

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

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	7
1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ	14
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
2.1 Иммунологическая толерантность и регуляторные Т-клетки (Трег): история проблемы (Введение)	17
2.2 Белок FOXP3 – краеугольный камень доминантной иммунологической толерантности	20
2.3 Трег незаменимы для сохранения иммунного гомеостаза	22
2.4 Дифференцировка Трег в тимусе: сигнал от ТКР и дополнительные сигналы	24
2.4.1 Определяющая роль сигнала от ТКР.....	24
2.4.2 Сигналы от ко-стимулирующих молекул	27
2.4.3 Сигналы выживания: STAT5 и NF-κB	29
2.5 Цитокины и их рецепторы в тимусной дифференцировке Трег	31
2.5.1 Цитокины с общей гамма цепью, интерлейкин-2 (IL-2)	31
2.5.2 Фактор роста опухоли TGF-β.....	33
2.6 Дифференцировка Трег на периферии: требования к качеству сигнала от ТКР	34
2.7 Роль TGF-β и IL-2 в дифференцировке Трег на периферии	36
2.8 Дифференцировка Трег на периферии и активация Akt	37
2.9 Органы и ткани, в которых происходит периферическая конверсия Т-хелперов в Трег	39
2.10 Зависимые от Foxp3 транскрипционная программа и функции Трег	42
2.10.1 Транскрипционная программа Foxp3.....	42
2.10.2 Прямые мишени Foxp3	44
2.11 Белковые партнеры Foxp3	45
2.11.1 Рецепторы ретиноевой кислоты.....	45
2.11.2 Факторы ремоделирования и модификации хроматина.....	46
2.11.3 Сиквенс-специфичные факторы транскрипции	46
2.12 Функции микроРНК в Foxp3+ Трег	47
2.12.1 Делеция Dicer или Drosha приводит к потере супрессии и нарушениям в Foxp3-зависимой транскрипционной программе	47
2.12.2 МикроРНК контролируют супрессорную активность Трег.....	49
2.12.3 Роль отдельных микроРНК	50
2.12.3.1 miR-155.....	50
2.12.3.2 miR-146.....	51
2.12.3.3 miR-10a.....	52
2.12.3.4 Кластер miR17-92.....	52

2.12.3.5 miR-27.....	53
2.12.3.6 Семейство miR-125	53
2.12.3.7 miR-31.....	54
2.12.3.8 miR-142.....	54
2.13 Регуляция уровня Foxp3 и стабильность Трег	55
2.13.1 Стабильная экспрессия Foxp3 определяет фенотип и функции Трег	55
2.13.2 Пластичность фенотипа Трег	56
2.13.3 Молекулярные механизмы поддержания экспрессии гена Foxp3: роль модификаций хроматина.....	57
2.14 Молекулярные механизмы иммуносупрессии, опосредованные Трег	61
2.14.1 Обзор основных механизмов Трег-опосредованной иммуносупрессии	61
2.14.2 Супрессия отдельных типов иммунного ответа Трег	64
2.15 Трег в патогенезе аутоиммунных заболеваний на примере ревматоидного артрита ...	66
2.15.1 Основные факторы патогенеза РА	66
2.15.2 Современные методы терапии РА.....	69
2.15.3 Дефекты в Трег при ревматоидном артрите	70
2.15.4 Новые подходы к лечению РА: терапия, направленная на Трег	71
2.16 Заключение.....	73
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	75
3.1. Лабораторные животные.....	75
3.1.1 Мыши для проекта по кондиционному нокауту IL-10	75
3.1.2 Мыши для проекта с кондиционным аллелем Foxp1	75
3.2. Создание конструкций для таргетирования и трансгенных животных	76
3.2.1 Создание knock-in аллеля <i>Foxp3^{YFP-Cre}</i>	76
3.2.2 Создание мышей <i>Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}</i>	77
3.3 Методы, использованные в проекте по Трег-специфическому нокауту IL-10	77
3.3.1 Подтверждение вырезания аллеля <i>Il10^{flox}</i> с помощью ПЦР на геномной ДНК.....	77
3.3.2 Приготовление одноклеточных суспензий лимфоцитов из легких, толстой кишки и кожи	77
3.3.3 Выделение (сортировка) клеток и проточно-цитометрический анализ клеток, анализ продукции цитокинов	78
3.3.4 Гистопатологическая оценка спонтанного колита.....	78
3.3.5. Индукция аллергического воспаления легких, оценка функции и гистопатология легких	79
3.3.6. Кожно-контактная реакция гиперчувствительности	79
3.4 Методы, использованные в проекте по изучению стабильности Трег	80
3.4.1 Обработка тамоксифеном, нейтрализация IL-2 и кросс-сшивание CD40.....	80
3.4.2 Инфекция <i>Listeria monocytogenes</i>	80

3.4.3 Распад мРНК <i>in vitro</i>	80
3.4.4 Адоптивный перенос Т-клеток	81
3.5 Методы, использованные для проекта по Трег-специфическому нокауту Foxp1	81
3.5.1 Ответ на IL-2 <i>ex vivo</i>	81
3.5.2 Оценка спонтанного апоптоза <i>ex vivo</i>	82
3.5.3 Мечение клеток реагентом CellTrace и культивирование меченых клеток	82
3.5.4 Культивирование клеток с IL-2	82
3.5.5 Эксперимент по определению супрессорной активности <i>in vitro</i>	82
3.5.6 Секвенирование РНК	83
3.5.7 Иммунопреципитация хроматина и секвенирование	83
3.5.8 Биоинформатический анализ	83
3.6 Материалы и методы проекта по МСК	88
3.6.1 Материалы для проекта по МСК	88
3.6.2 Выделение МСК из жировой ткани	88
3.6.3 Выделение и активация лимфоцитов	89
3.6.4 Анализ пролиферации лимфоцитов	89
3.6.5 Ингибиторный анализ	89
3.6.6 ОТ-ПЦР	90
3.6.7 Вестерн-блоттинг	90
3.6.8 Анализ данных	91
3.7 Методы, использованные в проекте по РА	91
3.7.1 Пациенты и лечение метотрексатом	91
3.7.2 Измерение уровня сывороточных антител	91
3.7.3 Выделение РВМС и FACS-анализ поверхностных и внутриклеточных маркеров Трег ...	92
3.7.4 Статистический анализ	92
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	93
4.1 Генетические модели для Трег-специфического нокаута генов в мышах	93
4.1.1 Создание генетической модели для специфического нокаута генов в Трег	93
4.1.1.1 Введение (Обоснование необходимости создания линии мышей для направленного выключения генов в CD4+Foxp3+ Трег)	93
4.1.1.2 Создание и характеристика мышей Foxp3YFP-Cre. Определение специфичности синтеза химерного белка YFP-Cre в мышах линии C57/BL6 Foxp3YFP-Crex ROSA26-stop/flox-YFP	94
4.1.2 Генетическая модель для индукции Трег-специфического Cre-loxP нокаута генов во взрослых мышах	97
4.1.2.1 Введение (обоснование актуальности создания новой линии мышей)	97
4.1.2.2 Создание и анализ линии мышей Foxp3eGFP-Cre-ERT2 (определение специфичности синтеза химеры eGFP-Cre-ERT2)	98

