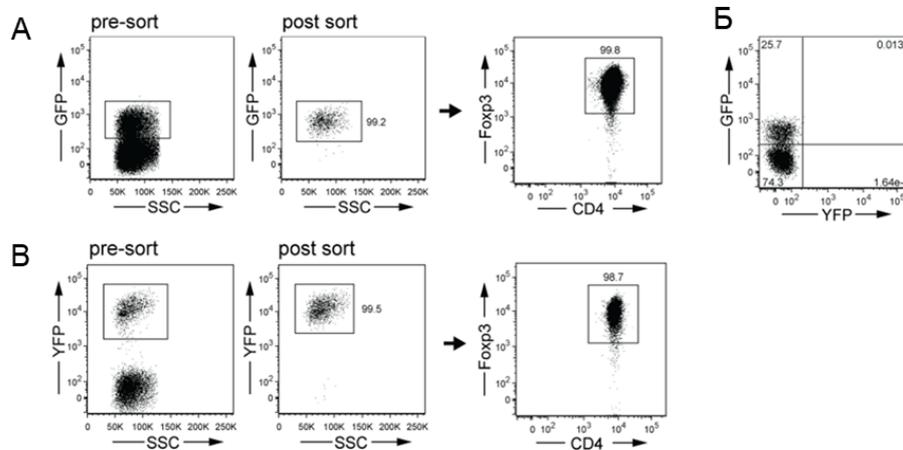


Рисунок 5. Продукция YFP и GFP в мышцах *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y* (A) Клетки, содержащие GFP (GFP<sup>+</sup>), очищали с помощью проточного цитометра, совмещенного с сортером, до чистоты >99%, затем внутриклеточно

окрашивали на Foxp3; (Б) Анализ синтеза YFP и GFP в спленоцитах мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup> xR26Y* до обработки тамоксифеном с помощью проточной цитометрии; (В) Индуцируемая тамоксифеном продукция YFP совпадает с синтезом Foxp3 в клетках. YFP<sup>+</sup> клетки, полученные в ходе обработки тамоксифеном, были отсортированы до чистоты >99%, окрашены внутриклеточно на Foxp3 и проанализированы на Foxp3 и GFP.

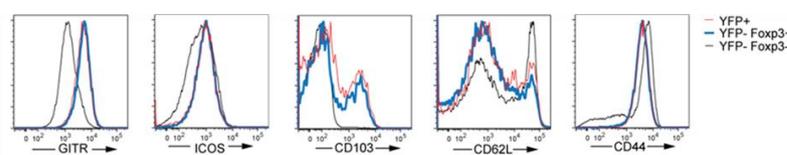


Рисунок 6. Меченые YFP Трег фенотипически схожи с немечеными Foxp3<sup>+</sup> Трег. Оценивали экспрессию маркеров GITR, ICOS, CD103, CD62L

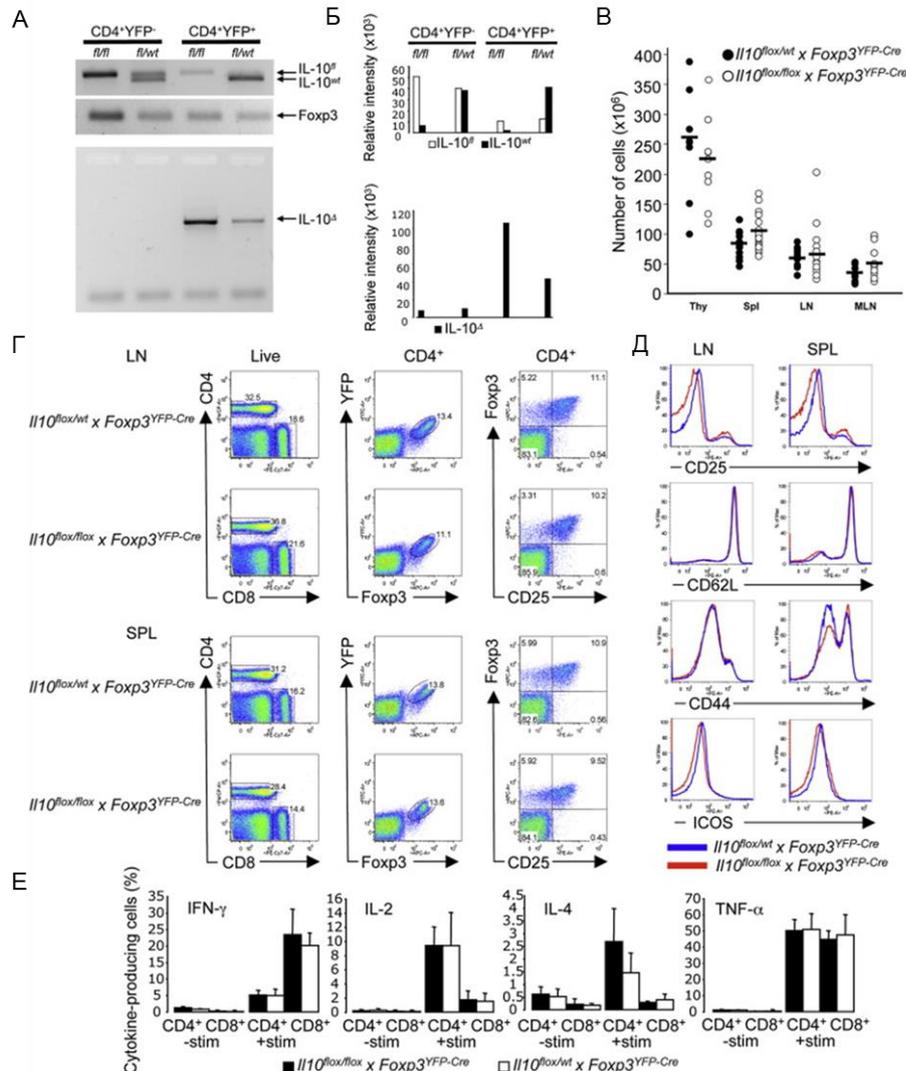
и CD44 в популяциях YFP<sup>+</sup>, YFP-GFP<sup>+</sup> и YFP-GFP<sup>-</sup> Т-клеток.

## **II. ВЫЯСНЕНИЕ РОЛИ ИЛ-10, СЕКРЕТИРУЕМОГО ТРЕГ, В ЗАЩИТЕ ОТ СИСТЕМНОГО И ЛОКАЛЬНОГО АУТОИММУНИТЕТА**

**Абляция ИЛ-10 в клетках Трег не нарушает их развития и не приводит к системному аутоиммунитету**

Чтобы исследовать роль эффекторных молекул, в частности ИЛ-10, в супрессии, опосредованной клетками Трег, в рамках данной работы были созданы мыши Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>, способные к специфической для клеток Трег инактивации представляющих интерес генов. ИЛ-10 играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза ЖКТ. На момент, когда было начато данное исследование, было известно, что мыши с полным нокаутом ИЛ-10, а также животные, у которых продукция этого цитокина выключена в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Roers, 2004), страдают во взрослом возрасте от спонтанного колита, сопровождающегося повышенной инфильтрацией иммунных клеток в эпителий кишечника, жидкого стула, а также хронического выпадения прямой кишки. У этих животных происходит значительная потеря веса. Симптомы спонтанного воспалительного заболевания толстого кишечника у мышей с полным или ограниченным Т-клетками нокаутом ИЛ-10 напоминают симптомы патологий человека, собранных под названием IBD (inflammatory bowel disease), к которым относится болезнь Крона. Тот факт, что адоптивный перенос Т-клеток с дефицитом ИЛ-10 не защищал мышей с индуцированным декстран сульфатом колитом от заболевания, дополнительно подчеркивает значимость продукции ИЛ-10 Т-клетками для поддержания иммунного равновесия в кишечнике, где иммунная система контактирует с комменсальными микроорганизмами (Powrie, 2005). Неконтролируемый ответ на микробные антигены должен приводить к воспалению кишечника и постепенному нарушению его барьерных функций. В то же время, было показано, что уровень продукции ИЛ-10 очищенных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Трег гораздо выше, чем у обычных Т-клеток (Christensen, 2005). Это позволяет предположить, что именно продукция ИЛ-10 Трег с фенотипом CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> может отвечать за поддержание иммунного баланса в кишечнике, защищая мышей от развития спонтанного колита.

Рисунок 7. Отсутствие системного аутоиммунитета и нормальное развитие Трег у мышей с дефицитом IL-10 в Трег. (А) Удаление гена *Il10* у мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* ограничено подмножеством клеток Foxp3<sup>+</sup> Трег. ПЦР-анализ подгрупп YFP-Cre<sup>+</sup> и YFP-Cre-CD4<sup>+</sup> на наличие аллелей *Il10* дикого типа (Il10WT), без делеции (Il10fllox) или с делецией (Il10Δ). Геномную ДНК выделяли из указанных популяций очищенных Т-клеток CD4 мышей *Il10<sup>fllox</sup> / flox × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* (fl/fl) и *Il10<sup>WT</sup> / flox × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* (fl/wt) (показаны результаты



репрезентативного эксперимента). (Б) Гистограммы показывают относительную интенсивность указанных продуктов ПЦР, нормализованную по интенсивности полосы Foxp3, используемой в качестве контрольного продукта ПЦР. (В) Число клеток тимуса и вторичных лимфоидных органов у мышей в возрасте от 8 до 10 недель не зависит от абляции IL-10 в клетках Трег. Каждый символ – это число мононуклеаров в тимусе (Thy), селезенке (Spl), лимфатических узлах (LN) и брыжеечных лимфатических узлах (MLN) животных *Il10<sup>fllox</sup> / flox × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и *Il10<sup>WT/flox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*. LN соответствует пулированным LN, исключая MLN. (Г) Протоочно-цитометрический анализ Т-клеток селезенки и лимфатических узлов мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и *Il10<sup>WT/flox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*. (Д) Протоочно-цитометрический анализ экспрессии маркеров активации Т-клетками селезенки и лимфатических узлов мышей *Il10<sup>fllox</sup> / flox × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и *Il10<sup>WT/flox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* 5-8 недель. Клетки окрашивали на CD4, CD8, CD25, CD62L и CD44. (Е) Анализ внутриклеточной экспрессии цитокинов в спленоцитах, стимулированных связанными с поверхностью планшета антителами к CD3 и CD28. Спленоциты были выделены из 6-8-недельных мышей *Il10<sup>fllox</sup> / flox × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и *Il10<sup>WT/flox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и после 5-часовой активации окрашены на CD4, CD8, IL-2, IL-4, IFNγ, и TNFα.

Для создания мышей, у которых дефицит IL-10 был ограничен только клетками Трег, мышью  $Il10^{flox/flox}$ , содержащих сайты loxP, фланкирующие первый экзон гена  $Il10$ , (любезно предоставлены профессором В. Мюллером), скрестили с мышами  $Foxp3^{YFP-Cre}$ . ПЦР-исследование геномной ДНК дикого типа ( $Il10^{WT}$ ), а также интактных ( $Il10^{flox}$ ) и рекомбинированных ( $Il10\Delta$ ) аллелей гена  $Il10$  в FACS-очищенных  $YFP^+CD4^+$  и  $YFP^-CD4^+$  Т-клетках показало высокую эффективность делеция в  $YFP^+CD4^+$  Т-клетках, т. е.  $Foxp3^+$  Трег-клетках, у самцов гемизиготных мышей  $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , тогда как аллель  $Il10\Delta$  не обнаруживалась в  $YFP^-$  «не-Трег»  $CD4^+$  Т-клетках. Кроме того, аналогичный анализ гетерозиготных мышей  $Il10^{flox/WT} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  обнаруживает интактные аллели  $Il10^{flox}$  и  $Il10^{WT}$  в клетках  $YFP-Cre^-$ , тогда как клетки  $YFP-Cre^+$  Трег содержали  $Il10^{WT}$  и  $Il10\Delta$  (рис. 7 А и Б) Чтобы проверить специфичность делеции аллеля  $Il10^{flox}$  на уровне белка, стимулировали спленоциты от мышей  $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и контрольных мышей  $Il10^{flox/WT} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  *in vitro* и определили пропорцию и число продуцирующих IL-10 клеток, которое было значительно меньше в популяции, позитивной по  $Foxp3$ , но не в  $Foxp3$ -негативных  $CD4^+$  Т-клетках.

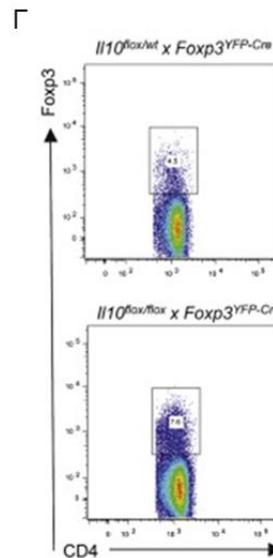
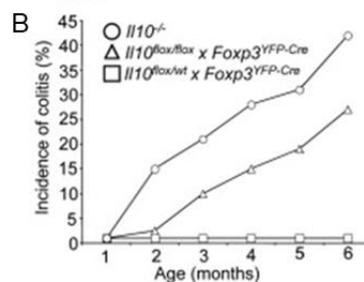
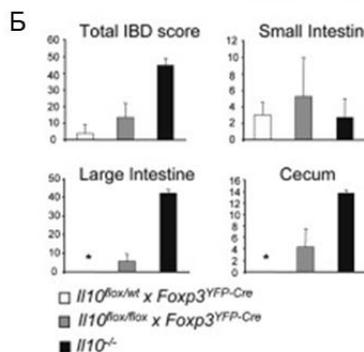
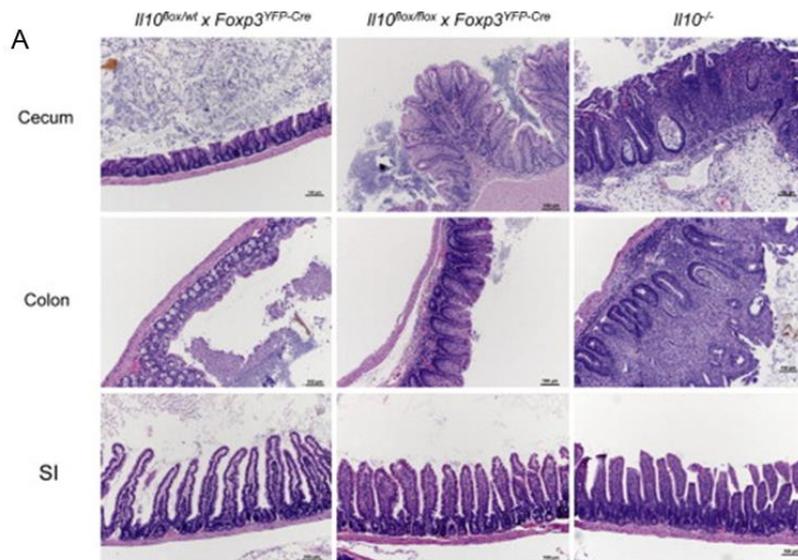
Самцы мышей  $Il10^{fl/fl} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и самки  $Il10^{fl/fl} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  не имели признаков патологии до 8 недель (рис. 7). Т-клетки из вторичных лимфоидных органов и тимоциты, не отличались от аналогичных популяций нормальных мышей (рис. 7Г,Д). Секреция характерных для Т-клеток цитокинов IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$   $CD4^+$  Т-клетками была неотличима у молодых экспериментальных и контрольных животных (рис. 7Е). Это означает, что супрессорная способность Трег этих мышей не затронута; поскольку дефицит Трег или потеря ими супрессии резко увеличивает продукцию цитокинов Т-клетками и лимфопролиферацию. Не было выявлено и признаков аутоиммунной патологии тканей при гистологическом исследовании мышей  $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . Единственным отличием было воспаление толстой кишки у части животных, которые были старше 8 недель (см. ниже).

#### **У мышей $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ развивается спонтанный колит**

У мышей с полным нокаутом ( $Il10^{-/-}$ ) или абляцией гена  $Il10$  в Т-клетках ( $Il10^{flox/flox} \times CD4-Cre$ ) развивается спонтанное воспаление в кишечнике, при котором заметную роль играет инфекция *Helicobacter sp.* По результатам одной из работ, у 40% мышей  $Il10^{-/-}$  и меньшего процента мышей  $Il10^{fl/fl} \times CD4-Cre$  примерно через 6 месяцев после рождения документирован тяжелый колит, который по симптомам схож с болезнью Крона или IBD у человека (Roers, 2004).

Чтобы выяснить, приводит ли специфический дефицит Трег по IL-10 к спонтанному колиту, в течение продолжительного времени наблюдали большие

Рисунок 8. Зависимый от возраста спонтанный колит у мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . (А) Окрашенные гематоксилином и эозином срезы слепой кишки (верхний ряд), толстой кишки (средний ряд) и тонкого кишечника (нижний ряд) 3-месячных мышей с полным нокаутом IL-10 и мышей с дефицитом IL-10 исключительно в Трег. Контрольные срезы гетерозиготных мышей  $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  показаны слева. Исходное увеличение для всех изображений 10X. (Б) Показатели IBD тонкого и толстого кишечника и слепой кишки приблизительно 3-месячных мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , контрольного помета  $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$



$Cre$  и мышей  $Il10^{-/-}$ . Фиксированные формалином срезы окрашивали гематоксилином и эозином перед исследованием. Показаны средние показатели патологии  $\pm$  стандартная ошибка для групп; в каждой группе было 3–6 мышей. (В) Заболеваемость клиническим колитом у мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и  $Il10^{-/-}$ . Количество животных в каждой когорте:  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , 140;  $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , 128; и  $Il10^{-/-}$ , 42. (Г) Проточно-цитометрический анализ клеток Foxp3+ Трег толстой кишки у мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . IEL и LPL толстой кишки были выделены из трех мышей каждого генотипа, объединены и окрашены на CD4, CD8, ТКР $\beta$  и Foxp3. Показаны гейты для клеток CD4+CD8-ТКР $\beta$ +

группы мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и контрольных мышей

$Il10^{lox/WT} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . В качестве положительного контроля использовали когорту мышей  $Il10^{-/-}$ . Начиная примерно с 10-недельного возраста, животные  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , но не контрольная группа, демонстрировали симптомы колита. Слепая гистологическая оценка срезов желудка, тонкой и толстой кишки мышей  $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  показала, что, слепая кишка подвергалась значительной мононуклеарной инфильтрации эпителиальной

ткани, а также деградации ткани (рис. 8А и 8Б). Воспаление толстой кишки, наблюдаемое у мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , было гистологически сходно с наблюдаемым у мышей  $Il10^{-/-}$ , хотя и менее выраженным (рис. 8А и 8Б). Колит у мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  не был вызван недостатком Трег в толстой кишке, поскольку анализ популяции Т-клеток толстой кишки показал увеличенный размер подмножества Foxp3+Трег с неизменной экспрессией Foxp3 в пересчете на каждую клетку у мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  по сравнению с контрольными мышами  $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  (рис. 8Г). Таким образом, дефицитные по IL-10 Трег присутствуют в ткани толстой кишки, но не способны сдерживать воспаление в ответ на микрофлору кишечника.

### Повышенная гиперреактивность легких у мышей $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$

Помимо проблем с толстым кишечником, гистологическое исследование выявило периваскулит и умеренную мононуклеарную инфильтрацию вокруг крупных дыхательных путей мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , но не контрольных гетерозиготных мышей (рис. 9А).