4.1.3 Выяснение роли IL-10, секретируемого Трег, в защите от системного и локального аутоиммунитета.....	101
4.1.3.1 Аблиция IL-10 в клетках Трег не нарушает их развития и не приводит к системному аутоиммунитету.....	101
4.1.3.2 У мышей $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ развивается спонтанный колит	104
4.1.3.3 Повышенная гиперреактивность легких у мышей $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$	108
4.1.3.4 Повышенная гиперчувствительность кожи у мышей $Il10^{lox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$	113
4.1.4. Использование мышей $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}$ для выяснения стабильности Трег у взрослых мышей.....	115
4.1.4.1. Экспрессия Foxp3 стабильна в Трег в нормальных условиях в течение длительного периода (всей жизни мыши).....	115
4.1.4.2 Блокирование IL-2 путем хронического введения моноклональных антител негативно влияет на поддержание уровня (снижает уровень) Foxp3 в популяции Трег	118
4.1.4.3 Уровень Foxp3 стабилен в условиях лимфопении, вызванной нелетальным облучением	120
4.1.4.4 Инфекция <i>Listeria monocytogenes</i> или введение моноклональных антител к CD40 (ответ Th1) не влияют на синтез Foxp3 и стабильность популяции Трег	122
4.1.4.5 Популяция Трег стабильна в условиях аутоиммунного воспаления у мышей со спонтанным диабетом 1 типа	124
4.1.4.6 Популяция Трег отличается удивительной стабильностью в большинстве условий (в норме, при инфекции и при аутоиммунной патологии (Заключение)).....	126
4.2 Фактор транскрипции Foxp1 регулирует связывание Foxp3 с хроматином и координирует функцию Трег	127
4.2.1 Введение. Родственный Foxp3 белок Foxp1, вероятно, играет важную роль в поддержании фенотипа и функции Трег.....	127
4.2.2 Большинство участков связывания Foxp1 и Foxp3 с хроматином Трег совпадают	127
4.2.3 Трег-специфический нокаут Foxp1 у мышей с кондиционным аллелем гена <i>Foxp1</i> , скрещенных с мышами линии $Foxp3^{YFP-Cre}$	130
4.2.4 Связывание Foxp3 с хроматином снижено в отсутствие Foxp1	130
4.2.5 Foxp1-зависимая регуляция активности генов в Трег	133
4.2.6 Трег с нокаутом Foxp1 синтезируют цитокины, характерные для эффекторных клеток	135
4.2.7 Дефицит Foxp1 в Трег вызывает снижение способности к супрессии эффекторных клеток	137
4.2.8 Негативные эффекты, связанные с отсутствием Foxp1 в Трег, являются внутриклеточными (снижены уровни маркеров Трег (CTLA-4, CD25, CD39, CD73), повышено число пролиферирующих клеток с фенотипом Ki-67+, повышен процент спонтанном апоптоза клеток).....	141
4.2.9 Передача сигнала от IL-2 нарушена в Foxp1-дефицитных Трег.....	143
4.2.10 Foxp1 в комплексах с Foxp3 регулирует активность генов, необходимых для поддержания фенотипа и функции Трег	144

4.3 Трег пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом: связь количества и фенотипа с клиническими проявлениями и эффективностью терапии	144
4.3.1 Трег в патогенезе ревматоидного артрита (РА)	144
4.3.2 Снижение числа Трег у пациентов с ранним РА ассоциировано со значительным уменьшением числа Трег, несущих маркеры активации	146
4.3.3 Тяжесть симптомов и высокий уровень аутоантител положительно коррелируют с низким уровнем активированных Трег	150
4.3.4 Лечение метотрексатом увеличивает количество Трег и восстанавливает уровень маркеров активации	151
4.3.5 Пациенты с высоким уровнем CTLA-4 на поверхности Трег чаще отвечают на метотрексат	152
4.3.6 Оценка числа активированных Трег может служить предиктором ответа на метотрексат и эффективности терапии	153
4.4 Мезенхимные стромальные клетки (МСК) из висцеральной жировой ткани проявляют иммуносупрессорные свойства в культуре с Т-клетками: роль ICAM-1	154
4.4.1 МСК могут угнетать активацию и деление активированных Т-клеток в культуре (введение)	154
4.4.2 МСК супрессируют пролиферацию активированных лимфоцитов в смешанных культурах	156
4.4.3 Супрессия активации Т-хелперов МСК происходит за счет снижения уровня α субъединицы рецептора IL-2(CD25) на поверхности активированных лимфоцитов	159
4.4.4 Секреция IDO – это основной механизм бесконтактной супрессии лимфоцитов в культурах с МСК	159
4.4.5 В отсутствие активации МСК поддерживают жизнеспособность лимфоцитов	163
4.4.6 Уровень ICAM-1 резко возрастает на поверхности лимфоцитов и в МСК при со-культуривировании	164
4.4.7 Снижение уровня ICAM-1 в присутствии МСК происходит только при активации лимфоцитов	166
4.4.8 МСК индуцируют появление ICAM на поверхности лимфоцитов в отсутствие активации	166
4.4.9 Растворимые факторы регулируют уровень ICAM-1 на поверхности МСК и лимфоцитов	167
4.4.10 Блокировка ICAM-1 моноклональными антителами независимо от IDO нарушает МСК-опосредованную супрессию активированных Т-клеток, восстанавливая уровень CD25 на поверхности клеток	169
4.4.11 Молекулы клеточной адгезии – потенциальная мишень для контроля воспаления в тканях	169
5. СИСТЕМНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ (ЗАКЛЮЧЕНИЕ)	171
6. ВЫВОДЫ	172
7. ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	173

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСРА (anti-citrullinated protein antibody) – антитела к цитруллинированным белкам

Akt – протеинкиназа B

AP-1 (activator protein -1) – белок-активатор-1

Arl1 (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) – ген белка, гомолога ядерного транслокатора арил-гидрокарбонового рецептора

B7-1 (CD80) – белок B7 1 типа

B7-2 (CD86) – белок B7 2 типа

BAC (bacterial artificial chromosome) – искусственная хромосома бактерий

Bcl2 (B cell lymphoma 2) – белок B-клеточной лимфомы 2

Bcl6 (B cell lymphoma 6) – белок B-клеточной лимфомы 6

Bcl10 (B cell lymphoma 10) – белок B-клеточной лимфомы 10

BGH (bovine growth hormone) – бычий гормон роста

Bim (Bcl-2-like protein 11) – Bcl-2-подобный белок 11

BRG1 (ATP-dependent chromatin remodeler SMARCA4) – АТФ-зависимый белок ремоделирующий хроматин SMARCA4

C57/BL6 – инбредный мыши линии “Black 6”

CARMA1 (CARD-containing MAGUK protein 1) – содержащий CARD домен белок MAGUK 1

CBF β (Core-binding factor subunit beta) – бета субъединица корового фактора связывания

CD4 – кластер дифференцировки 4, корецептор T-клеточного рецептора, представленный на T-хелперах

CD3 – кластер дифференцировки 3, один из компонентов комплекса T-клеточного рецептора

CD8 – кластер дифференцировки 8, корецептор T-клеточного рецептора, характерный для цитотоксических лимфоцитов

CD5 - кластер дифференцировки 5, маркер субпопуляции B-1a B-клеток

CD25 – кластер дифференцировки 25 или IL-2Ra, альфа субъединица рецептора интерлейкина-2

CD28 – кластер дифференцировки 28, ко-стимуляторная молекула T-клеток, связывает B7-1 и B7-2 на поверхности антиген-презентирующих клеток

CD38 – кластер дифференцировки 38, гидролаза циклической АДФ-рибозы

CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) – эктонуклеозид-трифосфат дифосфогидролаза-1

CD40 – кластер дифференцировки 40, ко-стимуляторная молекула поверхности антиген-презентирующих клеток, связывает CD154 (CD40L)

CD44 (HСAM – homing cell adhesion molecule) – рецептор гиалуроновой кислоты, лиганд E- и L-селектинов

CD45 – тирозиновая протеинфосфатаза рецепторного типа C, общий антиген лейкоцитов (LCA)

CD45RA – одна из изоформ CD45, характерная для наивных Т-клеток

CD45RO – изоформа CD45, представленная на клетках памяти и активированных лимфоцитах

CD62L (LСAM-1) – селектин-L

CD69 (AIM) – молекула индуктор активатора

CD73 – экто-5'-нуклеотидаза

CD46 – мембранный белок-кофактор

CD80 - белок В7 1 типа

CD83 – кластер дифференцировки 83, маркер созревания дендритных клеток

CD86 - белок В7 2 типа

CD103 – интегрин альфа E

CD122 – бета субъединица рецептора интерлейкина 2

CD133 – антиген 133 или проминин-1

Chd7 – АТФ-зависимая хеликаза CHD7

ChIP – иммунопреципитация хроматина

Cited2 (Cbp/p300-interacting transactivator 2) – взаимодействующий с Cbp/p300 трансактиватор 2

c-myc – протоонкоген myc

CNS – центральная нервная система

CpG – динуклеотид, мишень для геномного метилирования цитозина

Cre – рекомбиназа бактериофага P1

CREB-ATF1 – транскрипционный комплекс, состоящий из белка, связывающего элемент ответа на цАМФ и активирующего фактора транскрипции-1

CXCR3 – рецептор хемокинов CXCR3

CXCR5 – C-X-C рецептор хемокинов типа 5

c-Rel – протонкоген c-Rel, одна из субъединиц фактора транскрипции NF-κB

CTLA4 – белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами

DMEM – культуральная среда Игла в модификации Дульбекко

Dnajb6 – гомолог DnaJ подсемейства В 6

DNFB – динитрофторбензол

Dnmt1 – цитозин-5-ДНК-метилтрансфераза 1

DP – стадия развития тимоцитов «двойные позитивные», клетки одновременно несут на поверхности CD4 и CD8

DTR – рецептор дифтерийного токсина

EAE – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

Ebi3 – бета субъединица интерлейкина-27

eGFP – яркий зеленый флуоресцентный белок

Eos – белок-цинковый палец Eos, продукт гена *IKZF4*

ER – рецептор эстрогена

ERT2 – модифицированный лиганд-связывающий домен рецептора эстрогена

Ets-1 – белок C-ets-1

FACS – проточная цитометрия

Fasl – лиганд Fas

FCS – fetalная коровья сыворотка

flx – фланкированный loxP сайтами

FLPe – флиппаза, сайт-специфическая рекомбиназа дрожжей, узнает сайты *flx*

Foxo1 – белок forkhead box O1

Foxo3 – белок forkhead box O3

Foxp1 – белок forkhead box P1

Foxp2 – белок forkhead box P2

Foxp3 – белок forkhead box P3

FRT – сайт узнавания рекомбиназы FLPe

GALT – ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань

GAPDH – глицеральдегидфосфат дегидрогеназа

GARP – комплекс ретроградного комплекса белков в Гольджи

GATA3 – фактор транскрипции GATA3

GFP – зеленый флуоресцентный белок

GITR (TNFRSF18) – родственный рецептору TNF белок, индуцируемый глюкокортикоидами

GzmB – гранзим В

Gprc5a – индуцируемый ретиноевой кислотой белок 3

GVHD – реакция трансплантат против хозяина

H3K4me1 – метилированный по лизину 4 гистон H3

H3K27Ac – ацетилированный по лизину 27 гистон H3

HScgr – хрящевой аутоантиген человека

HDAC7 – деацетилаза гистонов-7

H3f3b – H3.3 гистон 3В

HLA – лейкоцитарный антиген человека

Hiver3 – ген фактора транскрипции HIVER3

HOMER – название алгоритма поиска мотивов

Hoxb4 – ген гомеобоксного белка Hox-B4

HPRT – гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза

HSC – гемопоэтические стволовые клетки

4-1BB – рецептор семейства рецепторов TNF -9

IBD – воспалительное заболевание кишечника

IFN- γ – интерферон гамма

IgA – иммуноглобулин А

IgG – иммуноглобулин G

IgE – иммуноглобулин E

IKK2 – бета субъединица ингибитора киназы фактора транскрипции NF- κ B

IL – интерлейкин

IREX – синдром X-сцепленной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии