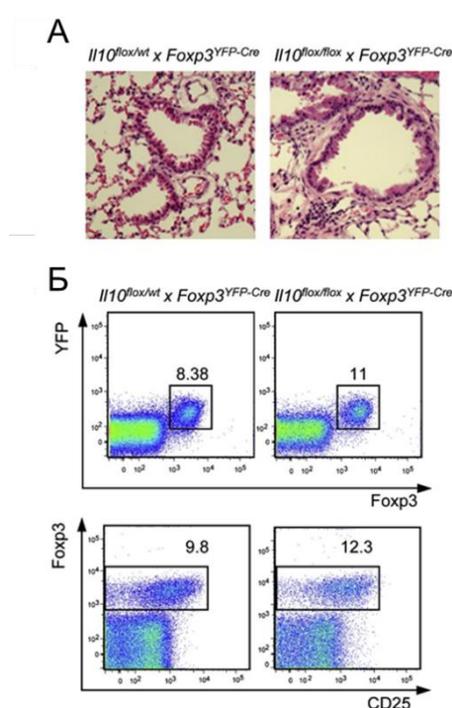


Рисунок 9. Незначительное перибронхиальное воспаление и нормальный размер популяции Foxp3+ Трег в легких мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  (А) Гистологические срезы легких мышей с Трег-специфическим нокаутом гена IL-10. Фиксированные срезы легких 3-месячных мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и  $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  окрашивали гематоксилином и эозином. Исходное увеличение 10X. (Б) Проточно-цитометрический анализ Foxp3+ Трег в легочной ткани мышей  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и  $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . Мононуклеарные клетки выделяли из перфузированных PBS легких. Клетки из трех мышей каждого генотипа объединяли и окрашивали на CD4, CD8, CD25 и Foxp3. Показаны гейты для CD4+CD8- Т-клеток. Представлены результаты двух идентичных экспериментов.

Анализ популяций Т-клеток лёгких, показал сохранность субпопуляции Foxp3+ Т-клеток у животных с генотипом  $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , пропорция которых соизмерима с аналогичной популяцией мышей  $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  (рис. 9Б). Важно, что приблизительно 12% Foxp3+ Т-клеток в легких синтезируют IL-10, согласно анализу мышей-репортеров IL-10 (Maynard, 2007).

Данное наблюдение позволяет предположить, что секреция IL-10 легочными Трег важна для контроля индуцированного антигеном воспаления легких, вызываемого, к

примеру, иммунизацией мышей куриным овальбумином (OVA). С целью получения прямого ответа на вопрос о роли продуцируемого легочными Трег IL-10 в контроле воспаления, мы индуцировали с помощью OVA воспаление легких у мышей  $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  и контрольных животных  $Il10^{WT/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . Был использован оптимизированный режим иммунизации OVA, чтобы минимизировать индуцированное воспаление легких у контрольной группы мышей (Henderson, 1996; Zhang, 1997).

Интраназальное введение OVA животным, которых предварительно внутрибрюшинно иммунизировали комплексом OVA с гидроксидом алюминия, вызывало усиленное воспаление, проявляющееся примерно в 3-кратном увеличении количества лейкоцитов в бронхоальвеолярных смывах (BAL), полученных при промывке фосфатным буфером легких получавших OVA  $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$  мышей по сравнению с контрольными животными  $Il10^{WT/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ . Гистологическое исследование в сочетании с морфометрией легочной ткани у мышей-мутантов показало увеличение количества слизи, числа бокаловидных клеток и отек, а также увеличение массы клеточных инфильтратов, связанных с увеличением количества эозинофилов вокруг крупных дыхательных путей (рис. 10Б).

Газодинамическое сопротивление легких сенсibilизированных OVA мутантных мышей было измерено с помощью инвазивной плетисмографии. В соответствии протоколом сенсibilизации OVA у экспериментальных и контрольных животных при индукции субоптимального воспаления легких у мышей дикого типа ни у животных с нокаутом IL-10 в Трег, ни у контрольных мышей  $Il10^{WT/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , обработанных физиологическим раствором, не наблюдалось заметного увеличения гиперреактивности дыхательных путей при вдыхании аэрозоля метахолина. Однако значительное увеличение гиперреактивности дыхательных путей в ответ на вдыхаемый метахолин происходило у мышей  $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ , получавших OVA, но не у мышей, получавших физиологический раствор (рис. 10В). Повышенное воспаление в легких у мутантных мышей не было следствием уменьшения количества IL-10-дефицитных Трег-клеток в воспаленной легочной ткани, поскольку у мутантных OVA-стимулированных мышей был обнаружен увеличенный размер популяции легочных Foxp3<sup>+</sup> Трег-клеток. Таким образом, как и в воспаленной ткани толстой кишки, дефицитные по IL-10 клетки Трег присутствуют в легких в повышенном количестве; однако они не обеспечивают полной защиты от чрезмерных воспалительных реакций, инициируемых переносимым по воздуху антигеном (в нашем случае OVA).

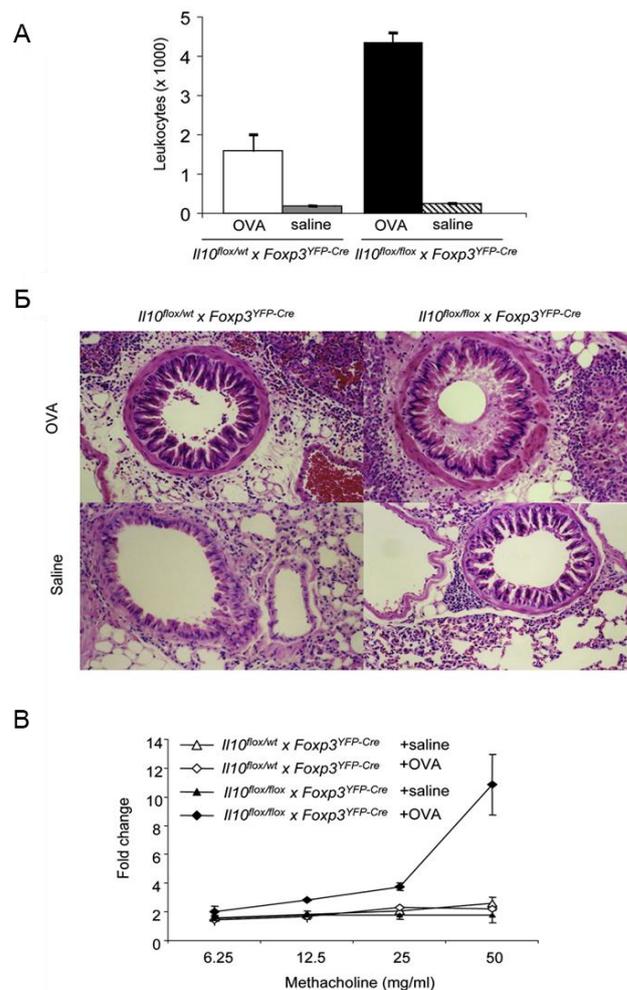


Рисунок 10. Увеличение аллергического воспаления легких и гиперреактивности у мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*. (А) Увеличенное количество лейкоцитов в жидкости BAL у мышей *Il10<sup>WT/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*, иммунизированных OVA, индуцированных при стимуляции OVA или физиологическим раствором (контроль). Данные представляют среднее число лейкоцитов BAL ± стандартная ошибка (n=8 на группу в каждом из трех независимых экспериментов). (Б) Гистопатология легких мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*, сенситизированных OVA, и контрольных мышей *Il10<sup>WT/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*. Мышам, праймированным OVA или физиологическим раствором (контроль), повторно интраназально вводили OVA или физиологический раствор. Исходное увеличение 40X. (В) Увеличенное газодинамическое сопротивление легких мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*, иммунизированных OVA. Индуцированную метахолином резистентность легких измеряли с помощью инвазивной плетисмографии мышей *Il10<sup>fllox/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и *Il10<sup>WT/fllox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*,

получавших OVA при иммунизации и сенситизации (n=4–5 на группу). Данные представлены как среднее n-кратное изменение значений RL (± стандартная ошибка) по сравнению с мышами не получавшими метахолин.

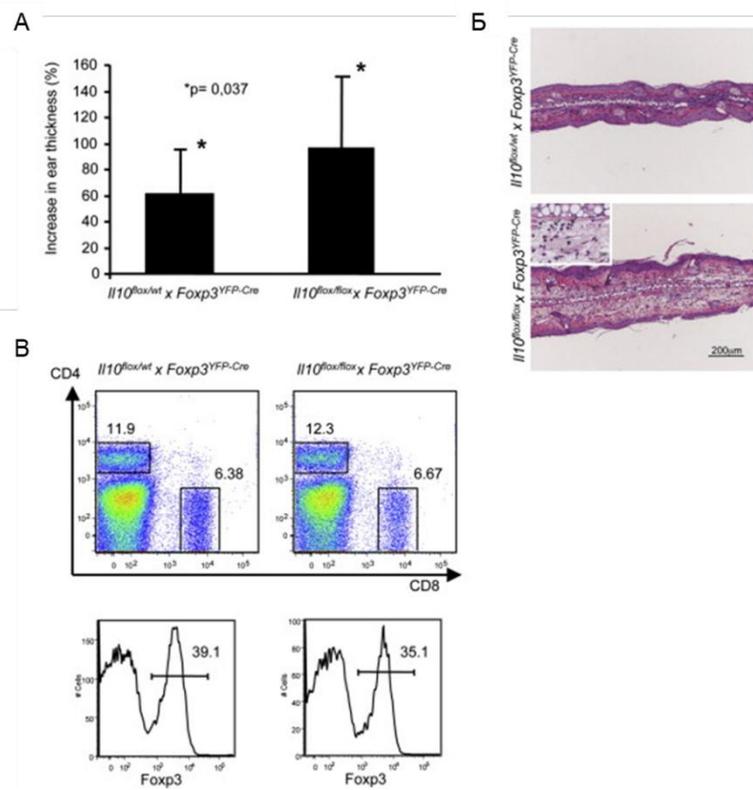


Рисунок 11. Повышенная контактная гиперчувствительность кожи у мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>*. (А) Увеличение толщины уха у мышей с нокаутом IL-10 в Трег, по сравнению с контролем. (Б) Фотография срезов ушей, окрашенных гематоксилином/эозином после обработки DNFB. (В) Процентное содержание Трег в коже ушей контрольных и нокаутных мышей. На нижних гистограммах приведен процент от CD4 Т-клеток.

**мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>***

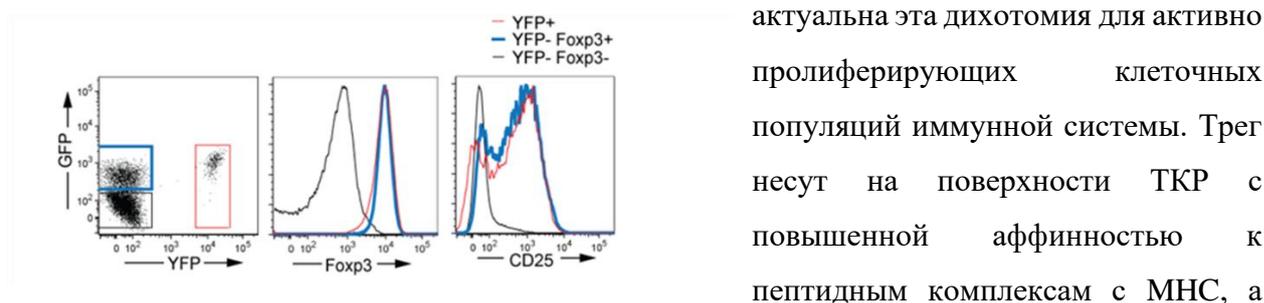
**Повышенная гиперчувствительность кожи у**

Исследование срезов кожи мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* не выявило заметного накопления мононуклеаров или утолщения кожи, типичного для ранее описанных мышей с нокаутом по Foxp3, и мышей *Foxp3<sup>DTR</sup>*, подвергнутых абляции клеток Трег путем введения дифтерийного токсина (Fontenot, 2003; Kim, 2007). Мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* и контрольных мышей *Il10<sup>WT/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* сенсibilizировали динитрофторбензолом (DNFB), а затем вызывали гиперчувствительность, нанося DNFB на кожу уха (на контрольное ухо наносили растворитель). Происходило значительное увеличение толщины уха и усиление воспаления у мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* по сравнению с контрольными животными (рис. 11А и Б). Чтобы выяснить, была ли повышенная гиперчувствительность кожи у мышей *Il10<sup>lox/lox</sup> × Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* вызвана дефицитом миграции Трег, исследовали подмножества CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных из ушей мутантных мышей. Пропорции Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток в коже мутантных и контрольных мышей были примерно равны (рис. 11В). Таким образом, клетки Трег, лишённые продукции IL-10, не столь эффективны в борьбе с воспалением в коже. В совокупности наши исследования показывают, что продукция IL-10 клетками Трег ограничивает воспаление в барьерных тканях, контактирующих с внешними антигенами и, в то же время, не играет существенной роли в предотвращении спонтанного системного аутоиммунитета.

### III. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЫШЕЙ $FOXP3^{EGFP-CRE-ERT2}$ ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ T<sub>REG</sub> У ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ

**Экспрессия Foxp3 стабильна в T<sub>reg</sub> в нормальных условиях в течение длительного времени**

Вопрос о поддержании численности и функции дифференцированных клеток – это один из главных вопросов клеточной биологии. Баланс между стабильностью и пластичностью дифференцированных клеток определяет грань между нормой и патологическими процессами дегенеративного замещения тканей и органов. Особенно



актуальна эта дихотомия для активно пролиферирующих клеточных популяций иммунной системы. T<sub>reg</sub> несут на поверхности ТКР с повышенной аффинностью к пептидным комплексам с МНС, а

абляция кондиционного аллеля Foxp3 в зрелых T<sub>reg</sub> приводит к образованию «бывших» или экс-T<sub>reg</sub>, вызывающих воспалительные поражения тканей (Williams,2007). Таким образом, стабильность экспрессии Foxp3 в нормальных и воспалительных условиях является важной детерминантой иммунного гомеостаза и имеет непосредственное отношение к вопросу о том, представляют ли T<sub>reg</sub> стабильную линию или преходящее метастабильное состояние активации. Генетическое маркирование и отслеживание судьбы клеток – это способ для оценки стабильности линии и идентификации механизмов поддержания гомеостаза ткани *in vivo*.

Рисунок 12. Индуцируемое мечение Foxp3<sup>+</sup> клеток в мышах  $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} \chi R26Y$ . Введение животным тамоксифена (перорально) приводит к образованию трех популяций CD4<sup>+</sup> Т-клеток, различающихся по наличию YFP и GFP. Приведены результаты анализа CD25 и Foxp3 в популяциях YFP<sup>+</sup>, YFP-GFP<sup>+</sup> и YFP-GFP<sup>-</sup> клеток.

Чтобы оценить долговременную стабильность клеток Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> в базальных условиях, мышей  $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} \chi R26Y$  обрабатывали тамоксифеном и спустя 2 недели или 5–8 месяцев анализировали содержание Foxp3 в YFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетках (рис.12). Подавляющее большинство YFP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток оставалось GFP-положительными в лимфатических узлах, селезенке, бляшках Пейера, коже и легких до 5 месяцев после введения тамоксифена (рис. 3А, 3Б). Этот результат подтвержден внутриклеточным окрашиванием на Foxp3 выделенных с помощью FACS-сортировки клеток YFP<sup>+</sup> (рис. 5). Кроме того, количество

характерных молекул Трег на поверхности клеток, было соизмеримо между клетками YFP+ и YFP+GFP+ (рис. 6, рис. 13, рис. 14), а продукция провоспалительных цитокинов, таких как IL-2 и IFN- $\gamma$ , была сравнительно низкой в обеих подгруппах (рис. 3Г).

Незначительная популяция клеток eGFP-YFP+, наблюдаемая через 14 дней после мечения, не увеличивалась и фактически со временем снижалась (рис. 3В). Таким образом, не происходило заметного «превращения» Трег-клеток и их потомства в фолликулярные Т-хелперные (TFH) или эффекторные Т-клетки, или де-дифференцировки Трег в наивные Т-клетки в физиологических условиях.

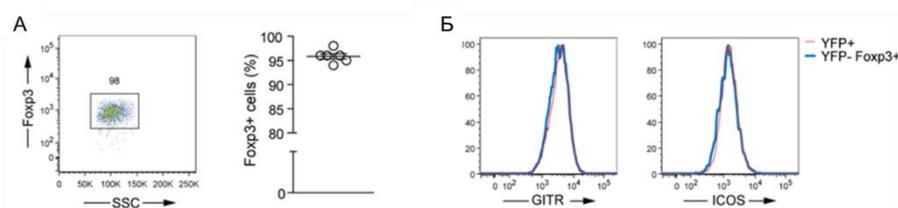


Рисунок 13. Сохранение высокого уровня Foxp3 и фенотипа, характерного для Трег, в клетках меченых YFP. (А) YFP+ Т-клетки из

селезенки и лимфатических узлов мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>χR26Y* окрашивали на Foxp3 внутриклеточно через 5 месяцев после индукции тамоксифеном. (Б) Уровень маркеров ICOS и GITR в YFP+GFP+ и YFP-GFP+ Трег.

У эутимированных мышей доля клеток YFP+ Трег среди всех клеток Foxp3+ через 5–8 месяцев после мечения была сравнима с таковой, наблюдаемой через 14 дней, несмотря на постоянный, хотя и снижающийся с возрастом выход новых Трег из тимуса на периферию (рис. 3Д). Кроме того, удаление тимуса не влияло на долю клеток YFP+ Трег в возрастных мышях (рис. 3Д). Вероятно, в пуле периферических Трег высока доля активно делящихся клеток, что обеспечивает самобновление Трег на периферии, вне зависимости от событий в тимусе.

### Блокирование IL-2 путем хронического введения моноклональных антител снижает уровень Foxp3 в популяции Трег

Неожиданная стабильность натуральных Трег подтолкнула к поиску условий, которые позволят детектировать потерю Foxp3 Трег. Трег зависят от передачи сигнала через рецептор интерлейкина-2 (IL-2), а опосредованная антителами блокада IL-2 или IL-2R, согласно существующим данным, вызывает сокращение популяции Трег. Связана ли депривация IL-2 зрелых клеток Трег со смертью или потерей экспрессии Foxp3 и сопутствующим приобретением эффекторных функций? Мышам *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>χR26Y*, обработанным тамоксифеном, вводили нейтрализующие антитела к IL-2. Депривация IL-2 приводила к уменьшению общего количества клеток Foxp3+ Трег на ~ 30% и умеренному снижению количества белка Foxp3 на уровне отдельных клеток (рис. 14, А-В).

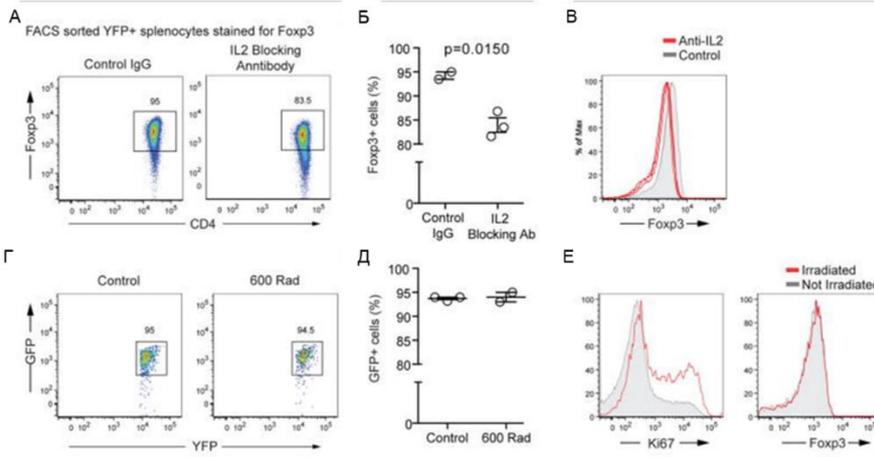


Рисунок 14. Депривация IL-2 приводит к небольшому, но заметному снижению уровня Foxp3 в Трег. (А – В) Мышам *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>хR26Y*, обработанным тамоксифеном, инъецировали блокирующее IL2 антитело или контрольное IgG, уровень Foxp3 в FACS-

отсортированных клетках YFP+ оценивали через 9 дней после начала введения блокирующих антител. (А) Внутриклеточное окрашивание на Foxp3 YFP+ клеток селезенки. (Б) Процент клеток YFP+, экспрессирующих Foxp3. (В) Относительная экспрессия Foxp3 в клетках YFP+ из селезенки мышей, обработанных антителом, блокирующим IL2. Данные одного из трех независимых экспериментов ( $n \geq 2$  мышей 6-8 недель на группу). (Г – Е) Трег поддерживают стабильный уровень Foxp3 в условиях лимфопении. Мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>хR26Y*, обработанных тамоксифеном, облучили нелетальной дозой (600 рад) и проанализировали через 14 дней. (Г) Репрезентативный анализ количества Foxp3 в клетках селезенки контрольных и облученных мышей через 14 дней. (Д) Процент клеток GFP+ среди клеток YFP+ в селезенке через 14 дней после облучения. (Е) Репрезентативный анализ продукции Foxp3 и Ki67 YFP+ спленоцитами на 14-й день после облучения. Данные получены по результатам 2 и более экспериментов ( $n \geq 2$  на группу мышей 8-12 недель).

Более того, небольшая часть клеток YFP+ полностью потеряла Foxp3. Дерепрессия генов провоспалительных цитокинов (IFN $\gamma$ , IL-17, IL-2 и TNF $\alpha$ ) клетками YFP+, YFP-GFP+ Трег

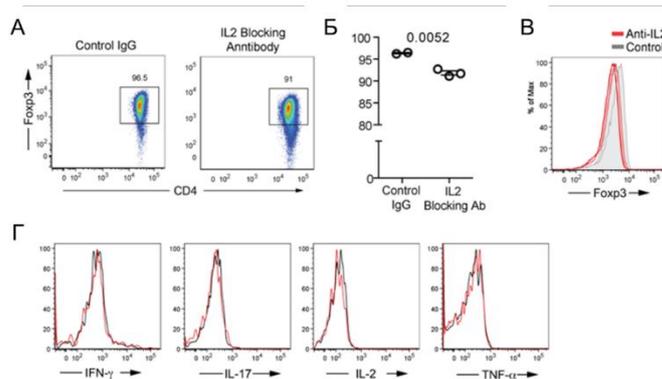


Рисунок 15. Депривация IL-2 приводит к небольшому, но достоверному снижению синтеза Foxp3 в Трег (продолжение). (А-В) Обработанным тамоксифеном мышам *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>хR26Y* вводили блокирующие антитела к IL-2 или контрольные IgG, уровень Foxp3 в отсортированных по YFP клетках определяли 9 дней спустя с помощью

внутриклеточного окрашивания антителами и проточной цитометрии. (А) Внутриклеточное окрашивание Foxp3 в YFP+ клетках из лимфатических узлов. (Б) Процент YFP+ клеток, синтезирующих Foxp3. Каждый символ соответствует отдельной мыши. (В) Изменение продукции Foxp3 в YFP+ лимфоцитах мышей, которым вводили блокирующие антитела к IL-2. (Г) Репрезентативные данные внутриклеточного окрашивания YFP+ клеток антителами к цитокинам IFN-g, IL-17, IL-2 и TNF $\alpha$ . Приведены репрезентативные данные одного из трех независимых экспериментов ( $n \geq 2$  мышей 6-8 недель в группе).

с пониженным уровнем Foxp3 или клетками eGFP-YFP+, которые утратили Foxp3, не происходило (рис. 15). Эти результаты показывают, что снижение уровня Foxp3, вызванное изъятием IL-2, недостаточно для приобретения эффекторных функций.

### Уровень Foxp3 стабилен в условиях лимфопении, вызванной нелетальным облучением

Лимфопения может также способствовать потере экспрессии Foxp3 в активно делящихся клетках Трег. Мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y*, обработанных тамоксифеном, облучали (600 рад), долю клеток eGFP+ и Foxp3+ среди Т-клеток YFP+CD4+ оценивали через 14 дней после облучения. Несмотря на заметное увеличение числа делящихся клеток Трег, отраженное в повышенной пропорции клеток, синтезирующих Ki67 в клетках YFP+ и YFP- Трег, экспрессия GFP и Foxp3 сохранялась в клетках YFP+ (рис. 14Г-Е). Чтобы сравнить стабильность экспрессии белка Foxp3 в клетках Трег у мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y* с таковой у мышей *Foxp3<sup>GFP</sup> in vivo*, клетки CD4+GFP+ из каждой линии мышей дважды очищали с помощью FACS и совместно с клетками Ly5.1+CD4+ переносили реципиентам с нокаутом по бета-цепи ТКР. Через три недели после переноса большинство (~90%) клеток CD4+Ly5.2+ сохраняли экспрессию белка GFP и Foxp3, их процентное содержание среди клеток, перенесенных из обоих штаммов мышей, было сходным (рис. 16), что поддерживает гипотезу о стабильности клеточной линии Трег.

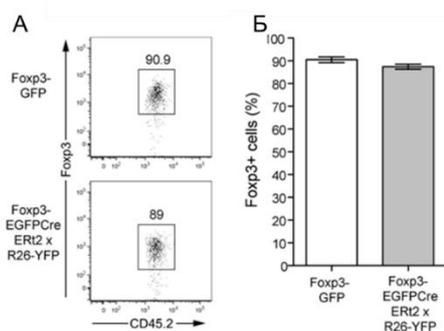


Рисунок 16. Уровень Foxp3 поддерживается на стабильно высоком уровне при трансплантации Трег клеток реципиентам с лимфопенией. (А) Клетки GFP+ выделяли из мышей *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y* или *Foxp3<sup>GFP</sup>* и вводили мышам с лимфопенией, показан процент и уровень синтеза Foxp3 в клетках после трансплантации. (Б) Процент Foxp3+ клеток среди конгенных клеток CD45.2 после трансплантации.

Представлены результаты одного из 2 экспериментов (n=3).

### Инфекция *Listeria monocytogenes* или индукция сильного ответа Th1 не влияют на синтез Foxp3 и стабильность популяции Трег

При инфекциях воздействие на клетки Трег провоспалительных цитокинов приводит к потере экспрессии Foxp3 и превращению клеток Трег в эффекторные Т-клетки, что можно интерпретировать как создание условий, способствующих поляризации эффекторных Т-клеток для эффективной борьбы с патогеном (Campbell, 2009). Чтобы исследовать судьбу

клеток Foxp3<sup>+</sup> Трег во время инфекции, мышей Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y обрабатывали тамоксифеном, а

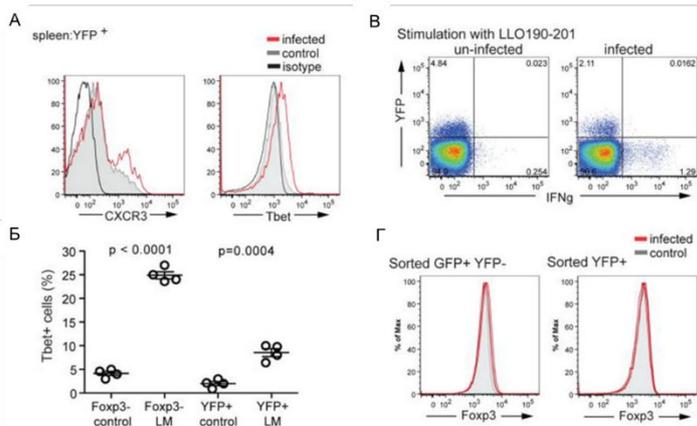


Рисунок 17. Воспаление Th1-типа не вызывает потери Foxp3. Обработанные тамоксифеном мыши Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y были инфицированы внутривенно  $\times 10^3$  КОЕ *Listeria monocytogenes*, анализ проводили через 9 дней. (А) Активация Tbet и CXCR3 в спленocyтoах YFP+CD4<sup>+</sup> у инфицированных мышей. (Б) Процент положительных по Tbet клеток среди спленocyтoв Foxp3<sup>-</sup> и YFP<sup>+</sup>, как определено в (А). (В) Антиген-специфическая продукция IFN $\gamma$  в спленocyтoах, повторно стимулированных пептидом LLO190-201. Показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки; (Г) Экспрессия Foxp3 в отсортированных клетках YFP-GFP<sup>high</sup> или YFP<sup>low</sup> из инфицированных *L. monocytogenes* или контрольных мышей через 9 дней после заражения.

спленocyтoах YFP+CD4<sup>+</sup> у инфицированных мышей. (Б) Процент положительных по Tbet клеток среди спленocyтoв Foxp3<sup>-</sup> и YFP<sup>+</sup>, как определено в (А). (В) Антиген-специфическая продукция IFN $\gamma$  в спленocyтoах, повторно стимулированных пептидом LLO190-201. Показаны CD4<sup>+</sup> Т-клетки; (Г) Экспрессия Foxp3 в отсортированных клетках YFP-GFP<sup>high</sup> или YFP<sup>low</sup> из инфицированных *L. monocytogenes* или контрольных мышей через 9 дней после заражения.

затем инфицировали сублетальной дозой *Listeria monocytogenes* и анализировали стабильность Трег в момент максимального иммунного ответа. После заражения сильно повышалось количество белка, отвечающего за развитие Т-хелперов 1 типа, фактора транскрипции Tbet, синтез которого сопровождается увеличением на мембране рецептора хемокинов CXCR3 (рис. 17А,Б и рис. 18А) и продукцию IFN $\gamma$  эффекторными CD4<sup>+</sup> Т-клетками в ответ на пептид листериолизина О (LLO) (рис. 17В и рис. 18Б). Тем не менее, все клетки YFP<sup>+</sup> Трег сохраняли экспрессию Foxp3 (рис. 17Г), в том числе и клетки с повышенной экспрессией Tbet. Стабильность Foxp3 также наблюдалась в клетках Tbet+Foxp3<sup>+</sup>, генерируемых при индукции сильного воспалительного ответа Th1 с доминированием IFN $\gamma$  при опосредованном антителами кросс-связывании CD40 (рис. 19). Перекрестное связывание CD40 после индуцированного тамоксифеном мечения приводило к заметному увеличению Tbet и CXCR3 в Foxp3<sup>+</sup> Трег и Foxp3<sup>-</sup> клетках (рис. 19).

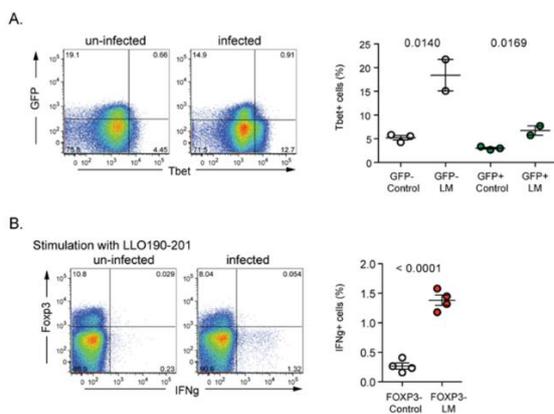


Рисунок 18. Инфекция *L. monocytogenes* приводит к увеличению уровня Tbet в Foxp3<sup>+</sup> и Foxp3<sup>-</sup> Т-клетках, а также антиген-специфической продукции IFN-g клетками Foxp3<sup>-</sup>. (А)Репрезентативный анализ уровня Tbet в неинфицированных и инфицированных *L. monocytogenes* на день 9 с момента заражения. (Б) Продукция IFN-g в клетках инфицированных и здоровых мышей в ответ на повторную стимуляцию пептидом LLO190-201 *in vitro*.

Клетки, меченные YFP, демонстрировали повышенную экспрессию CXCR3 и T-bet, но, в лучшем случае, незначительно увеличивали продукцию IFN $\gamma$  и IL-2 (данные не показаны). Кроме того, клетки Трег сохраняли экспрессию Foxp3 через 14 дней и до 5 месяцев после кросс-сшивания CD40 (рис. 19).

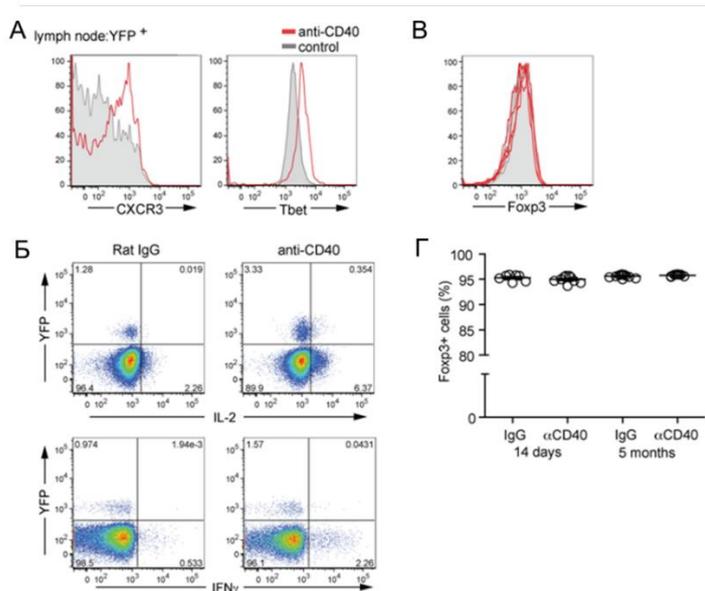


Рисунок 19. При воспалении по типу Th1 уровень Foxp3 в Трег стабилен. Обработанным тамоксифеном мышам *Foxp3<sup>eGFP-Cre-ERT2</sup>xR26Y* вводили агонистические антитела к CD40 или контрольные антитела, уровень Foxp3 анализировали через 14 дней или 5 месяцев после инъекции. (А) Кросс-сшивка CD40 антителами индуцирует синтез T-bet в YFP+CD4+ Т-клетках из лимфатических узлов. Лимфоциты окрашивали на Foxp3 через 14 дней после введения антител и

анализировали уровень CXCR3 или T-bet в YFP+ Т-клетках. (Б) Продукция IL-2 и IFN-g через 14 дней после введения антител к CD40 (красный) или контрольных IgG (серый) (n= 3). (В) Процент синтезирующих Foxp3 клеток среди YFP+ клеток через 14 дней или 5 месяцев после введения антител к CD40 или контрольных IgG. Представлены репрезентативные данные одного из 3 независимых экспериментов (n $\geq$ 2 мыши 6-8 недель в группе).

Таким образом, клетки Трег поддерживают наследуемую экспрессию Foxp3 даже после сильного увеличения количества фактора транскрипции Th1 T-bet в ходе Th1-зависимого антибактериального ответа и вызванного антителом CD40 воспалительного ответа типа Th1.

### Популяция Трег стабильна в условиях аутоиммунного воспаления в мышах со спонтанным диабетом 1 типа

Для оценки стабильности клеток Foxp3+ в условиях аутоиммунного воспаления высокоочищенные панкреатические островковые антиген-специфичные GFP+ Трег от NOD.*Foxp3<sup>gfp</sup>*.BDC2.5 (Mathis, 1993) ТКР-трансгенных мышей были перенесены в преддиабетических реципиентов NOD.Thy1.1 в возрасте 12 недель, в момент, когда панкреатическая инфильтрация хорошо выражена. Четыре недели спустя донорские клетки размножились в воспаленной поджелудочной железе, но сохранили экспрессию Foxp3 и, в отличие от эффекторных клеток реципиента, не экспрессировали детектируемых количеств

IL-17 или IFN $\gamma$  (рис. 20, А-В). В параллельных экспериментах стабильность Трег-клеток оценивали в ТКР-трансгенной модели К/ВхN, в которой реакция на распространенный аутоантиген приводит к IL-17-зависимой продукции артритогенных аутоантител (Mathis, 2010).

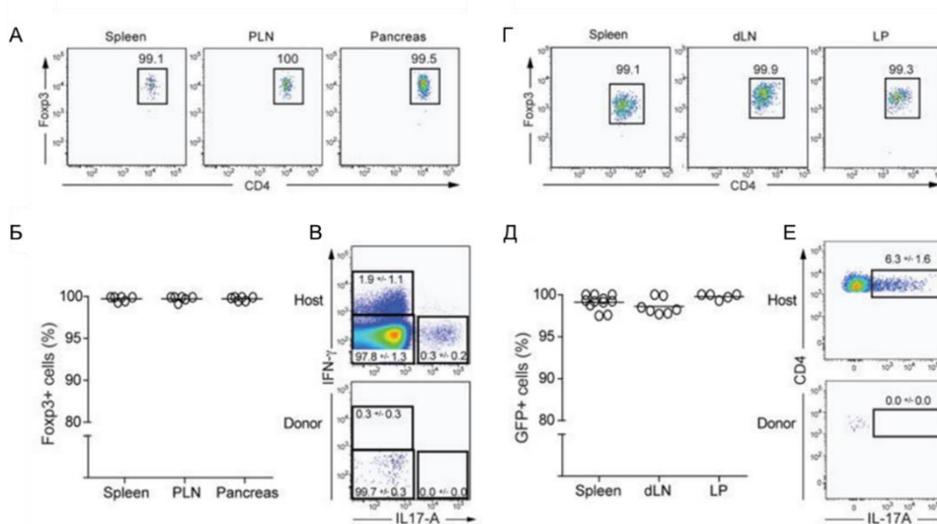


Рисунок 20. Уровень Foxp3 стабилен в клетках Трег при аутоиммунном воспалении. (А–В)

Высокоочищенные GFP+ клетки мышей BDC2.5.Foxp3<sup>eGFP</sup> были перенесены в 12-недельных пре-диабетических реципиентов

NOD.*Thy1.1*; селезенка, панкреатические лимфатические узлы (PLN) или инфильтраты поджелудочной железы были проанализированы через 4 недели. (А) Типичное окрашивание Foxp3 Thy1.2+CD4+ клеток донора. (Б) Обобщение данных по отдельным мышам в трех независимых экспериментах. (В) Внутриклеточное окрашивание IFN $\gamma$ + и IL-17+ клеток CD4+ хозяина и донора (числа представляют процент клеток в выделенных гейтах  $\pm$  SD; n=3-6 на группу). (Г–Е) Высокоочищенные CD4+GFP+ клетки от 20-дневных мышей К/ВхN.Foxp3<sup>gfp</sup> были перенесены в соответствующих по возрасту мышей К/ВхN.CD45.2. (Г) Селезенка, дренирующий сустав лимфатический узел и lamina propria (LP) были собраны у реципиентов с артритом 35-дневного возраста; CD45.1+CD4+ клетки донора проанализированы на экспрессию Foxp3-GFP. (Д) Обобщенные данные по отдельным мышам в двух независимых экспериментах. (Е) Экспрессия IL-17а клетками-хозяевами и донорами CD4+ из LP (цифры представляют процент клеток в гейтах  $\pm$  SD; n=3 на группу).

Клетки GFP+ Трег высокой степени очистки из мышей К/ВхN.Foxp3<sup>gfp</sup> были пересажены 20-дневным реципиентам К/ВхN, т.е. в начале очень сильного воспаления, и вновь оставались почти исключительно Foxp3+, не продуцировали IL-17 в лимфоидных органах или периферических тканях, например кишечнике (рис. 20, Г-Е). Таким образом, клетки Трег сохраняют стабильную экспрессию Foxp3 и не обнаруживают признаков продукции эффекторных цитокинов в условиях аутоиммунного воспаления.

В заключение, мы продемонстрировали, что Трег удивительно стабильны в физиологических условиях и при индукции лимфопении и воспаления. Стабильная экспрессия Foxp3 в коммитированных клетках Трег, вероятно, облегчается положительной ауторегуляторной петлей. Непрерывное самообновление зрелой популяции клеток Трег в

сочетании с наследуемым поддержанием экспрессии Foxp3 служит основным механизмом гомеостаза этой линии клеток у взрослых мышей.

#### **IV. ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ FOXR1 РЕГУЛИРУЕТ СВЯЗЫВАНИЕ FOXR3 С ХРОМАТИНОМ И КООРДИНИРУЕТ ФУНКЦИЮ T<sub>REG</sub>**

##### **Родственный Foxr3 белок Foxr1, вероятно, играет важную роль в поддержании фенотипа и функции T<sub>reg</sub>**

Foxr3 является членом семейства консервативных факторов транскрипции Foxr (Foxr1–4), которые регулируют дифференцировку разных типов клеток. Все белки Foxr содержат домен цинкового пальца и на (N)-конце несут мотив лейциновой молнии и консервативный ДНК-связывающий домен forkhead. Факторы транскрипции Foxr способны к гомо- и гетеродимеризации, которая, как полагают, усиливает их связывание с относительно низкоаффинным консенсусным мотивом (Zheng, 2007; Song 2012; Marson, 2007).