IRF4 – интерфероновый регуляторный фактор-4

Ikzf4 – ген Eos

Ki-67 – антиген KI-67, маркер пролиферации

Ku70 – белок гетеродимера Ku с массой 70 кДа

Ku80 – белок гетеродимера Ku с массой 80 кДа

LAG-3 – ген активации лимфоцитов-3

loxP – сайт узнавания рекомбиназы Cre

LLO – листериолизин

LPL – лимфоциты из базальной пластинки lamina propria

Ly5.1 – аллельный вариант CD45.1

Ly5.2 – аллельный вариант CD45.2

LysM-Cre – Cre под контролем промотора лизоцима M, используется для нокаута генов в макрофагах

MAIT – ассоциированные со слизистыми оболочками инвариантные T-клетки

MBD3 – белок, содержащий домен связывания метилированных CpG, -3

MBP – основной белок миелина

MHC I – главный комплекс гистосовместимости I типа

MHC II – главный комплекс гистосовместимости II типа

mAb – моноклональное антитело

miR – микроРНК

mTEC – медуллярные клетки эпителия тимуса

mTOR – мишень рапамицина млекопитающих

MTX – метотрексат

Ncor2 – ядерный рецептор ко-репрессор-2

Neo – неомицин

NF-AT – ядерный фактор активированных T-клеток

NF-κB – ядерный фактор энхансер легкой цепи каппа B-клеток

Nr4a1 (Nur77) – нейтральный фактор роста IB

NK – натуральный киллер

NKT – натуральные киллеры T-клетки

NOD – линия мышей со спонтанным аутоиммунным диабетом

OVA – овалбумин

OX40 – белок семейства рецепторов TNF -4

PAD – пептидиларгинин-деаминаза

Pax5 – фактор транскрипции семейства paired box -5

PBS – фосфатный буферный раствор

PD-L1 – лиганд белка программируемой смерти

PGK – фосфолицераткиназа

PKCθ – протеинкиназа C тета

PMA – фторболовый эфир

PPAR γ – гамма рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором, или рецептор глицерона

Prdm1 – ген белка BLIMP-1, репрессора гена интерферона бета

Pten – белок фосфатаза и гомолог тензина

PU.1 – фактор транскрипции PU.1

RAR – рецептор ретиноевой кислоты

RFP – красный флуоресцентный белок

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

ROR α – схожий с рецептором ретиноевой кислоты орфанный рецептор альфа

ROR γ – схожий с рецептором ретиноевой кислоты орфанный рецептор гамма

ROR γ t – изоформа ROR γ , участвует в дифференцировке Th17 лимфоцитов

ROSA26 – локус в геноме мыши, который транскрипционно активен с самых ранних стадий онтогенеза, используется для создания репортерных линий

Runx1 – родственный Runt фактор транскрипции-1

RXR – ретиноидный рецептор X

S1P1 – рецептор сфингозин-1-фосфата-1

SCID – тяжелый комбинированный иммунодефицит

SHP-1 – нерцепторная тирозин-фосфатаза типа б

Smad – семейство факторов транскрипции, участвующих в передаче сигнала от рецептора TGF- β в ядро клетки

SOCS1 – супрессор цитокиновой сигнализации-1

SP – стадия развития тимоцитов, на которой они содержат на поверхности либо CD4, либо CD8

sPLA(2)-X – фосфолипаза -A2-X

Spo11 – белок, участвующий в мейотической рекомбинации

STAT – фактор транскрипции проводник сигнала – активатор транскрипции

T-bet – фактор транскрипции семейства T-box TBX21, необходим для образования Th1 T-клеток

TKR – T-клеточный рецептор

TFH – T-клетки фолликулярные хелперы

TGF- β – фактор роста опухоли бета

TGF- β RII – рецептор фактора роста опухоли II

Th1 – T-хелперы типа 1

Th2 – Т-хелперы типа 2

Th17 – Т-хелперы типа 17

Thy1.1 – аллельный вариант CD90

TIGIT – иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM

TIP60 – гистон-ацетилтрансфераза KAT5

TLR – Толл-подобный рецептор

TNF- α – фактор некроза опухоли альфа

TNFRII – рецептор TNF II

TORC2 (CRTC2) – регулируемый CREB ко-активатор транскрипции-2

Tris – трис-гидроксиметил-аминометан

UTR – нетранслируемый район

YFP – желтый флуоресцентный белок

γ c – общая гамма цепь (рецепторов интерлейкинов)

АПК – антиген-презентирующие клетки

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

кДНК – ДНК-копия

мРНК – матричная РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РА – ревматоидный артрит

РС – рассеянный склероз

Tr1 – регуляторные клетки типа 1

Трег – регуляторные Т-клетки

иТрег индуцируемые Трег

нТрег – натуральные Трег

тТрег – тимусные Трег

цАМФ – циклоАМФ

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

1. АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Необходимость защиты многоклеточных организмов от бактерий, вирусов и паразитов потребовала создания сложных молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих уничтожение различных типов патогенных организмов. Совокупность этих механизмов представляет собой систему иммунитета, которая достаточно успешно (в случае млекопитающих и человека) справляется с задачей борьбы с патогенами. Однако способность иммунной системы уничтожать патогены и зараженные клетки представляет собой угрозу и для самого организма. Совокупность биохимических и физиологических реакций, происходящих при активации клеток иммунной системы, получившая название воспаление, приводит к повреждению тканей и органов, а также системным изменениям на уровне всего организма. Иммунный ответ и ассоциированное с ним воспаление требуют тщательного контроля. Поэтому на генетическом и клеточном уровне клетки иммунной системы подчиняются негативным инактивирующим сигналам, которые необходимы для завершения воспаления при отсутствии патогенов, успешной репарации поврежденных тканей и предотвращения избыточного иммунного ответа на инфекцию или собственные антигены. Совокупность таких механизмов была названа иммунологической толерантностью. Нарушения иммунологической толерантности приводят к развитию воспалительных лимфопролиферативных заболеваний, к которым, в первую очередь, относятся социально значимые тяжелейшие аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит, болезнь Крона, рассеянный склероз, псориаз, астма и многие другие. Важнейшим компонентом иммунной системы являются Т-лимфоциты. Основными функциями этих клеток являются распознавание чужеродных молекул, секреция белков, стимулирующих фагоцитоз, удаление патогенов и стимуляция созревания и секреции антител В-клетками, а также уничтожение клеток, зараженных вирусами или бактериями, и трансформированных клеток. Т-лимфоциты несут на поверхности специализированные комплексы белков, получившие название рецепторов Т-клеток (ТКР). Эти комплексы определяют способность Т-клеток делиться, мигрировать и секретировать биоактивные молекулы, а также убивать зараженные клетки. Уникальной особенностью этих рецепторов является способ их синтеза: в Т-клетках и В-клетках происходит рекомбинация фрагментов генов, которая в статистической манере определяет аминокислотную последовательность переменных участков альфа и бета субъединиц ТКР или рецепторов В-клеток. Следует подчеркнуть, что этот сложный процесс позволяет генерировать в тимусе огромное разнообразие Т-клеточных рецепторов и, соответственно, Т-клеток с разной антигенной специфичностью, причем каждая Т-клетка несет уникальный по аминокислотной