Другой член семейства Foxr, Foxr1, играет важную роль в системе приобретенного иммунитета, способствуя раннему развитию В-клеток, противодействует дифференцировке фолликулярных хелперных Т-клеток (TFH-клеток) и блокирует спонтанную активацию Т-клеток. Foxr1 в больших количествах присутствует в ядрах наивных Т-клеток, причем его количество значительно снижается при их активации (Feng 2010, 2011; Hu, 2006; Wang, 2014). Foxr1 образует гомодимеры и может гетеродимеризоваться с Foxr3, который образует крупные белковые комплексы в T<sub>reg</sub> (Li 2007; Rudra 2012). Совпадают ли сайты связывания Foxr3 с теми, которые занимает Foxr1 в наивных Т-клетках, и происходит ли вытеснение Foxr1 во время дифференцировки клеток T<sub>reg</sub> и его замена на Foxr? Этот сценарий предполагает, что Foxr1 играет дублирующую роль в клетках T<sub>reg</sub>. Возможно также, что Foxr1 имеет не избыточную функцию, и в T<sub>reg</sub> посредством кооперативного связывания с сайтами, занятыми совместно с Foxr3, участвует в Foxr3-опосредованной регуляции экспрессии генов.

##### **Большинство участков связывания Foxr1 и Foxr3 с хроматином T<sub>reg</sub> совпадают**

Для анализа участков связывания Foxr3 и Foxr1 в хроматине разных типов Т-клеток, использовали результаты ChIP-seq образцов хроматина, выделенного из T<sub>reg</sub> и наивных Т-клеток (Тнаив). По результатам ChIP-seq Foxr1 и Foxr3 идентифицированы 3071 и 7147 сайтов, с которыми определенно связаны Foxr1 и Foxr3 в клетках T<sub>reg</sub>, соответственно

(PDR-скорректированный  $p < 0.01$ , рис. 21a). 1980 пиков связывания Foxp1 и Foxp3 перекрывались/совпадали, в то время как 1101 пик с высоким уровнем связывания Foxp3 не перекрывался с какими-либо пиками Foxp1, даже при использовании низкого порога для позитивного сигнала. Только 54 пика с существенным связыванием Foxp1 не перекрывались с пиками связывания Foxp3, также определенными с низкими пороговыми значениями (рис. 21a). В наивных клетках мы определили 1088 пиков достоверного связывания Foxp1 (скорректированы с учетом ложного обнаружения (FDR)  $P < 0,01$ , рис. 21b), более 95% этих пиков связывания Foxp1 удастся обнаружить в хроматине Трег при использовании ослабленного порога сигнала (рис. 21b). Более половины сайтов, связанных с Foxp3, находятся в интронных и межгенных областях, в этих регионах менее 30% сайтов, связанных с Foxp1. Скорее, связывание Foxp1 происходит преимущественно с промоторами генов в клетках Трег (рис. 21c). Удивительное совпадение пиков связывания Foxp3 и Foxp1 заслуживает особого внимания, поскольку крайне маловероятно, чтобы два несвязанных профиля ChIP-seq так сильно коррелировали друг с другом (Gerstein, 2012). Высота пиков сигнала ChIP для Foxp3 пиков общих для Foxp1 и Foxp3 в клетках Трег немного выше, чем высота пиков ChIP, с которыми связан только Foxp3, тогда как для Foxp1 наблюдалось обратное (Рис. 21d, e).

Для идентификации мотивов, которые преимущественно встречаются в местах связывания и Foxp1, и Foxp3, провели процедуру поиска мотивов *de novo*. Канонический мотив для связывания домена forkhead чаще всего встречался в местах связывания Foxp1 по данным ChIP. В то же время, пики связывания Foxp3 содержали больше мотивов связывания Ets и Runx, но не forkhead, что согласуется с результатами предыдущего исследования (Samstein, 2012). 12,6% пиков Foxp3 и 17,7% пиков Foxp1 содержали канонический мотив forkhead (рис. 21f,g). В большинстве пиков, содержавших этот мотив, он присутствовал единожды.

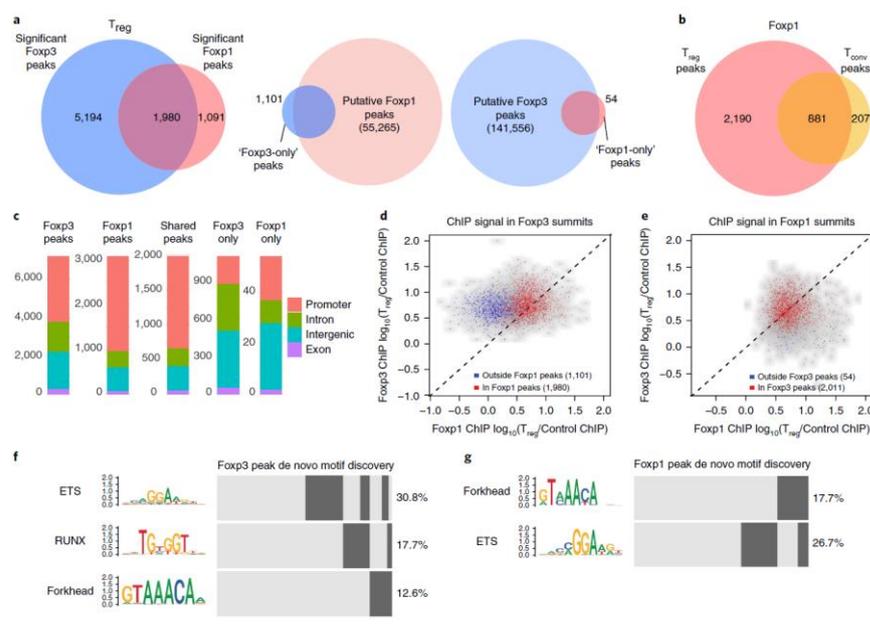


Рисунок 21. Большинство сайтов связывания Foxp1 и Foxp3 совпадают, а диаграмма Венна сайтов связывания Foxp1 и Foxp3 с хроматином Treg (FDR-скорректированный  $p < 0,01$ ) (слева). Диаграммы Венна значимых пиков Foxp1 и Foxp3, не перекрывающихся с предполагаемыми пиками другого

транскрипционного фактора при сниженном пороговом значении ( $p < 0,1$ ) (в центре и справа). b, Диаграмма Венна сайтов связывания Foxp1 в клетках Treg и Tconv (FDR-скорректированный  $p < 0,01$ ). c, Распределение в геноме сайтов связывания Foxp1 и Foxp3 (FDR-скорректированный  $p < 0,01$ ). d, Точечная диаграмма распределения сигнала ChIP FoxP3 и Foxp1 по пикам Foxp3. Данные показаны для пиков связывания исключительно Foxp3 (синий) и пиков Foxp3, которые перекрываются с пиками связывания Foxp1 (красный). e, Диаграмма распределения сигнала ChIP FoxP3 и Foxp1 по пикам связывания Foxp1. Данные показаны для пиков Foxp1, связанных только с Foxp1 (синий) и пиков Foxp1, которые перекрываются с пиками Foxp3 (красный). f, g, HOMER-анализ сайтов, связанных с Foxp3- (f) и Foxp1- (g), для выявления мотивов обогащенных сайтами связывания факторов транскрипции.

При учете отдельных случаев присутствия мотива forkhead рядом с вершиной пика связывания с использованием ослабленного порога совпадения мотивов, мы обнаружили 1625 пиков Foxp3 из 7174 с, по крайней мере однократным присутствием мотива forkhead. Всего 102 пика связывания Foxp3 (1.4% от общего числа) содержат два и больше мотива forkhead. Из этих 102 пиков, 57 содержали два мотива связывания forkhead на расстоянии 20 пар оснований (п.о.) или больше. Эти гомодимеры возможно способствуют формированию контактов между удаленными участками хроматина, сближая участки связывания с ДНК, что требует одного forkhead домена на каждый сайт связывания/регуляторный элемент. Кроме того, возможно, что каждый мономер в составе димера связывает ДНК только в течение определенного времени. Пики связывания Foxp1 и Foxp3 содержат мотивы связывания белков семейства Ets (26.7% и 30.8%, соответственно), а 17.7% пиков Foxp3 содержат мотивы связывания Runx (рис. 21 f, g). Суммируя представленные результаты, можно констатировать, что Foxp1 преимущественно связан с сайтами связывания Foxp3 в хроматине.

## Трег-специфический нокаут Foxp1

В отсутствие Foxp1, и, как следствие, неспособности Foxp3 образовывать гетеродимеры с Foxp1, вероятно снижено связывание Foxp3 с сайтами, которые в норме заняты двумя белками Foxp3 и Foxp1. Альтернативная гипотеза состоит в том, что снижение общего содержания белков Foxp («1+3») из-за потери Foxp1 может привести к снижению связыванию Foxp3 со всеми сайтами вследствие его перераспределения в участки, ранее занятые Foxp1. Для прояснения этого вопроса мы создали новую линию мышей, которая содержала кондиционный «флоксированный» аллель Foxp1. Сайты loxP были внедрены в ДНК таким образом, чтобы окружить 9 экзон, который кодирует практически весь домен лейциновой «молнии», необходимый, как было показано ранее, для формирования гомо- и гетеродимеров. Животные с флоксированным Foxp1 нормально развивались и, даже в виде гомозигот, не проявляли заметных признаков патологии. Данную линию животных с кондиционным аллелем Foxp1 скрестили с описанной выше линией *Foxp3<sup>YFP-Cre</sup>* для получения мышей, у которых только в Трег отсутствует белок Foxp1 (рис. 22). Гомозиготные по флоксированному Foxp1 животные по мере взросления проявляли признаки умеренной активации иммунной системы, выражающейся в увеличении числа активированных лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах.

### **Связывание Foxp3 с хроматином снижено в отсутствие Foxp1**

Анализ методом Foxp3 ChIP-seq Foxp1-дефицитных и нормальных Трег и нормализация фонового шума во всех образцах, использованных для множественного сравнения сигнала ChIP, выявил, что число сайтов со значительным связыванием Foxp3 снижено в Трег, нокаутных по Foxp1 (рис. 24а). Сигнал Foxp3 ChIP был преимущественно снижен в Foxp1-дефицитных Трег во всех местах связывания Foxp3, а не только в сайтах связывания Foxp1 (рис. 22b). Этот результат указывает на то, что делеция Foxp1 в синтезирующих Foxp3 клетках может приводить к перераспределению Foxp3 в масштабах генома (рис. 22с). Синтез Foxp1 в процессе созревания Т-клеток впервые происходит на стадии двойных негативных тимоцитов стадии 2, а уровень экспрессии Foxp1 повышен в предшественниках Трег (Рис. 22d). Чтобы исключить возможность, что снижение связывания Foxp3 на геномном уровне может произойти из-за уменьшения количества Foxp3, было определено содержание Foxp3 в Foxp1-дефицитных и нормальных CD62L<sup>hi</sup> (неактивированных) Трег и активированных CD44<sup>hi</sup>. Удалось выявить небольшое снижение количества Foxp3 в Foxp1-дефицитных наивных Трег и константный уровень Foxp3 в активированных Трег, независимо от присутствия Foxp1 (рис. 22 e, f). Уровень мРНК Foxp3

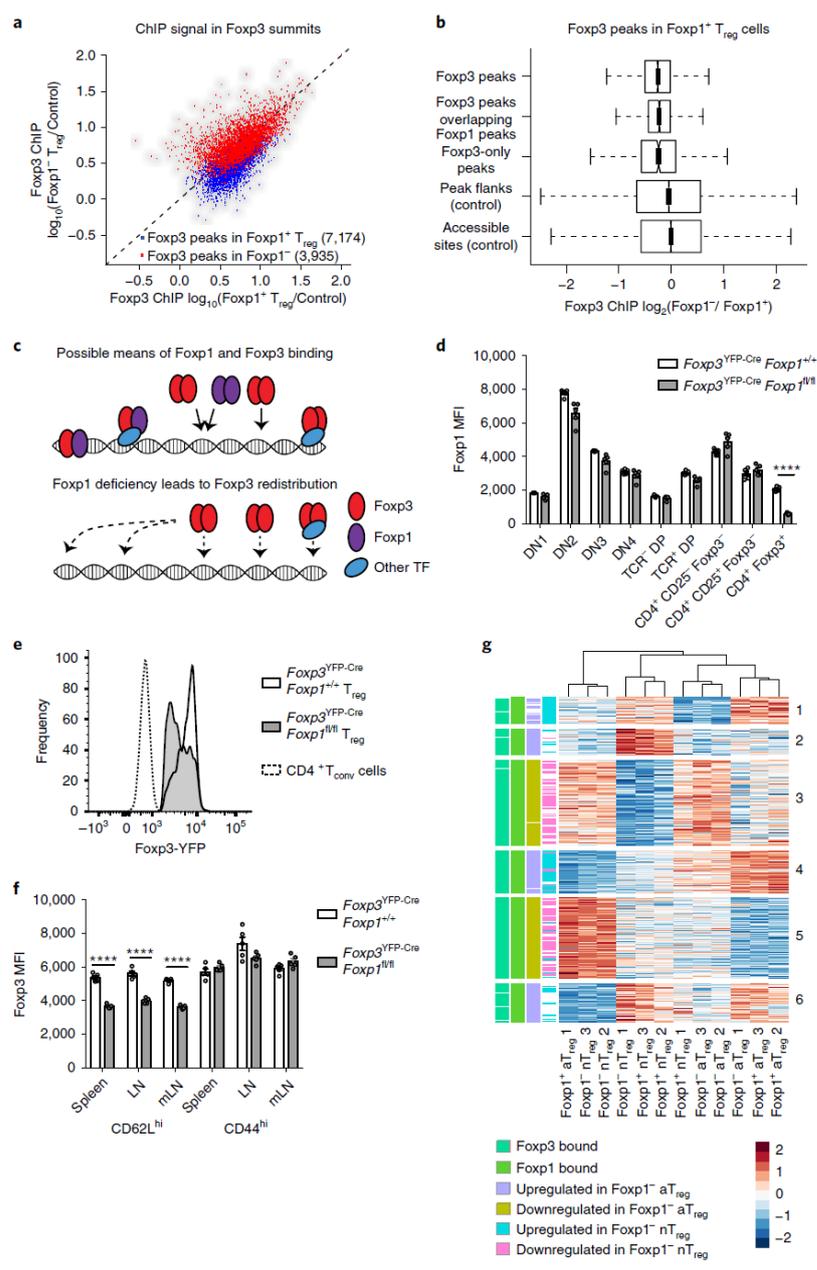


Рисунок 22. Связывание Foxp3 с ДНК снижается в отсутствие Foxp1. а, Диаграмма распределения сайтов связывания Foxp3 в клетках Foxp1<sup>+</sup> и Foxp1<sup>-</sup> Трег (FDR-скорректированный P<0,01; b, Диаграмма разброса интенсивности связывания Foxp3 по данным ChIP в клетках Foxp1<sup>-</sup>/Foxp1<sup>+</sup> Трег для пиков, которые перекрываются с пиками связывания только Foxp3 (n=1101), на всех пиках Foxp3 (n=7,174), по краям пиков (n=241 691) и на всех доступных участках (n=101 224). На диаграммах показан межквартильный диапазон (IQR) образца, центрированного по медиане, метки показывают доверительный интервал вокруг медианы, оцененный как медиана  $\pm 1,57 \times \text{IQR} / (\sqrt{\text{размера выборки}})$ , усы расширяют конечные точки IQR на  $1,5 \times \text{IQR}$  в каждом направлении, выпадающие за пределы интервалов между усами значения не приведены. с, Схематическое представление перераспределения Foxp3 в отсутствие Foxp1. d, Сводный график средней интенсивности флуоресценции (MFI) Foxp1 в подмножествах клеток тимуса от 8-10-недельных мышей-самцов (n=5, представлены данные 3 независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют, \*\*\*\* p < 0,0001, по непарному двустороннему критерию Стьюдента); e, Репрезентативная гистограмма уровня белка Foxp3 в наивных клетках Foxp1<sup>+</sup> и Foxp1<sup>-</sup> Трег и в наивных клетках Tconv из объединенных паховых лимфатических узлов. f, Суммарный график MFI Foxp3 в клетках Foxp1<sup>+</sup> и Foxp1<sup>-</sup> Трег 8-10 недельных мышей-самцов (n=5 биологически независимых мышей на группу, приведены результаты одного эксперимента из 3, s.e.m. центрированных по средним значениям, \*\*\*\* p < 0,0001; g, Тепловая карта дифференциально экспрессированных (скорректированных с помощью FDR P < 0,01) генов, связанных с пиками Foxp1, сгруппированных по методу k-средних.

понижен в Foxp1-дефицитных Трег, что может указывать на то, что отсутствие Foxp1 негативно влияет на транскрипцию гена Foxp3. Большой процент Foxp1-дефицитных Трег проявлял активированный фенотип, по сравнению с нормальными Трег, и поэтому

большинство *Foxp1*-дефицитных Трег содержали больше белка *Foxp3* на клетку, чем Трег с нормальным уровнем *Foxp1*. Однако, в отличие от нормальных активированных Трег, в *Foxp1*-дефицитных Трег наблюдалось меньше крупных пиков сильного связывания *Foxp3* (3935 против 7174 в контроле). Эти данные согласуются с нашей моделью «разбавления» *Foxp3*, объясняющей сниженное связывание *Foxp3* в отсутствие *Foxp1*.

### **Foxp1-зависимая регуляция активности генов в Трег**

Чтобы определить влияние потери *Foxp1* на экспрессию генов в Трег, провели анализ RNA-seq YFP+CD62L<sup>hi</sup> наивных и CD44<sup>hi</sup> активированных Трег. Поскольку у мышей *Foxp3*<sup>YFP-Cre</sup> *Foxp1*<sup>fl/fl</sup> есть признаки умеренной активации иммунной системы, был проведен RNA-seq анализ Трег, выделенных из здоровых гетерозиготных самок *Foxp3*<sup>YFP-Cre/+</sup> *Foxp1*<sup>fl/fl</sup> и *Foxp3*<sup>YFP-Cre/+</sup> *Foxp1*<sup>+/+</sup>. Вследствие случайной инактивации X-хромосомы такие животные содержат одновременно *Foxp1*-дефицитные и нормальные Трег с «обычным» количеством *Foxp1*. По методу k-средних были кластеризованы гены связывающие *Foxp1* в клетках Трег и дифференциально экспрессированные в *Foxp1*-дефицитных и *Foxp1*-достаточных Трег (приведенное по FDR  $p < 0.01$ ), а также проанализирована онтология генов шести идентифицированных кластеров (рис. 23).

Кластер 3 содержит гены, экспрессия которых снижена в отсутствие *Foxp1* и в наивных, и в активированных Трег, в том числе характеристические для Трег гены *Il2ra* и *Ikzf4*. Кластер 1 обогащен генами, связанными со скелетными и сердечной мышцами, развитием репродуктивных органов и коры надпочечников (Zhang, 2010; Cesario, 2016). Кластер 5 содержит гены, которые наиболее сильно экспрессированы в активированных Трег и снижены в *Foxp1*-дефицитных Трег, по сравнению с нормальными *Foxp1*-достаточными Трег. Он содержит гены активации Т-клеток *Cd83*, *Ctla4*, *Ikzf3*, *Hivep3*, *Nfatc1*, *Nfkb2*, *Prdm1*, *Relb*, *Rora* и *Smad3*.

Гены, дифференциально экспрессированные в *Foxp1*-дефицитных и нормальных наивных и активированных Трег, которые сильнее связывают *Foxp3* в нормальных Трег представлены *Itgab6*, *Smad7* и *Satb1* (рис. 23a). Большинство этих генов также связывают *Foxp1*. Используя ранее опубликованный список характеристических для Трег генов, состоящий из 407 генов с повышенной и 196 генов с пониженной экспрессией, мы установили, что экспрессия 136 генов из этого перечня повышена, а 51 – понижена для генов с пиками связывания *Foxp1* или *Foxp3*, согласно ChIP-seq (рис. 23 b,c). Гены с высоким уровнем транскрипции в Трег сильнее всего экспрессированы в *Foxp1*-достаточных Трег, в то время как гены с пониженной активностью в Трег сильнее всего

экспрессированы в Foxp1-дефицитных Трег (рис. 23b). В Трег экспрессия геномного организатора Satb1 репрессирована в Foxp3-зависимой манере, и эта репрессия

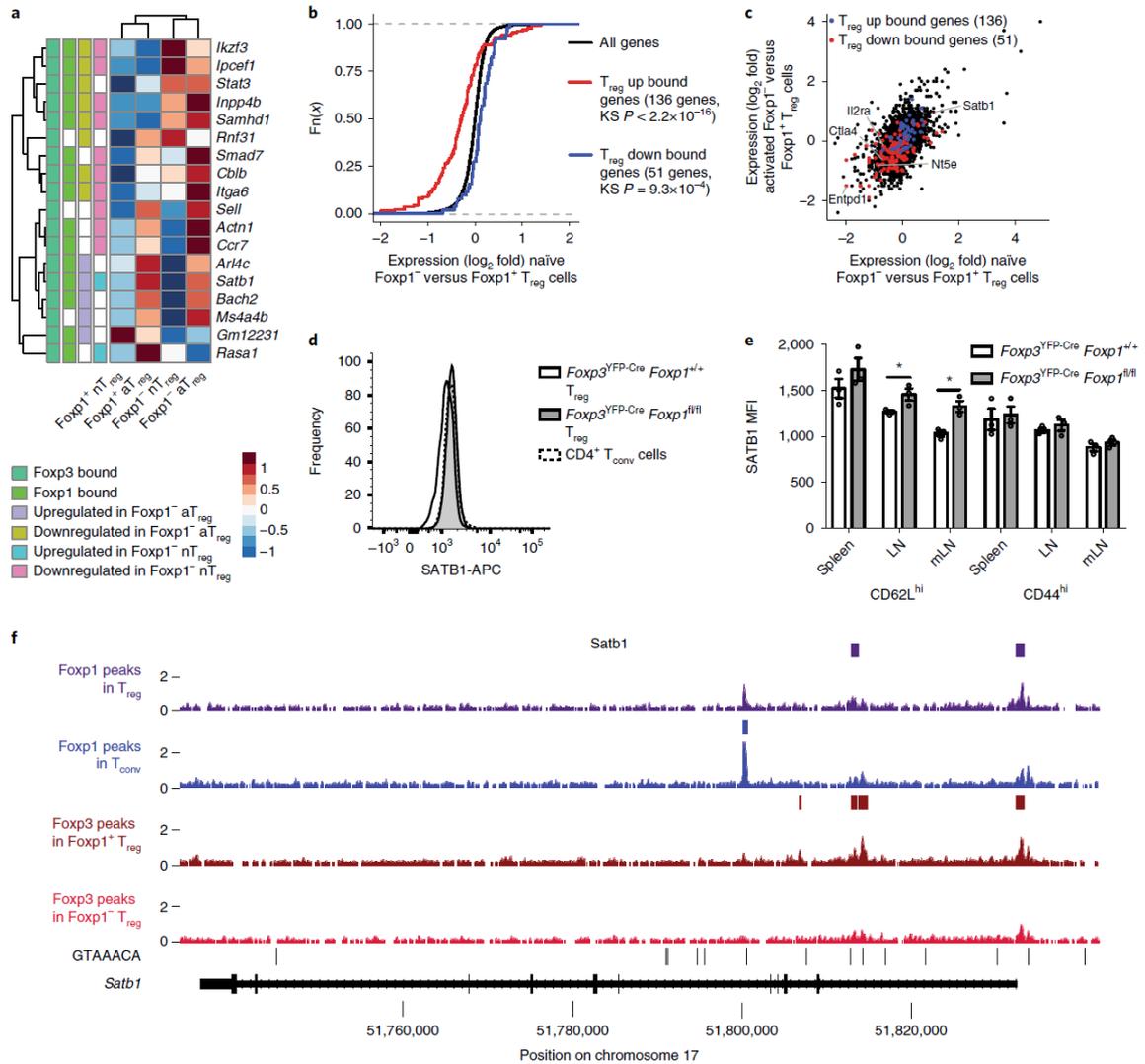
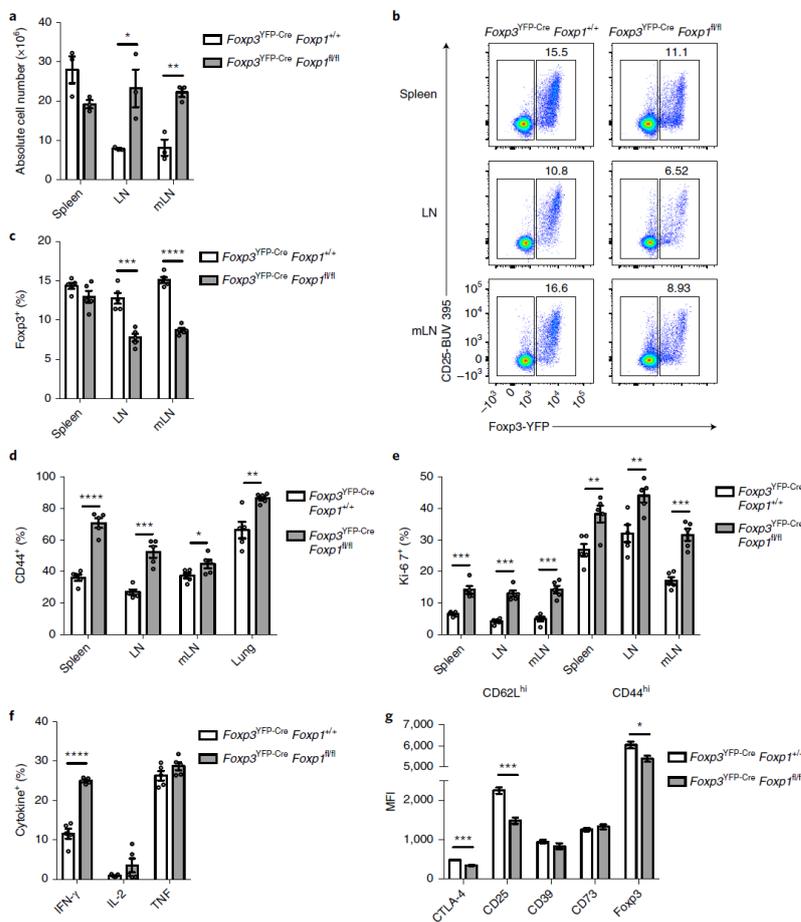


Рисунок 23. Foxp1-зависимая регуляция экспрессии генов в клетках Трег. а, «Тепловая» карта, сравнивающая экспрессию генов между Foxp1<sup>+</sup> и Foxp1<sup>-</sup> наивными и активированными клетками Трег из гетерозиготных самок мышей *Foxp3<sup>YFP-Cre/+</sup> Foxp1<sup>+/+</sup>* или *Foxp1<sup>fl/fl</sup>* для подмножества генов, связанных с пиками ChIP Foxp3, со значительно более высоким сигналом ChIP-seq Foxp3 в *Foxp1<sup>+/+</sup>* клетках. б, График кумулятивного распределения экспрессии сигнатурных генов Трег, связанных с пиками Foxp3 или Foxp1, в наивных клетках *Foxp1<sup>-/-</sup>* или *Foxp1<sup>+/+</sup>* Трег. Значения *p* рассчитаны по двустороннему критерию Колмогорова-Смирнова (KS) для сравнения сигнатурных генов Трег со всеми генами. с, График изменения кратности сигналов, показывающий изменения экспрессии сигнатурных генов Трег, связанных с пиками Foxp3 или Foxp1, в наивных и активированных клетках *Foxp1<sup>-/-</sup>* или *Foxp1<sup>+/+</sup>*; д, Репрезентативная гистограмма уровня белка SATB1 в наивных клетках *Foxp1<sup>-/-</sup>* или *Foxp1<sup>+/+</sup>* Трег и в наивных клетках Tconv (n=2). е, Сводный график MFI SATB1 в *Foxp1<sup>-/-</sup>* или *Foxp1<sup>+/+</sup>* Трег самцов мышей 8-10 недель (n=3 мыши на группу, представлены результаты одного из экспериментов, столбцы ошибок представляют среднее квадратичное отклонение, \* *p*=0,048 (слева) и \* *p*=0,012 (справа), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). ф, Распределение сигнала ChIP-seq Foxp3 и Foxp1 в локусе *Satb1*.

важна для их функции. Форсированная продукция *Satb1* приводит к потере супрессорной функции и продукции эффекторных цитокинов (Kitagawa, 2017; Beyer, 2011). *Foxp1*-дефицитные Трег производят больше мРНК и собственно белка *Satb1*, чем нормальные Трег «дикого типа» (рис. 23 с-е). Чтобы понять, регулирует ли *Foxp1* экспрессию *Satb1* в обычных Т-клетках, мы оценили количество *Satb1* в обычных Т-клетках, дефицитных по *Foxp1*, и выяснили, что уровень *SATB1* не меняется при нокауте *Foxp1*. И *Foxp1*, и *Foxp3* связаны в Трег с двумя альтернативными промоторами *Satb1*, содержащими мотивы связывания домена forkhead, причем связывание *Foxp3* с этими промоторами гораздо слабее в *Foxp1*-дефицитных Трег (рис. 23f). Вполне возможно, что помимо «помощи» *Foxp3*, *Foxp1* играет самостоятельную особую роль в репрессии гена *Satb1* в Трег.



**Трег с нокаутом *Foxp1* синтезируют цитокины, характерные для эффекторных клеток**

Выключение *Foxp1* в Трег приводит к умеренному увеличению размера лимфатических узлов и селезенки (рис. 26a), что заметно отличается от фенотипа мышей *CD4-Cre Foxp1<sup>fl/fl</sup>* с нокаутом *Foxp1* в CD4 и CD8 Т-клетках, для которых характерно снижение общего числа Т-клеток в селезенке и лимфатических узлах (Feng,

2010).

Рисунок 24. Дефицит *Foxp1* вызывает активацию клеток Трег и продукцию эффекторных цитокинов. а, Число клеток селезенки, лимфоцитов из дренирующей кожу (LN) и (mLN) брыжеечных лимфатических узлов (n=3 на группу, столбцы ошибок представляют s.e.m., центрированных по средним значениям, \*  $p=0,032$ , \*\*  $p=0,0043$ , здесь и далее использован непарный двусторонний критерий Стьюдента). б, Репрезентативные графики анализа суспензий CD4<sup>+</sup> Т-клеток селезенки и лимфатических узлов, показывающие уровни белка *Foxp3* и CD25. с, Сводный график частоты *Foxp3*<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток в селезенке, и зазных

лимфатических узлах (n=5) (ошибки и статистика, см выше;\*\*\*  $p=0,0003$ , \*\*\*\*  $p=0,0001$ ), d, Частота CD44<sup>hi</sup> Трег-клеток среди Foxp3<sup>+</sup> Трег-клеток в различных органах (n=5, статистика и ошибки как ранее, \*\*\*\*  $p=0,0001$ , \*\*\*  $p=0,0002$ , \*  $p=0,049$ , \*\*  $p=0,0054$ ), e. Частота клеток Ki-67<sup>+</sup> Трег среди всех наивных CD62L<sup>hi</sup> или активированных клеток Трег CD44<sup>hi</sup> (n=5, статистика и ошибки, см. выше, \*\*\*  $p=0,0003$ , \*\*\*  $p=0,0001$ , \*\*\*  $p=0,0001$ , \*\*  $p=0,0087$ , \*\*  $p=0,009$ , \*\*\*  $p=0,0002$  (слева направо)), f, Частота цитокин-продуцирующих Трег среди Трег селезенки через 3 часа стимуляции *in vitro* PMA и иономицином в присутствии брэфелдина А (n=5 статистика и ошибки как выше, \*\*\*\*  $p<0,0001$ ); g, Уровень белка (MFI) нескольких характерных для Трег белков в Трег-клетках селезенки самцов мышей (n=5, \*\*\*  $P=0,0001$ , \*\*\*  $P=0,0002$ , \*  $P=0,036$  (слева направо), ошибки и статистика как и ранее).

Пропорция CD4<sup>+</sup> Т-клеток с фенотипом Foxp3<sup>+</sup> в лимфатических узлах снижена примерно вдвое (рис. 24 b,c). Foxp1-дефицитные Трег сильнее активированы, судя по уровню CD44 на поверхности клеток, и более высокой пролиферативную активности (повышению Ki-67, по сравнению с нормальными Трег, рис. 24 d,e). Foxp1-дефицитные Трег также продуцируют больше IFN- $\gamma$  при стимуляции *in vitro*, по сравнению с нормальными Трег (рис. 24f). Активация Foxp1-дефицитных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток связана с повышенной экспрессией рецептора IL-7 (IL7R) (Feng, 2010. Известно, что Foxp3 также регулирует экспрессию альфа цепи рецептора IL-7 (IL-7R $\alpha$ )), поэтому интересно было исследовать, приводит ли дефицит Foxp1 в Трег к увеличению уровня IL-7R на поверхности клеток и пролиферации в ответ на IL-7. Количество IL-7R $\alpha$ , а также пролиферация в ответ на IL-7, не зависят от Foxp1, поскольку связывание Foxp3 с локусом Il7ra не снижается при выключении Foxp1. Несмотря на то, что нокаут по Foxp1 приводит к активации и обычных Т-клеток и Трег, механизмы, обеспечивающие их активацию различны.

### **Дефицит Foxp1 вызывает снижение способности Трег к супрессии эффекторных клеток**

Анализ экспрессии генов Foxp1-дефицитных Трег позволил установить, что экспрессия нескольких важных для функции Трег характеристических генов, таких как *Ctla4*, *Il2ra*, *Nt5e* и *Entpd1*, сильно понижена по сравнению с нормальными. Foxp3<sup>YFP</sup>-Cre/+ Foxp1<sup>fl/fl</sup> содержат значительно меньшие количества CD25 и CTLA-4 (рис. 24g). Индукция CD25 при стимуляции ТКР не менялась в Foxp1-дефицитных обычных Т-клетках, по сравнению с контролем. Однако CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки сильнее активированы и быстрее пролиферируют в мышцах с Foxp1-дефицитными Трег по сравнению с Трег из контрольных животных (рис. 25 a,b). Мы также обнаружили повышенную продукцию IFN- $\gamma$  и IL-2, но не IL-4 или IL-17 CD4<sup>+</sup> Т-клетками, и IFN- $\gamma$  CD8 Т-клетками (рис. 27c,d). Был также проведен адоптивный перенос Foxp1-дефицитных и контрольных Трег с Т-клетками, выделенными из мышей Foxp3<sup>DTR</sup> (Трег на поверхности

несут рецептор дифтерийного токсина), в без-T-клеточных реципиентах, после чего ввели мышам дифтерийный токсин, чтобы избавиться от Трег из мышей *Foxp3<sup>DTR</sup>*.

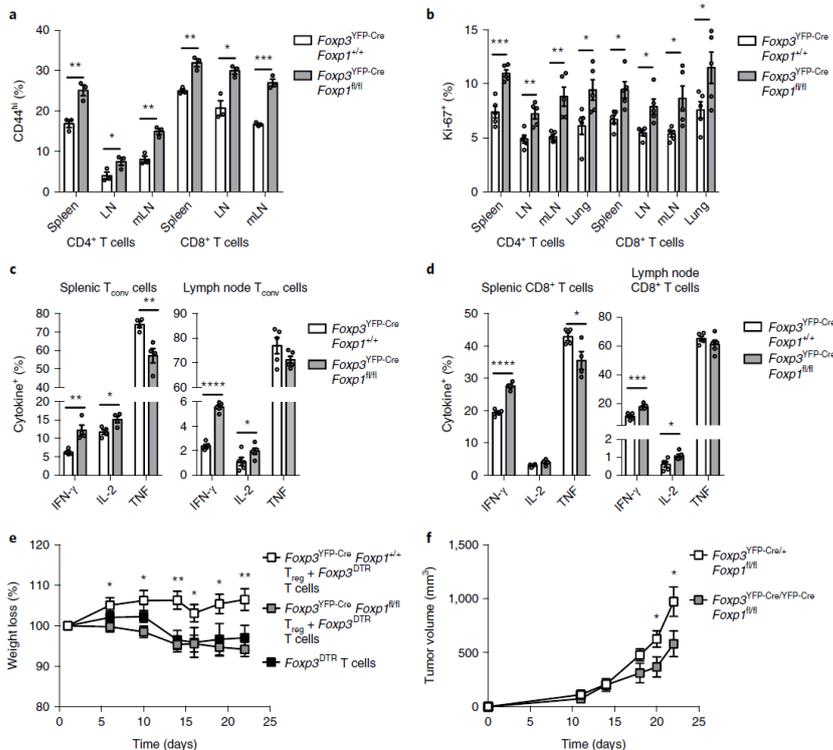


Рисунок 25. Дефицит *Foxp1* вызывает функциональные нарушения клеток Трег. а, Частота клеток CD44<sup>hi</sup> среди CD4<sup>+</sup> Tconv клеток селезенки или лимфатических узлов или CD8<sup>+</sup> Т-клеток (n=3, столбцы ошибок представляют значения s.e.m., \*\*  $p=0,0069$ , \*  $p=0,05$ , \*\* = 0,0033, \*\*  $p=0,0029$ , \*  $p=0,01$ , \*\*\*  $P=0,0004$  (слева направо), здесь и далее использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). б, Частота Ki-67<sup>+</sup> Т-клеток среди CD4<sup>+</sup> Tconv-клеток или

CD8<sup>+</sup> Т-клеток (n=5, столбцы ошибок – это значения s.e.m., \*\*\*  $p=0,0005$ , \*\*  $p=0,004$ , \*  $p=0,003$ , \*  $p=0,028$ , \*  $p=0,012$ , \*  $p=0,01$ , \*  $p=0,02$ , \*  $p=0,04$  (слева направо); с, Частота цитокин-продуцирующих Т-клеток среди всех Tconv клеток селезенки и лимфатических узлов после 3-часовой стимуляции *in vitro* PMA и иономицином с добавлением брэфелдина А (n=5, столбцы ошибок представляют s.e.m., \*\*  $p=0,00066$ , \*  $p=0,022$ , \*\*  $p=0,0072$ , \*\*\*\* = 0,0001, \*  $p=0,077$ ). d, Частота цитокин-продуцирующих Т-клеток среди всех CD8<sup>+</sup> Т-клеток селезенки и лимфатических узлов после 3-часовой стимуляции как в с (n=5, \*\*\*\*  $p=0,0001$ , \*  $p=0,094$ , \*\*\*  $p=0,0009$ , \*  $p=0,024$  (слева направо). е, Изменение веса мышей-реципиентов с дефицитом Т-клеток, которым адоптивно перенесли Т-клетки *Foxp1*<sup>+</sup> или *Foxp1*<sup>-</sup> и Т-клетки *Foxp3<sup>DTR</sup>* (n=5, \*  $p=0,05$ , \*  $p=0,026$ , \*\*  $p=0,0046$ , \*  $p=0,036$ , \*  $p=0,011$ , \*\*  $p=0,0051$  (слева направо)). f, Объем опухоли (мм<sup>3</sup>), образованной клетками рака молочной железы E0771 в молочных железах самок мышей (n=4, \*  $p=0,049$ , \*  $p=0,049$  (слева направо)).