последовательности ТКР. Принцип «одна Т-клетка – один рецептор» позволяет при инфекции быстро размножиться Т-клеткам с нужной специфичностью к патогену, обеспечивая уничтожение патогенов и зараженных клеток, а также секрецию высокоаффинных специфических антител. Такая селективность ответа позволяет рационально использовать ресурсы организма на борьбу с инфекцией.

Беспрецедентное разнообразие специфичностей ТКР и Т-клеток получило название репертуара ТКР, который позволяет распознать практически любые пептидные (и не только) антигены. Наряду с неоспоримым преимуществом, гарантирующим узнавание практически любых патогенов и их компонентов, потенциально Т-клетки могут связывать и собственные пептидные антигены. Для исключения такой спонтанной активации Т-клеток в ответ на «свое» существует система негативной селекции Т-клеток в тимусе, которая элиминирует потенциально аутореактивные клетки на стадии их созревания до контакта с периферическими антигенами (1). Однако система негативной селекции несовершенна, что приводит к выходу на периферию 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), а также 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 лимфопрлиферацию и воспаление.

Генетические факторы, неблагоприятные внешние воздействия и стрессы приводят к тому, что механизмы иммунологической толерантности могут оказаться малоэффективными. Это вызывает спонтанную или индуцированную (в случае аллергии или астмы) активацию клеток иммунной системы, в первую очередь, Т-клеток, что ведет к развитию тяжелых лимфопрлиферативных воспалительных аутоиммунных заболеваний. Доказано, что частичная потеря функционального потенциала или существенное уменьшение числа Трег ассоциированы с и могут быть 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 актуальным. С другой стороны, локальное увеличение количества и функциональной активности иммуносупрессорных клеток (Трег, опухолевые макрофаги, супрессорные клетки миелоидного происхождения) способствует формированию и

прогрессии солидных опухолей. Образование опухолевого иммуносупрессорного микроокружения снижает эффективность существующих методов таргетной иммунотерапии. Поэтому понимание молекулярных программ, обеспечивающих деление, поддержание фенотипа и иммуносупрессорные функции специализированных регуляторных клеток позволит решить важные фундаментальные и практические проблемы. Так, возможность регулировать число иммуносупрессорных клеток, а также селективно блокировать молекулы, которые они используют для «угнетения» эффекторных Т-клеток и клеток врожденного иммунитета, может существенно расширить арсенал терапии аутоиммунных и онкологических заболеваний. В настоящее время уже предпринимаются успешные попытки терапии аутоиммунного диабета с помощью трансплантации Трег, а также использования мезенхимных стромальных клеток и их секретомы 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 мышцах. 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Иммунологическая толерантность и регуляторные Т-клетки (Трег): история проблемы (Введение)

Отличительной чертой системы приобретенного (адаптивного) иммунитета является создание огромного разнообразия иммунных рецепторов для ожидаемой встречи с быстро изменяющимися старыми (с которыми уже был контакт) и новыми патогенами. Эта эффективная стратегия защиты имеет существенные недостатки, с которыми невозможно не считаться. Поскольку рецепторы Т-клеток (ТКР) в процессе селекции в тимусе отбираются по способности (силе) связывания разнообразных лигандов, представляющих собой комплексы пептидов собственных белков организма с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС-пептиды), существует вероятность образования потенциально патогенных аутореактивных Т-клеток. Варибельные рецепторы, с одной стороны, потенциально могут узнавать молекулы МНС без пептидов, с другой, связывать пространственные эпитопы в составе собственных белков (1). Система приобретенного иммунитета должна ограничивать нежелательный ответ на собственные антигены, пищевые антигены, молекулы комменсальных симбиотических микроорганизмов и других внешних антигенов, которые могут не быть представлены созревающим Т-клеткам в момент формирования репертуара ТКР в тимусе. Кроме того, ограничение иммунного ответа в случае инфекций является ключевым моментом в предотвращении избыточного воспаления и повреждения собственных тканей. Продолжающаяся в настоящее время пандемия COVID-19 выявляет проблемы, возникающие в случае неоптимального иммунного ответа.

В процессе негативной селекции аутореактивные Т-клетки в тимусе претерпевают элиминирование или функциональную инактивацию, что приводит к нейтрализации подавляющего большинства Т-клеток, способных с высокой аффинностью узнавать/связывать собственные антигены. На периферии хроническая стимуляция ТКР аутоантигенами индуцирует в Т-клетках состояние анергии. Иммунологическую толерантность на периферии поддерживает требование одновременной стимуляции ТКР комплексом МНС-пептид и связывания ко-стимулирующего рецептора CD28 с лигандами CD80 или CD86 (B7-1 или B7-2) (2). Появление на мембране антиген-презентирующих клеток CD80 и CD86 индуцирует стимуляция на их поверхности рецепторов врожденного иммунитета (например, TLR) в ответ на появление молекул вирусного или бактериального происхождения, либо активация сенсоров метаболических изменений, вызванных микроорганизмами (Рис. 2-1).