Мыши, получившие *Foxp1*-дефицитные Трег вместе с клетками *Foxp3<sup>DTR</sup>* теряли вес почти также, как и мыши, получившие только Т-клетки *Foxp3<sup>DTR</sup>*. В то же время, мыши, получившие нормальные Трег не теряли вес (рис. 25e). Обычные Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки из мышей, которым в которых ввели *Foxp1*-дефицитные Трег продуцировали больше IFN-γ, IL-2 и TNF при стимуляции PMA и иономицином, по сравнению с клетками из контрольных мышей-реципиентов. Происходило значительное замедление в росте сингенной карциномы молочной железы, которую ортотопически подсаживали в жировую

ткань молочной железы самок  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$  по сравнению с контрольными животными (рис. 25f). Эти результаты говорят о том, что Foxp1 нужен для поддержания супрессорной функции Трег *in vivo*.

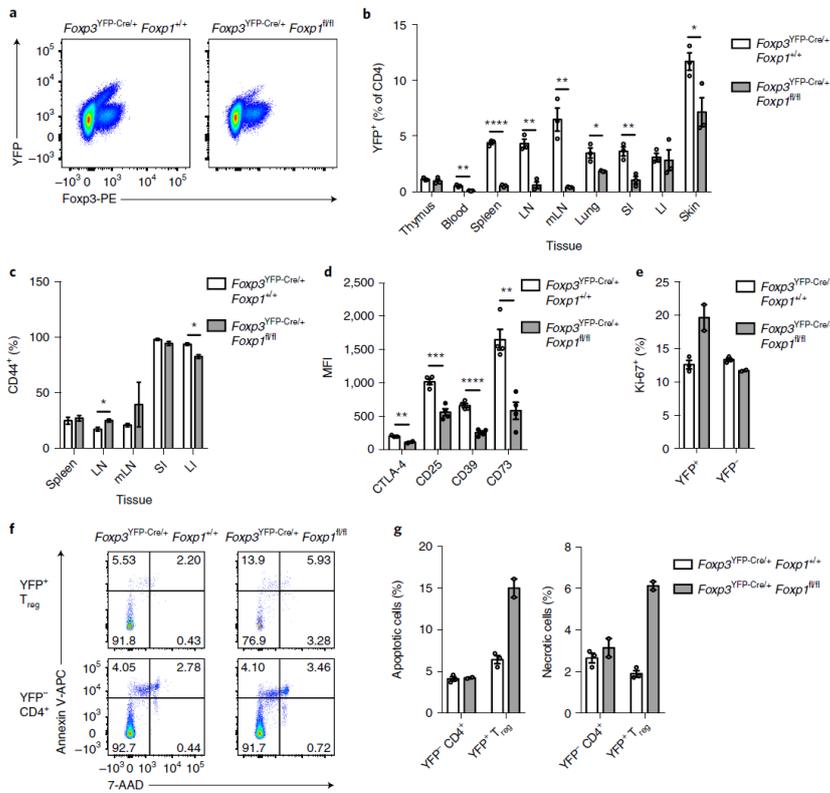


Рисунок 26. Внутриклеточные дефекты, вызванные дефицитом Foxp1 в клетках Трег. А, Репрезентативные графики проточной цитометрии, полученные на CD4+ Т-клетках селезенки 10-недельных гетерозиготных самок мышей  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}$  или  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$  (окрашивание Foxp3 и YFP, результаты одного из двух независимых экспериментов). б, Частота YFP+ Трег клеток и CD4+ Т-клеток у гетерозиготных самок мышей 10-недельного возраста в лимфоидных органах и тканях

кишечника (n=3, здесь и далее столбцы ошибок соответствуют значениям s.e.m., \*\*  $p=0,003$ , \*\*\*\*  $p=0,0001$ , \*\*  $p=0,0016$ , \*\*  $p=0,0043$ , \*  $p=0,023$ , \*\*  $p=0,008$ , \*  $p=0,039$  (слева направо), здесь и далее использован непарный двусторонний t-тест Стьюдента). SI, тонкая кишка; LI, толстая кишка. с, Частота клеток CD44<sup>hi</sup> среди клеток YFP+ Трег в лимфоидных тканях гетерозиготных 10-недельных самок (n=3, \*  $p=0,045$ , \*  $p=0,038$ ). d, Количество нескольких характерных для Трег белков по MFI сигнала после окрашивания моноклональными антителами YFP+ Трег из селезенки гетерозиготных самок (n=, \*\*  $p=0,0086$ , \*\*\*  $p=0,0005$ , \*\*\*\*  $p=0,0001$ , \*\*  $p=0,0018$  (слева направо). е, Частота клеток Ki-67+ среди YFP+ и YFP- Трег из гетерозиготных самок (n=3, в контрольной группе и n=2 в экспериментальной группе); f, Типичные результаты анализа методом проточной цитометрии YFP+ Трег или Т-клеток YFP-CD4+ из селезенки 10-недельных гетерозиготных самок, окрашенных 7-AAD и аннексином V; g, Анализ апоптотических клеток (аннексинV+7-AAD-) и некротических клеток (аннексинV+7-AAD+) в популяциях YFP+ Трег и YFP-CD4+ Т-клеток (n=3 в контроле и n=2 в экспериментальной группе).

### Негативные эффекты, связанные с отсутствием Foxp1 в Трег, являются внутриклеточными

Чтобы определить, являются ли эффекты от дефицита Foxp1 внутриклеточными, были проанализированы гетерозиготные самки  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$ . Вследствие случайной инактивации X-хромосомы, примерно половина Трег у этих животных, согласно ожиданиям, должна синтезировать YFP. У  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}$  гетерозиготных самок 40%

Трег были YFP+, что указывает на незначительный негативный эффект синтез белка YFP-Cre на Трег в конкурентных условиях (рис. 26а). В гетерозиготах *Foxp3<sup>YFP-Cre/+</sup> Foxp1<sup>fl/fl</sup>* на периферии *Foxp1*-дефицитные Трег существенно проигрывают в конкуренции с нормальными Трег (рис. 26а,b). Нокаут по *Foxp1* приводит к внутриклеточному дефекту, состоящему в спонтанной активации обычных CD4+ и CD8+ Т-клеток. В отличие от не-Трег, *Foxp1*-дефицитные и *Foxp1*-нормальные Трег у гетерозиготных мышей активированы в равной степени (рис. 26с). В то же время, у самок *Foxp3<sup>YFP-Cre/+</sup> Foxp1<sup>fl/fl</sup>* снижен уровень CTLA-4 и CD25 в *Foxp1*-дефицитных Трег (рис. 26d). В отличие от сравнимого уровня CD39 и CD73 в *Foxp1*-достаточных и *Foxp1*-дефицитных Трег у самцов *Foxp3<sup>YFP-Cre</sup> Foxp1<sup>fl/fl</sup>*, уровень этих супрессорных молекул заметно ниже в *Foxp1*-дефицитных Трег, по сравнению с *Foxp1*-достаточными Трег из мозаичных мышей (рис. 26d).

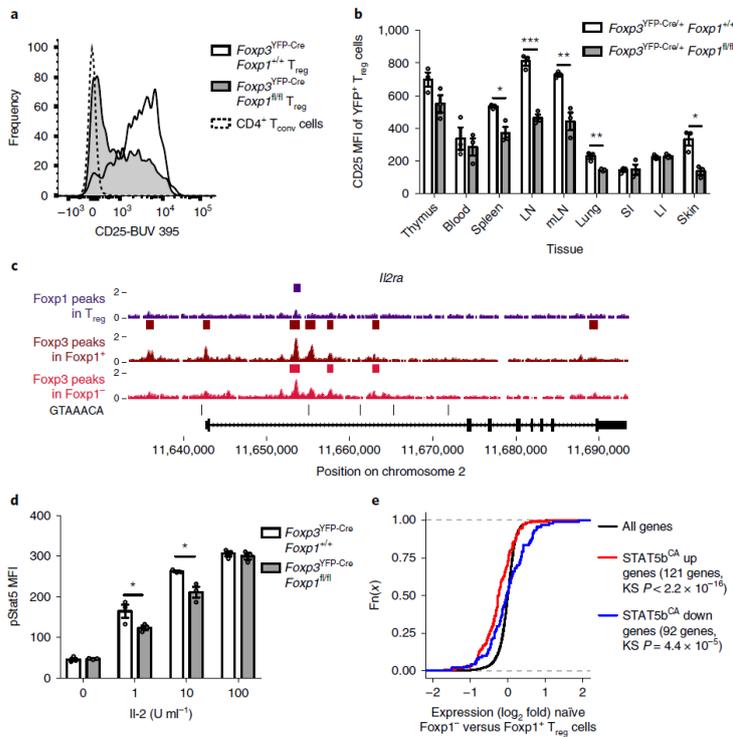


Рисунок 27. Передача сигнала от IL-2 нарушена в *Foxp1*-дефицитных Трег клетках за счет внутриклеточных дефектов. а, Репрезентативные гистограммы уровня белка CD25 на наивных клетках *Foxp1*+ и *Foxp1*- Трег и на наивных клетках *Tconv* (представлены результаты репрезентативного эксперимента). б, Различия в MFI CD25 в клетках YFP+ Трег от гетерозиготных самок (n=3, здесь и далее использован непарный двусторонний t-тест Стьюдента, а столбцы ошибок представляют, \*  $p=0,094$ , \*\*\*  $p=0,015$ , \*\*  $p=0,0005$ , \*\*  $p=0,0065$ ,

\*  $p=0,011$  (слева направо). SI, тонкая кишка; LI, толстая кишка. с, Распределение пиков *Foxp3* и *Foxp1* ChIP-seq в локусе *Il2ra* (показаны усредненные значения, n=3, для *Foxp1*+ Трег показано среднее значение, n=2). д, Чувствительность к IL-2 клеток Трег, отсортированных по *Foxp1*+ или *Foxp1*-, оцениваемая по MFI pSTAT5 (n=3, , \*  $p=0,05$ , \*  $p=0,019$  (слева направо). е, Кумулятивный график распределения, показывающий экспрессию генов *STAT5b<sup>CA</sup>* в наивных *Foxp1*-/*Foxp1*+ Трег клетках. Значения  $p$  рассчитывали с использованием двустороннего теста Колмогорова-Смирнова (KS), сравнивая экспрессию гены в мутанте *STAT5b<sup>CA</sup>* со всеми генами.

Это означает, что вышеописанный фенотип активированных Трег в *Foxp3<sup>YFP-Cre</sup> Foxp1<sup>fl/fl</sup>* является внутриклеточным и зависит от повышенной активации CD4+ и CD8+ Т-клеток в ответ на нарушенную супрессию со стороны Трег. Несмотря на сравнимую активацию,

YFP+ Foxp1-дефицитные Трег у гетерозиготных самок  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$  пролиферируют лучше, чем Foxp1-достаточные Трег (рис. 26е). Наконец, сравнение спонтанного апоптоза YFP+Foxp1-дефицитных и контрольных, нормальных по Foxp1, Трег из гетерозиготных самок  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$  доказывает, что процент Трег, которые находятся в раннем апоптозе, повышен в отсутствие Foxp1, а частота апоптотических клеток в субпопуляциях YFP- Трег соизмерима (рис. 26 f,g). Таким образом, дефицит Трег по Foxp1 вызывает как внеклеточные, так и внутриклеточные дефекты.

### **Передача сигнала от IL-2 нарушена в Foxp1-дефицитных Трег**

Главной функциональной проблемой при потере Foxp1 является нарушение регуляции синтеза CD25. Сниженная конкурентоспособность Foxp1-дефицитных Трег согласуется со значительным снижением уровня CD25 по сравнению с контрольными клетками с нормальным уровнем Foxp1. Снижение продукции CD25 также выявлено в YFP+ Трег из самок  $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$ , свидетельствуя о том, что эффект внутриклеточный (рис. 27 a,b). Выяснилось, что Foxp1 и Foxp3 узнают один сайт связывания в локусе *Il2ra*. Хотя Foxp3 остается связанным с этим сайтом в отсутствие Foxp1, его связывание в других участках локуса *Il2ra* сильно снижено или утрачено в Foxp1-дефицитных Трег (рис. 27b). Чтобы установить, приводит ли снижение уровня CD25 в Foxp1-дефицитных Трег к снижению чувствительности к IL-2, Трег стимулировали в присутствии различных концентраций IL-2 и измеряли фосфорилирование STAT5 (рис. 27d). В присутствии низких доз IL-2 фосфорилирование STAT5 существенно снижено в Foxp1-дефицитных Трег, но эта разница исчезает по мере увеличения дозы цитокина (рис. 27d). Зависящая от IL-2 рецептор-зависимая активация транскрипции гена STAT5 играет важнейшую роль в супрессорной функции Трег (Chinen, 2016). Сигнальные пути STAT5 и ТКР контролируют мало перекрывающиеся наборы генов и аспекты супрессорной активности Трег (Chinen, 2016; Levine, 2014)). Анализ генов, зависимых от активации STAT5, в базе данных RNA-seq показал, что гены, экспрессия которых возрастает под действием STAT5, сильнее всего экспрессированы в Foxp1-достаточных Трег. А наиболее сильно репрессированные при активации STAT5 гены сильнее всего экспрессированы в Foxp1-дефицитных Трег (рис. 27 f). Эти означают, что сигнальный путь IL-2 нарушен в Foxp1-дефицитных Трег. Несмотря на это, при высоких концентрациях IL-2 происходит полное восстановление уровня CD25, существенное повышение уровня Foxp3 и CTLA-4 в Foxp1-дефицитных Трег. Одновременного восстановления уровня SATB1 не происходит. Таким образом, Foxp1 обладает уникальной функцией в Трег, обеспечивая Foxp3-

зависимую регуляцию экспрессии нескольких характеристических генов Трег в IL-2 зависимой манере.

## **V. ТРЕГ ПАЦИЕНТОВ С РАННИМ НЕЛЕЧЕННЫМ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: СВЯЗЬ КОЛИЧЕСТВА И ФЕНОТИПА С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ И ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТЕРАПИИ**

### **Трег в патогенезе ревматоидного артрита (РА)**

Человеческие Трег имеют фенотип CD4+Foxp3 + и содержат много маркера CD25 и мало CD127 (рецептор IL-7Ra) (Chou, 2009; O'Shea, 2010). Данные относительно фенотипов Трег и количества этих клеток в периферической крови пациентов с РА в ходе лечения противоречивы (Janssen, 2016). В большинстве сообщений показано, что процент (%) циркулирующих Трег ощутимо снижается (Sakaguchi, 2008; Zheng, 2013) в то время как в некоторых статьях сообщают о повышенном проценте Трег (Prakken, 2013; Miyara, 2014) у пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами.

Общепринятым стандартом в фармакотерапии РА является терапия метотрексатом (MT). Помимо противовоспалительного эффекта, связанного с ингибированием GAPDH, MT негативно влияет на активность ДНК-метилтрансфераз, которые ингибируют экспрессию гена Foxp3. Поэтому введение MT позитивно сказывается на поддержании численности и функциональной активности Трег (Klimiuk, 1999; Сао, 2003, 2014). Чтобы прояснить роль Трег и их активности при РА, и разработать новые методы ранней диагностики РА, было проведено сравнение числа и фенотипа Трег пациентов с ранним не-леченным РА и здоровых доноров. Анализировали связь тяжести течения болезни с числом и фенотипом Трег, а также проводили повторный анализ Трег пациентов с РА в ходе лечения MT, чтобы выявить связь между скоростью восстановления Трег и ответом на MT.

### **Снижение числа Трег у пациентов с ранним РА ассоциировано со значительным уменьшением числа Трег, несущих маркеры активации**

Медиана DAS28 составила 5,01 в группе РА, 22 из 45 пациентов (48,9%) имели высокую, 20 (44,4%) умеренную и только 3 пациента (6,7%) имели низкую активность РА. Медиана SDAI составила 22,8 [17,0-28,7], а CDAI – 20,0 [15,0-26,0]. Повышенный уровень С-реактивного белка (CRP) выявлен у 30 (66,7%), повышенная СОЭ – у 26 (57,8%) пациентов. Процент и абсолютное количество субпопуляций Трег в крови здоровых доноров имели следующие нормальные значения: % FoxP3+CD25+ 3,7-9,8%, абс # FoxP3+CD25+ 0,03-0,11x10<sup>9</sup>; % CTLA-4/поверхность 0,13-4,9%, абс # - 0,00006-0,0018x10<sup>9</sup>;

% CTLA4/общ - 36,3-89,8%, абс # - 0,00003-0,00108x10<sup>9</sup>; % FoxP3+CD127- 3,2-8,5%, абс # - 0,03-0,096x10<sup>9</sup>; % CD25+CD127- 3,9-9,7%, абс # - 0,03-0,09x10<sup>9</sup>; % FoxP3+ICOS+ -7,0-27,5%, абс # - 0,002-0,019x10<sup>9</sup>; % FoxP3+CD40L+ 0,39-3,25%, абс # - 0,0001-0,0019x10<sup>9</sup>; % FoxP3+PD-L1+ - 0,47-3,43%, абс # - 0,00016-0,00334x10<sup>9</sup>. Типичные графики FACS показаны на рис. 28 (А и Б).

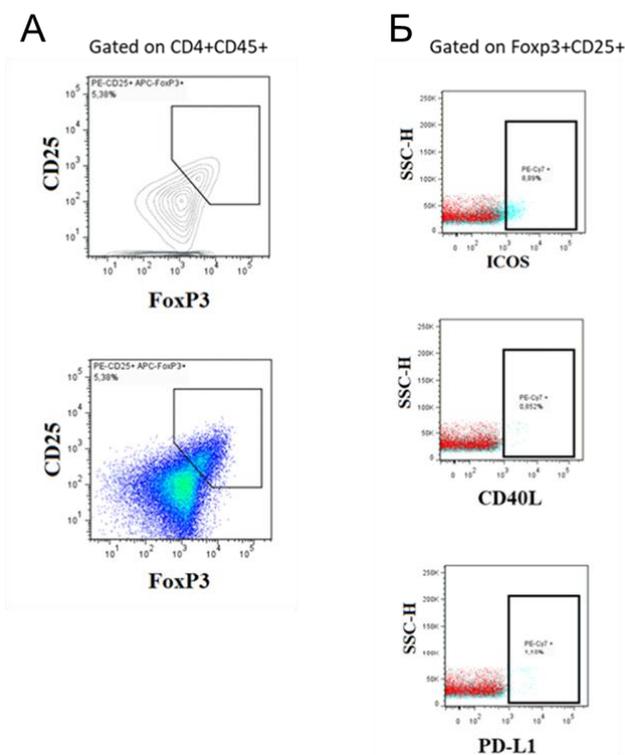


Рисунок 28. Анализ процентного содержания Трег в периферической крови пациентов с РА и здоровых доноров. Представлены данные проточно-цитометрического (FACS) анализа окрашенных флуоресцентными антителами клеток. (А) Пример идентификации Foxp3+CD25+ Трег. (Б) Точечные графики показывают FACS анализ Трег CD4+Foxp3+CD25+ крови, окрашенных специфическими антителами к маркерам активации Трег (CD40L, ICOS, PD-L1) и контрольными изотипическими IgG; красные точки – изотипический контроль, голубые точки – специфическое окрашивание IgG.

Популяцию CD4+CD45+ дополнительно анализировали путем окрашивания флуоресцентными моноклональными антителами анти-Foxp3 и анти-CD127. Уровень маркеров активации Трег оценивали на поверхности Foxp3+CD25+ Т-клеток. Большинство пациентов, имели более низкий % и абсолютное число (абс #) Foxp3+ ICOS+ (65,5% и %, и abs #), Foxp3+CD40L+ (48,3% и %, и abs #) и Foxp3+PD-L1+ (% у 37,9% и abs # у 24,1%; рис.29 Б и Ж). Не удалось идентифицировать ни одного пациента в группе РА, у которого было увеличено абс# клеток Foxp3+CD25+, % и абс # клеток Foxp3+ICOS+, % и абс # лимфоцитов фенотипа Foxp3+PD-L1+.