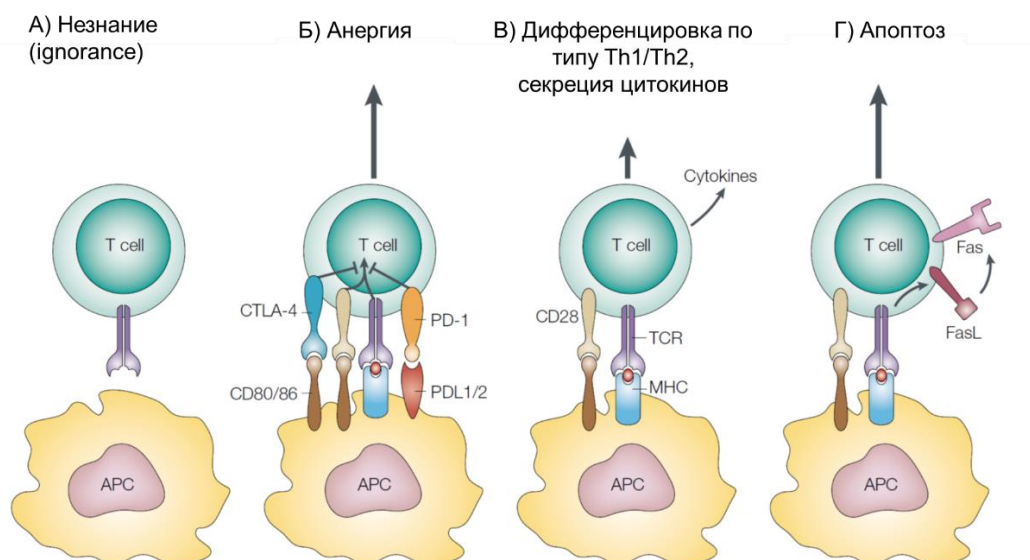


Рисунок 2-1. Внутриклеточные механизмы толерантности Т-клеток (DOI: 10.1038/nri701). Показаны основные пары поверхностных рецепторов-лигандов, отвечающие за ингибирование активации Т-клеток.

Тем не менее, внутриклеточных механизмов толерантности, а также необходимости двух одновременных стимулирующих сигналов недостаточно, чтобы противостоять угрозе иммунологической патологии. Поэтому существует специализированный тип Т-клеток, Трег, которые ингибируют патологические иммунные реакции *in trans*. Доказательство формирования в тимусе этой популяции клеток, супрессирующей другие клетки иммунной системы, было получено в опытах по неонатальной резекции тимуса у мышей, которые осуществили Nishizuka и Sakaguchi, а позднее и другие авторы (3-6). Независимо образование этих клеток было продемонстрировано в исследованиях трансплантационной толерантности на химерах курица-перепел и различных линиях мышей в работе Le Douarin с соавторами (7). У мышей удаление тимуса в интервале от 2 до 4 дней после рождения приводило к воспалению тканей, сопровождающемуся накоплением Т-клеток, которое предотвращала трансплантация тимоцитов или спленоцитов, полученных от взрослых мышей с нормальным тимусом (3-6). Эти эксперименты свидетельствуют, что в тимусе мышей через 3 дня после рождения образуется популяция Т-клеток, которая контролирует развитие аутоиммунного заболевания.

Эксперименты на химерах курица-перепел показали, что пересадка эпителиальных клеток тимуса необходима для создания трансплантационной межвидовой толерантности (7). В данной системе куриным эмбрионам с предварительно удаленным тимусом пересаживали эпителий тимуса эмбрионов перепелов, у которых ещё не произошла гематопозитическая колонизация тимуса. Такая трансплантация приводила к дифференцировке и селекции Т-клеток реципиента (курица) в тимусе в ответ на узнавание

донорских антигенов, представленных на поверхности донорского эпителия тимуса (перепел). Образующиеся Т-клетки иммунологически компетентны, например, способны вызывать отторжение трансплантата от другого (третьего) донора, но толерантны по отношению к пересадке тканей от донора тимусного эпителия, перепела. Похожие эксперименты по аллогенной пересадке тимусного эпителия у мышей также показали, что полная клональная делеция аллореактивных (по отношению к донору тимусного эпителия) клеток не является необходимой для индукции толерантности к аллогенному трансплантату (8). Это подразумевает, что существует популяция образующихся в тимусе клеток, которые ингибируют аллореактивные Т-клетки. Дополнительные опыты по переносу толеризованных по отношению к трансплантату Т-клеток в бестимусных голых мышей выявили, что уменьшение числа перенесенных клеток приводит к пониженной или нарушенной толерантности. Эти данные говорят о том, что толерантные химеры после пересадки тимусного эпителия содержат и реактивные по отношению к трансплантату эффекторные Т-клетки, и более малочисленную популяцию супрессорных Т-клеток, которые предотвращают отторжение трансплантата (9). На основании результатов вышеупомянутых экспериментов Le Douarin с коллегами пришли к выводу, что «толерантность к собственным антигенам, по крайней мере частично, зависит от взаимодействия потенциально вредных клеток, узнающих собственные антигены, и других клеток, которые строго контролируют реактивность первых. Последний тип клеток образуется при взаимодействии тимоцитов с компонентами тимусной эндодермы» (10). В довершение к этим исследованиям аутоиммунитета и толерантности, была обнаружена супрессорная функция субпопуляции CD4⁺ Т-клеток с фенотипом похожим на фенотип уже контактировавших с антигеном не наивных клеток. Эти эксперименты заключались в переносе бестимусным крысам или мышам линии SCID супрессорной субпопуляции, смешанной с вызывающими колит Т-клетками с фенотипом CD4CD45RB^{high} (11,12). Предотвращение заболевания колитом в этих ранних работах подразумевало, что, помимо контроля иммунного ответа на собственные и полученные при трансплантации антигены, супрессорные CD4⁺ Т-клетки могут ограничивать ответ на пищевые антигены и микрофлору кишечника.