Пациенты с ранним РА имели статистически более низкий процент Т-лимфоцитов Foxp3+CD25+ (рис. 29А), а также меньший % и абс # Foxp3+ICOS+; Foxp3+ CD40L+ и Foxp3+PD-L1+ в сравнении со здоровой группой доноров ( $p < 0,05$ ) (рис.29). Отрицательные корреляции наблюдали для % FoxP3+CD25+ и CRP ( $r = -0,4$ ); % CTLA-4/поверхность и DAS 28 ( $r = -0,35$ ), СОЭ ( $r = -0,46$ ), CRP ( $r = -0,54$ ); % FoxP3+CD127- и CRP ( $r = -0,42$ ); % CD25+CD127- и DAS28 ( $r = -0,38$ ), SDAI ( $r = -0,41$ ), CDAI ( $r = -0,36$ ), СОЭ ( $r = -0,39$ ), CRP ( $r = -0,47$ ) ( $p < 0,05$  во всех случаях).

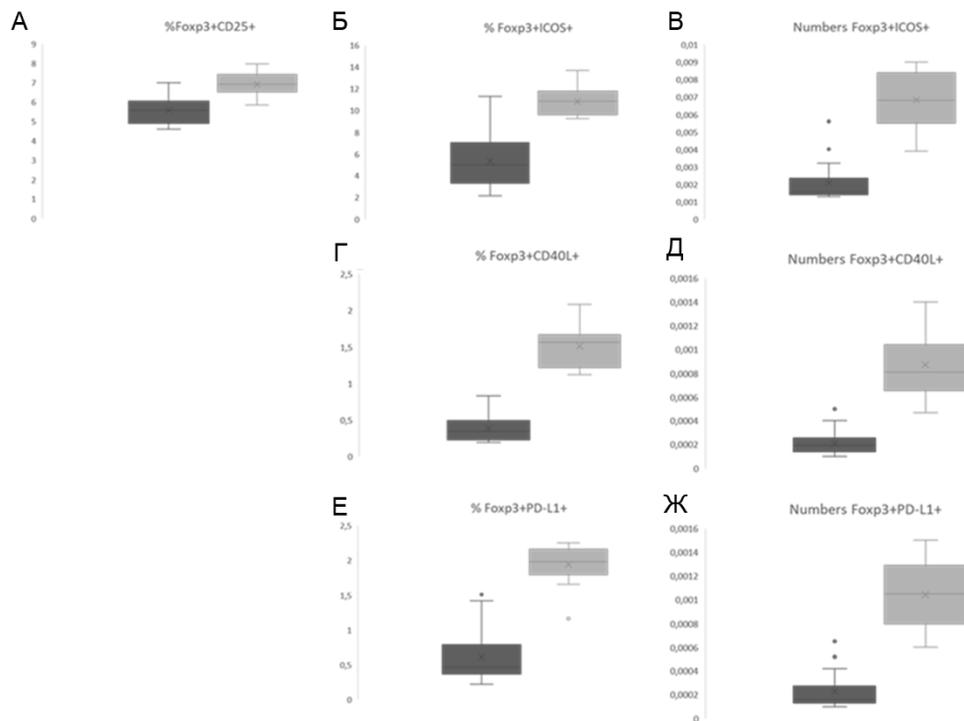


Рисунок 29. Снижение доли Foxp3+CD25+ Трег и снижение маркеров активации Трег у пациентов с ранним РА. Доля или количество клеток в периферической крови пациентов с РА и здоровых доноров определены методом иммунофенотипирования с последующим анализом FACS, как показано на рис. 30. Данные представлены в виде диаграмм размаха (box plot with whiskers), которые показывают (А, Б, Г, Е) пропорцию CD4+Foxp3+ Трег, экспрессирующих высокий уровень CD25 (А), ICOS (Б), CD40L (Г) или PD-L1 (Е), или (В, Д, Ж) абсолютное количество клеток в соответствующих популяциях Трег  $\times 10^9/\text{мл}$  крови нелеченых пациентов с РА (темно-серый) и здоровых доноров (светло-серый). Численность пациентов и статистическая значимость: (А) группа РА  $n=37$ , контроль  $n=20$ ,  $p=0,028$ ; (В, Ж) группа РА  $n=29$ , контроль  $n=20$ ,  $p = 0,003$  (Б),  $0,001$  (В),  $0,0003$  (Г),  $0,00007$  (Д),  $0,0002$  (Е),  $0,003$  (Ж).

### **Лечение метотрексатом увеличивает количество Трег и восстанавливает уровень маркеров активации**

Через 12 недель после начала МТ терапии DAS 28 в среднем снизился с 5,01 [4,2-5,8] до 3,63 [2,84-4,44], SDAI – до 9,4 [6,7-15,1], CDAI – до 8,0 [5,5-15,0]; ремиссия/низкая активность заболевания по данным DAS28 была достигнута у 14 (35,9%) пациентов, 14 пациентов отвечали хорошо по критериям EULAR, положительный клинический эффект отсутствовал только у 7 (17,9%) пациентов. Через 24 недели медиана DAS28 составила 3,1 [2,7-3,62]; SDAI – 7,4 [4,2-11,4], CDAI – 7,0 [4,0-11,0]; ремиссия/низкая активность РА

достигнута у 22 (56,4%) по данным DAS 28, 25 (64,1%) по данным SDAI, отсутствие положительного эффекта МТ выявлено по данным EULAR у 4 (10,3%) пациентов.

Отрицательная корреляция наблюдалась между % FoxP3+CD40L+ и DAS 28 ( $r = -0,4$   $p = 0,02$ ), SDAI ( $r = -0,5$   $p = 0,005$ ); % FoxP3 + PD-L1 + и DAS 28 ( $r = -0,4$   $p = 0,02$ ), SDAI ( $r = -0,6$   $p = 0,0001$ ) и CDAI ( $r = -0,7$   $p = 0,001$ ) после 24 недель терапии МТ.

Динамика количества Трег во время лечения МТ и его зависимость от успеха лечения на 24 неделе по данным EULAR представлена на рис. 30. Видно, что после 24 недель лечения наблюдалось значительное увеличение % CD4+ Т-клеток (с 45,0 [38,0-49,2]% до 46,8 [39,9-53,2] %) (рис. 33А); увеличение % CTLA4+/поверхность (0,65 [0,22-1,67]% до 2,07 [1,11-3,81]%,  $0,0002$  [0,0001-0,0008]  $\times 10^9$  до  $0,0007$  [0,0004-0,002]  $\times 10^9$ /л) (рис. 33Б-Г). Количество Трег с фенотипом CTLA4+/поверхность в группе пациентов с РА было в два раза выше, чем в группе здоровых доноров (2,07 [1,11-3,81]% против 0,51 [0,34-1,2]%;  $0,0007$  [0,0004-0,002]  $\times 10^9$  /л против  $0,0003$  [0,00014-0,0008]  $\times 10^9$ /л, соответственно,  $p < 0,05$ ). Другие субпопуляции Трег не показали значительных изменений в ходе терапии МТ.

#### **Пациенты с высоким уровнем CTLA-4 на поверхности Трег чаще отвечают на метотрексат**

Чтобы выявить потенциальные прогностические факторы лечения МТ у пациентов с ранним РА, мы проанализировали количество клеток в субпопуляциях Трег у пациентов, сгруппированных в зависимости от эффективности терапии на 24-й неделе. Пациенты с хорошим ответом на терапию МТ, согласно критериям EULAR, на 24-й неделе имели изначально более высокое содержание FoxP3+CD25+ Т-клеток 6,61[4,86-7,18] % по сравнению с пациентами с удовлетворительным/отсутствующим эффектом терапии (5,2 [4,1-5,8] %),  $p < 0,05$ . Пациенты с ремиссией/низкой активностью РА в соответствии с DAS28 имели исходно более высокий % и абс # клеток фенотипа CTLA4+/поверхность (1,3 [0,52-3,06]%;  $0,0005$  [0,0002-0,0014]  $\times 10^9$ /л), по сравнению с пациентами с умеренной активностью заболевания (0,24 [0,22-0,85]%;  $0,00015$  [0,0001-0,0006]  $\times 10^9$ /л,  $p < 0,05$ , (рис. 30). Пациенты с ремиссией на 24 неделе по данным DAS28 имели тенденцию к изначально более низкому уровню CRP (4 [2,4-49,4] мг/л) и меньшему сроку болезни – 4 [3-5] месяцев, пациенты с умеренной патологией (23,3 [17,1-30,7 мг/л, 5 [4-7] месяцев,  $p = 0,052$ ).

## Оценка числа активированных Трег может служить предиктором ответа на метотрексат и эффективности терапии

Проведенное нами исследование динамики популяции и изменений фенотипа циркулирующих Трег из крови пациентов из значительной выборки нелеченых пациентов с ранним ревматоидным артритом показало, что эта популяция может быть использована как маркерная при диагностике РА. Количество и фенотип (количество маркеров активации) циркулирующих Трег прямо коррелируют с тяжестью симптомов и эффективностью лечения метотрексатом. Успех терапии прямо коррелирует с увеличением числа и восстановлением уровня CTLA-4 на поверхности Трег. Таким образом, чем

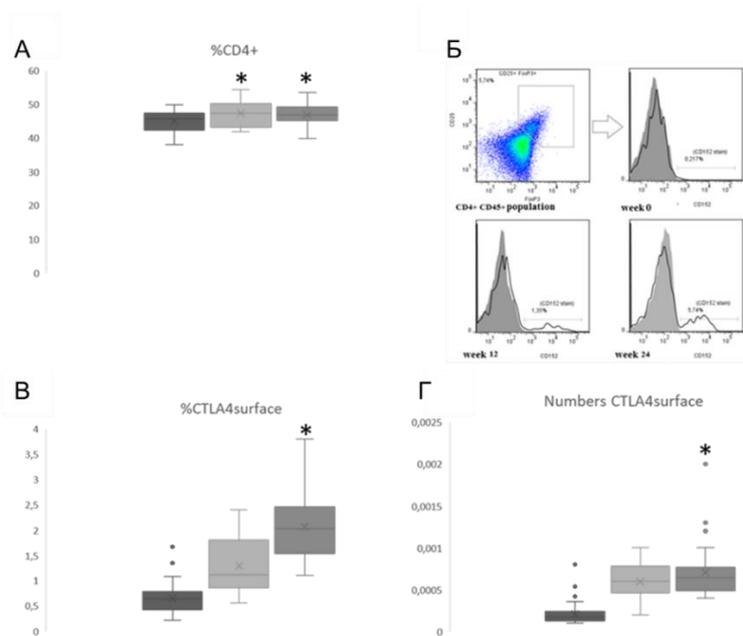


Рисунок 30. Ответ на лечение МТ положительно коррелирует с увеличением доли CD4 T-клеток в крови и восстановлением поверхностной экспрессии CTLA4 в субпопуляции Трег крови у пациентов с ранним РА. (А) Увеличение доли CD4+ T-клеток крови после 12 и 24 недель лечения МТ, (В, Г) Изменения в пропорции или абсолютных количествах субпопуляции Трег с поверхностной экспрессией CTLA4 в ходе лечения МТ (n=39, звездочка (\*) указывает на то, что  $p < 0,05$  по сравнению с исходным (до лечения) значением). Темно-серый – начальный уровень (до введения МТ), светло-серый – 12 недель МТ, серый – 24 недели лечения. (Б) Репрезентативные графики FACS иллюстрируют динамику поверхностной экспрессии CTLA4 Трег пациентов с РА, получавших МТ, заполненные гистограммы – изотипический контроль, цифры показывают долю клеток внутри гейтов.

фенотипический анализ Трег периферической крови можно использовать в диагностических целях для выявления пациентов, которые будут отвечать на терапию метотрексатом.

## **VI. МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ (МСК) ИЗ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ПРОЯВЛЯЮТ ИММУНОСУПРЕССОРНЫЕ СВОЙСТВА В КУЛЬТУРЕ С Т-КЛЕТКАМИ: РОЛЬ ICAM-1**

### **МСК угнетают активацию и деление активированных Т-клеток в культуре**

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) были обнаружены как фибробластоподобные клетки из костного мозга. Показано, что МСК обладают иммуномодулирующей активностью и способны регулировать активность лимфоцитов и других типов иммунных (Bartolomew 2002; Rubtsov, 2012). Активированные лимфоциты *in vitro* секретируют растворимые факторы, такие как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , которые инициируют программу иммуносупрессии МСК, которая состоит в синтезе белковых факторов, в частности, индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) (DelaRosa 2009), продукт ферментативной активности которой (кинуренин) ингибирует деление и эффекторную функцию лимфоцитов (Hui, 2008; Frumento 2001).

Паракринные механизмы играют значительную роль в иммуносупрессорном потенциале МСК, но МСК обладают гораздо большей супрессирующей способностью при прямом контакте с клетками-мишенями (DiNicola, 2002). Список молекул-кандидатов, участвующих в контактных механизмах иммуносупрессии состоит из PD-1/PD-L1, белка V7-N4 и молекул адгезии ICAM и VCAM (Ren, 2010).

Мы оценили влияние МСК жировой ткани человека (далее МСК) на активированные или покоящиеся Т-лимфоциты. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (ЛПК), использовали в качестве источника Т-клеток для экспериментов по совместному культивированию в условиях, позволяющих клеточные контакты или в формате transwell (без контакта МСК с лимфоцитами). МСК негативно влияли на пролиферацию активированных лимфоцитов, снижая уровень альфа-субъединицы рецептора IL-2 (CD25) на поверхности Т-клеток.

### **Уровень ICAM-1 резко возрастает на поверхности лимфоцитов и МСК при со-культивировании**

При сравнении опосредованной МСК супрессии Т-клеток в условиях контактов и бесконтактных условиях заметно большее замедление пролиферации в случае контактных культур. В то же время, более высокие уровни мРНК и белка IDO можно детектировать в случае бесконтактной, зависящей от растворимых факторов иммуносупрессии.

Приведенные факты подразумевает, что помимо ранее описанных паракринных факторов МСК несут на мембране молекулы, играющие роль в контакт-зависимой иммунной супрессии. Результаты экспериментов *in vivo* на мышах указывают, что это молекулы клеточной адгезии ICAM и VCAM [24]. Проведенный нами анализ изменений транскрипционной активности генов молекул клеточной адгезии в МСК в ходе иммуносупрессии *in vitro* выявил что и в МСК (рис. 31А), и в РВМС (рис. 31Б) только количество мРНК ICAM-1 резко повышалось. Активация транскрипции ICAM-1, происходила даже в отсутствие стимуляции РВМС (рис. 31 Ж,З). При этом происходило значительное увеличение уровня ICAM-1 на поверхности как активированных, так и не-стимулированных РВМС, а также МСК (рис. 31 В,Г).

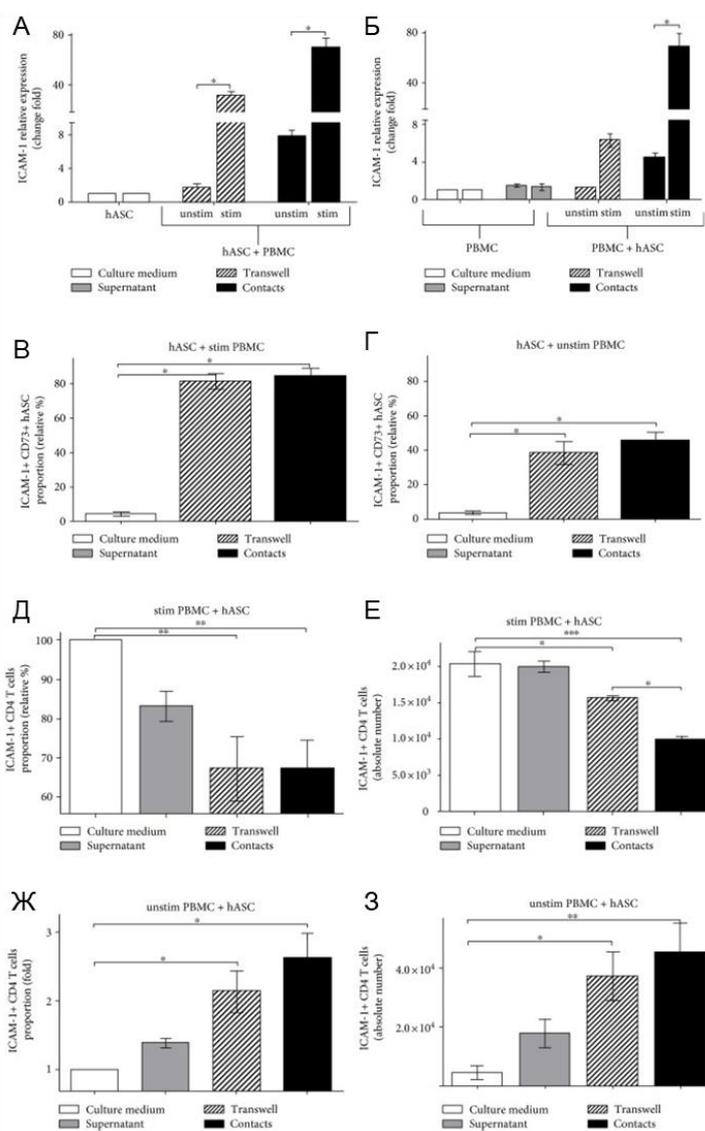


Рисунок 31. Изменения уровня ICAM-1 в ходе опосредованной МСК иммуносупрессии. Уровни мРНК ICAM-1 в МСК (А) и РВМС (Б) из смешанных культур. Количество ICAM-1 на поверхности МСК (В, Г), стимулированных (Д, Е) или нестимулированных (Ж, З) РВМС из смешанных культур (все данные представляют собой среднее значение + SEM, n=6, \* p<0,05, \*\* p<0,01 и \*\*\* p<0,001).

### Растворимые факторы регулируют уровень ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов

Вполне возможно, что помимо контактных взаимодействий паракринные механизмы могут также способствовать изменению уровня ICAM-1 в МСК и лимфоцитах. Чтобы проверить эту гипотезу, супернатанты, собранные из культур МСК с активированными

лимфоцитами, добавили к активированным РВМС и МСК, культивируемым отдельно. Транскрипционная активность гена ICAM-1 как в МСК, так и в РВМС увеличивалась в

присутствии супернатантов. Таким образом, супернатанты, содержащие растворимые факторы, усиливают транскрипцию гена ICAM-1 и в лимфоцитах (рис. 32 А) и МСК (рис. 32 Б).

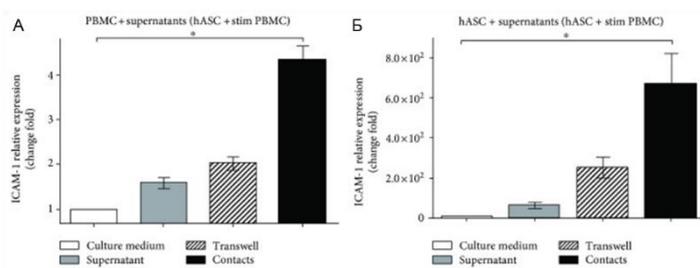


Рисунок 32. Супернатанты из смешанных культур hASC и активированных PBMC стимулируют транскрипцию ICAM-1 в МСК и PBMC. PBMC активировали анти-CD3 и CD28 и культивировали отдельно или с

hASC в контактных и бесконтактных условиях (48 ч). Супернатанты добавляли к активированным PBMC или МСК, которые далее росли по отдельности. Изменения относительного уровня мРНК ICAM-1 в PBMC (А) и МСК (Б) анализировали с помощью обратной транскрипции и qPCR через 48 часов инкубации с супернатантом (среднее значение + SEM, n=3, \* p<0,05).

транскрипции ICAM-1. Следует отметить, что супернатанты, собранные из культур, в которых Т-клетки контактировали с МСК, оказывают более сильное влияние на транскрипцию ICAM-1, чем те, которые получены из бесконтактных культур.