Кульминация ранних исследований Трег наступила в 1995 году, когда была обнаружена популяция CD4⁺ Т-клеток, которые конститутивно несли на поверхности большое количество альфа цепи рецептора интерлейкина-2 (IL-2), являющейся маркером CD25. Эти клетки, получившие название регуляторных Т-клеток (или Трег) с поверхностным фенотипом CD4⁺CD25⁺, имели очень высокую супрессорную активность

по отношению к эффекторным Т-клеткам (13). При переносе мышатам, у которых через 3 дня после рождения удалили тимус, Трег предотвращали развитие спонтанного аутоиммунного заболевания. В различных экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний Трег замедляли отторжение трансплантата и снижали иммунитет к опухолям (14,15). Обнаружение супрессорной субпопуляции с фенотипом CD25+CD4+ в пуле «single-positive» тимоцитов (6) свидетельствует о дифференцировке этих клеток в тимусе. Использование CD25 в качестве маркера Трег позволило провести функциональный анализ этой популяции, выделенной из неиммунизованных животных, но его применимость ограничивалась тем фактом, что все Т-клетки при активации со временем повышают уровень CD25 на поверхности. Невозможность различать популяции Т-клеток, вызывающих и ингибирующих воспаление в ходе иммунного ответа, препятствовала характеристике доминантной иммунологической толерантности, опосредованной Трег, в особенности, её механистических деталей. Кроме того, была выдвинута гипотеза, что несущие CD25 Трег являются особым состоянием активированных «обычных» CD4 Т-клеток, а способность популяции CD25+CD4+ подавлять иммунный ответ происходит попросту из-за конкуренции клеток за свободный IL-2.

2.2 Белок FOXP3 – краеугольный камень доминантной иммунологической толерантности

Современное понимание биологии Трег в значительной степени состоялось после идентификации и изучения в мышах и у пациентов с синдромом IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked – иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия, сцепленный с X-хромосомой) мутаций в гене фактора транскрипции FOXP3, расположенного на X-хромосоме (Рис. 2-2) (16-19). Мыши и пациенты с мутациями, которые инактивировали функцию белка FOXP3, были подвержены раннему летальному лимфопролиферативному, зависящему от Т-клеток заболеванию, которое сопровождается тиреоидитом, диабетом, гемолитической анемией, синдромом повышенного IgE, лимфаденопатией, спленомегалией, дерматитом и аномально высоким уровнем цитокинов (20). Важно, что болезнь развивалась только у гемизиготных мутантных самцов, но не у гетерозиготных самок, имевших только один мутантный по Foxp3 аллель (20). Последние не заболевали вследствие случайной инактивации X-хромосомы, что приводило к транскрипции аллеля Foxp3 дикого типа примерно в половине несущих этот белок Т-клеток (21). Такие нормальные клетки контролировали активацию патогенных Т-клеток с мутантным аллелем Foxp3 и эффекторных Т-клеток, что согласовалось с тем фактом, что Трег действуют *in trans* при условии, что мутации в Foxp3 не влияют на процесс

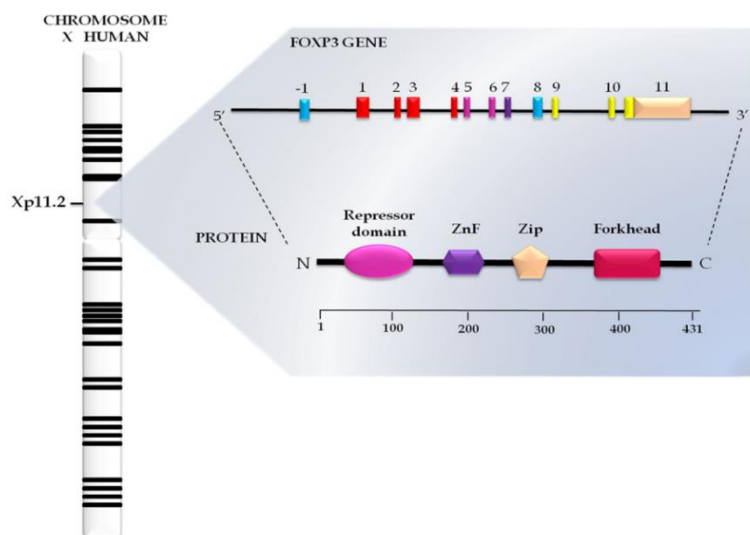


Рисунок 2-2. Ген и доменная организация белка FOXP3 человека (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00605>).

Слева показано расположение локуса FOXP3 на коротком плече X-хромосомы человека. Сверху – ген FOXP3 состоит из 11 экзонов. В белке из 431 аминокислоты выделяют репрессорный домен, цинковый палец (ZnF), лейциновую «молнию» (Zip, нужна для димеризации) и домен forkhead (участвует в связывании белка с ДНК).

случайной инактивации X-хромосомы. Это утверждение было подтверждено при анализе мышей с Foxp3 репортером (22, 23).

В ходе дальнейших исследований был выявлен стабильно высокий уровень транскрипции гена Foxp3 в мышинных CD4⁺CD25⁺ Трег, но не в наивных CD4⁺CD25⁻ Т-клетках или активированных CD4⁺ Т-клетках (24-26). У мышей, мутантных по Foxp3, Т-клетки становились активированными уже через несколько дней после рождения, при этом число CD4⁺CD25⁺ тимоцитов у этих животных было значительно снижено (25,26). Хотя эти данные согласуются с предположением, что Foxp3 необходим для дифференцировки Трег, однозначная интерпретация результатов, полученных на животных с ранним аутоиммунным заболеванием, затруднена. Для решения этой проблемы были созданы смешанные костномозговые химеры, которые содержали гематопозитические предшественники от Foxp3-дефицитных и аллельно-маркированных мышей дикого типа, и смесь гематопозитических стволовых клеток трансплантировали иммунодефицитным мышам, лишенным Т-клеток. Анализ CD4⁺CD25⁺ Т-клеток из тимуса и периферических лимфоидных органов этих химер, которые были абсолютно здоровы, то есть не имели признаков лимфопролиферативных или аутоиммунных патологий, показал, что CD4⁺CD25⁺ Трег образуются только из костного мозга мышей дикого типа (26). Это означало, что Foxp3 абсолютно необходим для дифференцировки и созревания Трег в тимусе. Стабильная продукция Foxp3 в активированных периферических CD4⁺CD25⁺ Т-клетках, которые трансдуцировали содержащим кДНК Foxp3 ретровирусом, приводил к тому, что Т-клетки приобретают поверхностный фенотип Трег, а также способность

супрессировать активацию Т-клеток (24,26). В мышах экспрессия трансгена с Foxp3 усиливает супрессорную активность CD8 Т-клеток (25). Уровень продукции Foxp3 в Трег критически важен для супрессорной функции, поскольку искусственное снижение уровня Foxp3 негативно влияет на нее (27). Более того, поддержание уровня Foxp3 в зрелых Т-клетках необходимо и для сохранения фенотипа Трег, и для сохранения супрессорной функции. Вырезание окруженного loxP сайтами («флоксированного») аллеля Foxp3 с помощью введения в зрелые Трег сайт-специфической рекомбиназы Cre приводит к постепенной потере способности к супрессии, утрате характеристических поверхностных маркеров Трег и приобретению «ex-Трег» функций эффекторных клеток, а именно, продукции про-воспалительных цитокинов IL-2, IL-4, IL-17 и IFN γ (28). Эти результаты убедительно доказывают, что Foxp3 играет центральную роль в дифференцировке, супрессорной функции и поддержании фенотипа Трег.