### **Блокировка ICAM-1 моноклональными антителами независимо от IDO нарушает МСК-опосредованную супрессию активированных Т-клеток, восстанавливая уровень CD25 на поверхности клеток**

Снижение ICAM-1 в активированных лимфоцитах, вызванное контактами с МСК, позволяет предположить, что ICAM-1 может участвовать в зависимой от контакта с клетками иммунной супрессии. Для проверки этого предположения заблокировали ICAM-1 на поверхности МСК и Т-клеток с помощью ICAM-специфических антител и проанализировали влияние блокировки ICAM на МСК-опосредованную супрессию Т-клеток. Инкубация с ICAM-1-блокирующими антителами приводит к значительному увеличению CD25 на поверхности лимфоцитов (рис. 33 А,Б) по сравнению с контрольными образцами, к которым добавляли IgG1. Чтобы проверить, может ли ICAM-1 влиять на уровень, оценивали транскрипцию IDO и уровень белка в условиях блокировки антителами к ICAM-1. Блокировка ICAM-1 не влияла на IDO как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции (рис. 33 В,Г). Уровень кинуренина в среде также не менялся (рис. 33 Д). Этот результат указывает на неперекрывающиеся роли для ICAM-1 и IDO в МСК-опосредованной иммуносупрессии. Дополнительные эксперименты необходимы для дальнейшего выяснения детального молекулярного механизма вовлечения ICAM в контакты между МСК и Т-клетками.

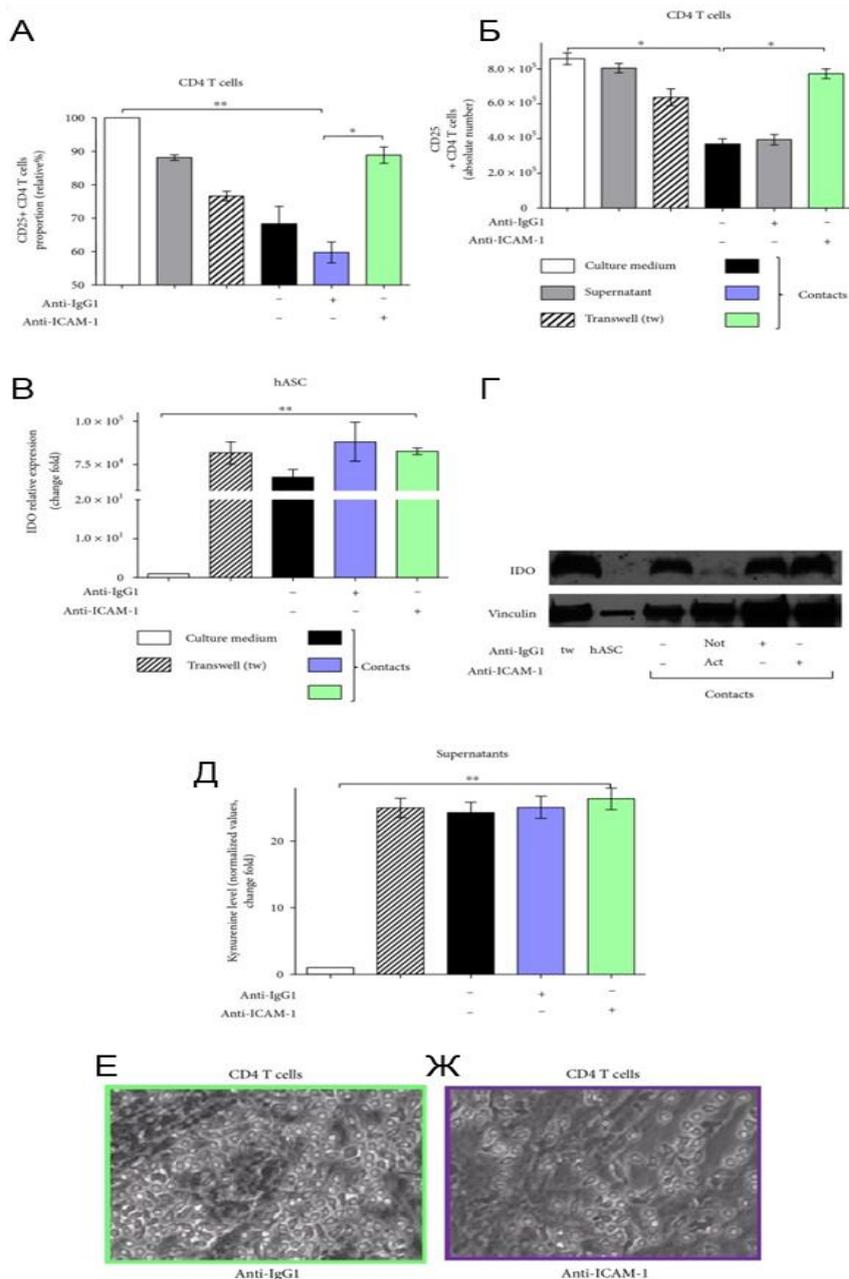


Рисунок 33. Блокировка SAM-1 ингибирует МСК-опосредованную иммуносупрессию независимо от IDO. CD<sup>25</sup><sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клетки, выделенные из РВМС и активированные анти-CD3/анти-CD28, культивировали отдельно или в присутствии МСК в присутствии анти-ICAM-1 или контрольного IgG1 в контактных или бесконтактных условиях в течение 48 часов. Была определена доля и абсолютное количество CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клеток (А, Б, соответственно), изменение экспрессии гена IDO МСК (В), а также изменения количества белка IDO (Г) и уровень кинуренина в смешанных культурах (Д) (среднее значение + SEM, n=6, \*  $p < 0,05$  и \*\*  $p < 0,01$ ). Культуры Т-клеток-hASC после контрольной обработки IgG1 (Е) или анти-ICAM (Ж). Увеличение 10х.

## VII. СИСТЕМНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ

В заключение следует сказать, что приведенные в данной работе результаты позволяют констатировать, что существует несколько параллельных уровней регуляции иммунных реакций, которые зависят от молекулярных программ, заложенных в очень непохожих по своей природе видах клеток. На уровне отдельных регуляторных популяций, например, регуляторных Т-клеток, можно выделить узкоспециализированные тканеспецифичные популяции резидентных клеток, которые выполняют особые функции в контексте уникальных видов микроокружения и контактов с собственными и чужеродными

антигенами. Поэтому разработка и использование более совершенных физиологических моделей для исследования функций таких минорных популяций крайне важно, поскольку позволяет получить достоверную информацию о вкладе отдельных субпопуляций в процессы контроля системного и локального воспаления, а также регенерации тканей. В связи с ситуацией, которая складывается из-за пандемии COVID-19, такие исследования приобретают осязаемый приоритет, поскольку понятно, что ответ индивидуальных пациентов на вирусную инфекцию связан с генетикой и эпигенетикой регуляторных клеток, от которых зависит, будет ли ответ на вирус чрезмерным или контролируемым.

С другой стороны, крайне важен персонализированный подход, который тоже может быть основан на анализе состояния регуляторных клеток, что красноречиво демонстрируют результаты терапии метотрексатом пациентов с ранее нелеченым ранним ревматоидным артритом. Видно, что успех противовоспалительной терапии прямо коррелирует с состоянием и количеством регуляторных Т-клеток. Поэтому анализ этой популяции, который можно провести достаточно быстро и неинвазивно следует признать очень важным при выборе стратегии дальнейшего лечения. Ведь лечение с использованием неэффективных для данного конкретного пациента препаратов приведет к потере времени и может сильно усугубить состояние больных и возможный успех дальнейшего лечения.

## **ВЫВОДЫ**

- 1) Созданы и охарактеризованы новые линии мышей для Cre-опосредованного кондиционного нокаута генов в регуляторных CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-клетках, а также для индуцируемого тамоксифеном Трег-специфического нокаута;
- 2) Получена линия мышей с Трег-специфическим нокаутом IL-10. Установлено, что секреция IL-10 регуляторными Т-клетками не нужна для поддержания системной иммунологической толерантности, однако необходима для контроля воспаления в барьерных тканях (кишечнике, коже и легких);
- 3) Создана новая репортерная линия мышей для индуцируемого инвариантного генетического мечения Трег с помощью флуоресцентного белка. Установлено, что Трег тимусного происхождения чрезвычайно стабильны и не превращаются в заметной степени в эффекторные Т-клетки. Высокий уровень синтеза Foxp3 сохраняется нормальных условиях на протяжении всей жизни животных, а также в условиях индукции Th1 ответа и лимфопении. Синтез Foxp3 в Трег удается снизить только с помощью деплетирования IL-2 нейтрализующими антителами;
- 4) Создан флуксированный аллель гена Foxp1, индукция Cre-зависимой рекомбинации которого приводит к функциональному нокауту фактора транскрипции

Foxp1. Установлено, что Трег-специфический нокаут Foxp1 приводит к фенотипическому и функциональному дефекту в Трег. Foxp1-дефицитные Трег чаще погибают от апоптоза и хуже супрессируют эффекторные Т-клетки. Эти дефекты вызваны снижением связывания Foxp3 с хроматином, что приводит к ингибированию транскрипции ряда Трег-специфических генов, а также сниженному ответу на IL-2. Кроме того, Foxp1-дефицитные Трег хуже подавляют ответ на опухоль в мышинной модели;

5) На образцах Трег периферической крови здоровых доноров и пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом показано, что тяжесть заболевания коррелирует с пониженным количеством Трег, которые несут меньшее количество маркеров активации. Эффективность терапии метотрексатом прямо коррелирует с увеличением числа Трег крови и увеличением уровня маркеров активации. Показано, что Трег могут служить клеточным прогностическим маркером при ревматоидном артрите;

6) Установлено, что молекула клеточной адгезии ICAM-1 играет важную роль в зависящей от образования контактов между клетками супрессии активации и пролиферации Т-клеток мезенхимными стромальными клетками человека.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в иностранных рецензируемых журналах:**

- 1) A. Avdeeva, **Y. Rubtsov**, D. Diykanov, T. Popkova, E. Nasonov. Regulatory T cells in patients with early untreated rheumatoid arthritis: Phenotypic changes in the course of methotrexate treatment. *Biochimie*, (2020), V. 174, pp. 9-17 (doi: 10.1016/j.biochi.2020.03.014)
- 2) V.M. Ukrainskaya, **Y.P. Rubtsov**, V.D. Knorre, M.A. Maschan, A.G. Gabibov, A.V. Stepanov. The Role of Tumor-Derived Vesicles in the Regulation of Antitumor Immunity. *Acta Naturae*, (2019), V.11(4), pp. 33-41(doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-3)
- 3) C.Konopacki, Y.Pritykin, **Y.Rubtsov**, C.S.Leslie, A.Y.Rudensky. Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. *Nat Immunol.* (2019), V.20(2), pp. 232-242. (doi: 10.1038/s41590-018-0291-z)
- 4) **Y.Rubtsov**, K.Goryunov, A.Romanov, Y.Suzdaltseva, G.Sharonov, V.Tkachuk. Molecular Mechanisms of Immunomodulation Properties of Mesenchymal Stromal Cells: A New Insight into the Role of ICAM-1. *Stem Cells Int.* (2017), 2017:6516854. (doi: 10.1155/2017/6516854)
- 5) T.Nenasheva, A.Nikolaev, D.Diykanov, A.Sukhanova, E.Tcyganov, A.Panteleev, I.Bocharova, Y.Serdyuk, L.Nezlin, T.Radaeva, N.Adrianov, **Y.Rubtsov**, I.Lyadova. The introduction of mesenchymal stromal cells induces different immunological responses in the lungs of healthy and M. tuberculosis infected mice. *PLoS One.* (2017), V.12(6):e0178983. (doi: 10.1371/journal.pone.0178983)

- 6) **Y.P.Rubtsov**, Y.G.Suzdaltseva, K.V.Goryunov, N.I.Kalinina, V.Y.Sysoeva, V.A.Tkachuk. Regulation of Immunity via Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Acta Naturae*. (2012) V.4(1), pp. 23-31.
- 7) **Y.P.Rubtsov**, R.E.Niec, S.Josefowicz, L.Li, J. Darce, D.Mathis, C.Benoist, A.Y.Rudensky. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science*. (2010) V.24;329(5999), pp.1667-1671. (doi: 10.1126/science.1191996).
- 8) **Y.P.Rubtsov**, J.P.Rasmussen, E.Y.Chi, J.Fontenot, L.Castelli, X.Ye, P.Treuting, L.Siewe, A.Roers, W.R.Jr.Henderson, W.Muller, A.Y.Rudensky. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. (2008), V.28(4), pp.546-58. (doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.017).
- 9) L.Zhou, J.E.Lopes, M.M.Chong, I.I.Ivanov, R.Min, G.D.Victora, Y.Shen, J.Du, **Y.P.Rubtsov**, A.Y.Rudensky, S.F.Ziegler, D.R.Littman. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature*. 2008 V.453(7192), pp.236-240. (doi: 10.1038/nature06878).
- 10) **Y.P.Rubtsov**, A.Y.Rudensky. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat Rev Immunol*. (2007) V.7(6), pp.443-453. (doi: 10.1038/nri2095).
- 11) W.R.Jr.Henderson, E.Y.Chi, J.G.Bollinger, Y.T.Tien, X.Ye, L.Castelli, **Y.P.Rubtsov**, A.G.Singer, G.K.Chiang, T.Nevalainen T, A.Y.Rudensky, M.H.Gelb. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med*. (2007) V.204(4), pp.865-877. (doi: 10.1084/jem.20070029).

#### Статьи в российских рецензируемых журналах

- 12) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, М.В.Черкасова, Е.Л.Насонов. Динамика субпопуляций лимфоцитов, CD4+CD25+CD127- Т-регуляторных клеток у больных ревматоидным артритом на фоне терапии биоаналогом ритуксимаба (Ацеллбия). *Современная ревматология*. (2020), Т. 14, № 2, С. 20-26.
- 13) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Т.В.Попкова, Д.Т.Дыйканов, А.П.Алексанкин, Е.Л.Насонов. Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при ранней и развернутой стадиях ревматоидного артрита. *Научно-практическая ревматология*. (2018), Т. 56, № 4, С. 423-428.
- 14) Ю.Г.Суздалъцева, К.В.Горюнов, **Ю.П.Рубцов**. Роль межклеточных контактов в индукции синтеза индоламин-2,3-диоксигеназы в ММСК жировой ткани. *Цитология*. (2018), Т. 60, № 5, С. 338-347.
- 15) М.А.Кулебякина, Д.Т.Дыйканов, **Ю.П.Рубцов**, Е.В.Семина, В.А.Ткачук. Компоненты урокиназной системы оказывают реципрокное влияние на накопление противовоспалительных регуляторных и провоспалительных цитотоксических Т-лимфоцитов в селезенке. *Иммунология*. (2018), Т. 39, № 1, С. 38-43.
- 16) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Т.В.Попкова, Д.Т.Дыйканов, Е.Л.Насонов. Динамика уровня Foxp3+ регуляторных Т-лимфоцитов у больных ранним ревматоидным артритом на фоне терапии метотрексатом. *Научно-практическая ревматология*. (2017), Т. 55, № 4, С. 360-367.
- 17) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Д.Т.Дыйканов, Т.В.Попкова, Е.Л.Насонов. Взаимосвязь Foxp3+ регуляторных Т-клеток с активностью заболевания и уровнем антител при

- раннем ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. (2017), Т. 55, № 3, С. 245-251.
- 18) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Т.В.Попкова, Д.Т.Дыйканов, Е.Н. Александрова, Е.Л.Насонов. Взаимосвязь уровня и фенотипа Foxp3+ регуляторных Т-клеток с активностью заболевания и уровнем острофазовых показателей у пациентов с ранним ревматоидным артритом. *Вопросы организации и информатизации здравоохранения*. (2016), № 5, С. 8-10.
- 19) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Т.В.Попкова, Д.Т.Дыйканов, Е.Л.Насонов. Особенности фенотипа Т-регуляторных клеток при раннем ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. (2016), Т. 54, № 6, С. 660-666.
- 20) А.С.Авдеева, **Ю.П.Рубцов**, Д.Т.Дыйканов, Е.Л.Насонов. Клинико-патогенетическое значение Foxp3+ регуляторных Т-клеток при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. (2016), Т. 54, № 4, С. 442-455.
- 21) Е.Л. Насонов, Е.Н. Александрова, А.С. Авдеева, **Ю.П.Рубцов**. Т-регуляторные клетки при ревматических заболеваниях. *Научно-практическая ревматология*. (2014), Т. 52, № 4, С. 430-437.

#### Тезисы конференций

- 1) Рысенкова К.Д., Шмакова А.А., Семина Е.В., Ткачук В.А., Карагяур М.Н., Рубцов Ю.П., Дыйканов Д.Т., Рубина К.А. Использование технологии CRISPR/CAS9 для выключения экспрессии гена урокиназного рецептора в нейробластоме (Стендовый) // III Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 15-18 ноября 2017
- 2) Карагяур М.Н., Дыйканов Д.Т., Рубцов Ю.П., Тюрин-Кузьмин П.А., Калинина Н.И., Васильев П.А. Новое секретируемое одноцепочечное антитело для блокировки связывания IL-2 с высокоаффинным рецептором, содержащим субъединицу IL-2Ra (CD25) (Стендовый) // III Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 15-18 ноября 2017
- 3) Карагяур М.Н., Васильев П.А., Дыйканов Д.Т., Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Александрович Н.А., Шмакова А.А., Рубцов Ю.П. Эффективный способ CRISPR/Cas9-опосредованного выключения генов в клеточных популяциях с нестабильным кариотипом (Стендовый) // III Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 15-18 ноября 2017
- 4) Васильев П.А., Карагяур М.Н., Дыйканов Д.Т., Рысенкова К.Д., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Александрович Н.А., Семина Е.В., Рубцов Ю.П., Ткачук В.А. Optimization of the Crispr-Cas9 genome editing protocol to create model systems based on transformed cells with a complete karyotype (Стендовый) // CRISPR: From Biology to Technology and Novel Therapeutics, Ситжес, Испания, 22-24 октября 2017
- 5) Рубцов Ю.П., Казарновский М.С. Клеточная терапия аутоиммунных заболеваний (Стендовый) // Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания, Москва, Россия, 8-10 декабря 2016
- 6) Рубцов Ю.П., Горюнов К.В., Ткачук В.А., Суздальцева Ю.Г., Шаронов Г.В., Романов А.Ю. Молекулярные механизмы иммуномодуляции мезенхимными стромальными клетками: важная роль ICAM-1 (Стендовый) // Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания, Москва, Россия, 8-10 декабря 2016

- 7) Казарновский М.С., Рубцов Ю.П. Регуляторные Т-лимфоциты: контроль иммунологической толерантности и иммунитет к опухолям (Устный) // Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания, Москва, Россия, 8-10 декабря 2016 2016
- 8) Карагяур М.Н., Васильев П.А., Рубцов Ю.П., Рысенкова К.Д., Семина Е.В., Дыйканов Д.Т. Оптимизация метода модификации генома CRISPR-Cas9 для создания модельных систем на основе трансформированных клеток со сложным кариотипом (Стендовый) // Биомедицина-2016, Новосибирск, Россия, 26 июня - 1 июля 2016
- 9) Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Sysoeva V.Yu, Ageeve L.V., Tkachuk V.A., Sharonov G.V., Rubtsov Yu P., Kotova P.D., Kolesnikov S.S., Kalinina N.I. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells subpopulations that express different subtypes of adrenergic receptors are functionally distinct (Стендовый) // Cell technologies at the edge: research & practice, Санкт-Петербург, Россия, 6-8 апреля 2016
- 10) Balatskaya M.N., Tkachuk V.A., Rubtsov Yu P., Sharonov G.V. Adiponectin promotes the formation of microparticles in vitro (Устный) // EMBL Symposium: Seeing is Believig – Imaging the Processes of Life, Heidelberg, Germany, Германия, 2013

#### Патенты

- 1) В.А.Ткачук, Ю.Г.Суздальцева, **Ю.П.Рубцов**, К.В.Горюнов. Способ повышения иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани  
Патент на изобретение RU 2526575 C2, 27.08.2014. Заявка № 2012146826/10 от 02.11.2012.
- 2) В.А.Ткачук, Ю.Г.Суздальцева, **Ю.П.Рубцов**, К.В.Горюнов. Способ оценки иммуносупрессивных свойств мезенхимальных стромальных клеток человека  
Патент на изобретение RU 2539750 C2, 27.01.2015. Заявка № 2013115818/10 от 09.04.2013.