2.3 Трег незаменимы для сохранения иммунного гомеостаза

Анализ репортерных мышей, у которых транскрипция гена флуоресцентного белка GFP или RFP находится под контролем промотора Foxp3 (в геномном локусе), показал, что синтез белка Foxp3 происходит исключительно в части популяции CD4 Т-клеток (22, 29-31). Помимо клеток с фенотипом CD4+CD25^{high}, в некоторых CD4+ Т-клетках, в которых CD25 отсутствовал либо синтезировался на низком уровне, также выявлен синтез Foxp3 (22). Высокий иммуносупрессорный потенциал и CD25+, и CD25- Foxp3+ Т-клеток также подтверждает исключительную важность именно Foxp3 для созревания и функционирования Трег.

Ряд экспериментальных доказательств подтверждает, что отсутствие Трег вследствие дефицита FOXP3 является причиной фатального аутоиммунного заболевания:

- i. Адоптивный перенос Трег защищает новорожденных Foxp3-дефицитных мышат от аутоиммунного заболевания (26);
- ii. Мыши с полным нокаутом Foxp3 по прогрессии и тяжести аутоиммунных поражений неотличимы от мышей, у которых ген Foxp3 делетирован только в Т-клетках (22);
- iii. Делеция кондиционного (флоксированного) аллеля Foxp3 в эпителиальных клетках тимуса или дендритных клетках, которые определяют разнообразие репертуаров ТКР предшественников Т-клеток, не вызывает серьезных нарушений иммунитета или процессов созревания Т-клеток (32).

Кроме этого, делеция гена *Foxp3* в макрофагах с помощью трансгена *LysM-Cre* не меняет иммунного статуса мышей в нормальных условиях, а также не влияет на скорость роста или уровень метастазирования перевиваемой карциномы молочной железы. Таким образом, убедительные доказательства, полученные с помощью генетического анализа, указывают, что дефицит *Foxp3* только в Т-клетках является достаточным условием для развития заболевания, от которого погибают мыши с нокаутом *Foxp3*. Негативная селекция или индукция анергии в аутореактивных Т-клетках в процессе дифференцировки в тимусе мышей, нокаутных по *Foxp3*, не отличается от аналогичных процессов в нормальных животных (33,34). Наряду с этим, выключение *Foxp3* не сказывается на чувствительности наивных Т-клеток к антигенной стимуляции и её зависимости от ко-стимуляции (22, 26, 33). И, наконец, дефицит *Foxp3* в эффекторных Т-клетках не влияет на их способность к клональной экспансии или продукции цитокинов в ходе иммунного ответа (22,26). Вышеупомянутые факты указывают на то, что именно дефицит Трег является причиной заболевания в случае дефицита *Foxp3* (22, 26, 33, 34).

Рассмотренный ранее анализ нокаутных по *Foxp3* мышей и эксперименты с использованием костномозговых химер демонстрируют, что *Foxp3* вовлечен в дифференцировку Трег и их критически важную функцию контроля иммунного гомеостаза в первые дни после рождения. Для исследования роли *Foxp3* в поддержании иммунологического баланса у взрослых мышей были созданы животные *Foxp3^{DTR}* с интегрированной в локус *Foxp3* кассетой для синтеза рецептора дифтерийного токсина, либо трансгенные мыши *Foxp3-DTR*. В этих линиях Трег несут на поверхности молекулы рецептора дифтерийного токсина человека (DTR) (35,36). Введение этим взрослым здоровым животным дифтерийного токсина для хронического уничтожения Трег приводит к их смерти через 2-3 недели от тяжелого лимфо- и миелопролиферативного заболевания, что доказывает, что в течение жизни опосредованная Трег иммуносупрессия необходима для предотвращения спонтанной аутоиммунной патологии (35). Обнаруженная патология, как кажется на первый взгляд, должна зависеть исключительно от CD4+ Т-клеток, специфичных к аутоантигенам, поскольку одновременное удаление (деплемирование) и CD4+ Т-клеток, и Трег приводит к тому, что лимфо- и миелопролиферативное заболевание в контексте обработки DT не развивается. Однако при этом сохраняется активация дендритных клеток, сопутствующая потере Трег (35). Поэтому встает вопрос о связи описанного аутоиммунного заболевания с комменсальными микроорганизмами, являющимися самым большим источником чужеродных молекул – активаторов клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Исследования мышей линии *Foxp3^{DTR}*,

лишенных микрофлоры (germ free), показало, что Трег и опосредованная ими супрессия огромного разнообразия Т-клеток с широким репертуаром рецепторов не связана с комменсальными микроорганизмами, поскольку абляция у таких животных Трег вызывала неотличимое по тяжести лимфо- и миелопролиферативное заболевание, индуцируемое аналогичной процедурой у мышей с нормальной микробиотой (37). Приведенные наблюдения свидетельствуют, что Трег играют очень важную роль в поддержании иммунного гомеостаза в течение жизни нормальных животных, а также, что они необходимы для ограничения активации Т-клеток в ответ на собственные пептиды в комплексах с белками МНС независимо от присутствия комменсальных микроорганизмов. Далее будут рассмотрены результаты последних достижений в понимании молекулярных механизмов образования и функционирования Foxp3⁺ Трег.

2.4 Дифференцировка Трег в тимусе: сигнал от ТКР и дополнительные сигналы

2.4.1 Определяющая роль сигнала от ТКР

В процессе дифференцировки предшественников Т-клеток в тимусе различия в характеристиках сигналов, передаваемых через ТКР, например, функциональное средство и длительность сигнала, являются центральными детерминантами, определяющими направление дифференцировки. Эти сигналы сообщают будущим CD4 или CD8 Т-клеткам направление, в котором они будут развиваться (созревать) (38,39), а также контролируют дифференцировку более узкоспециализированных популяций Т-лимфоцитов, включающих НКТ клетки, CD8 α и ассоциированные со слизистыми оболочками инвариантные Т-клетки (MAIT). Обсуждаемые характеристики сигнала также влияют на цитокиновый фон в процессе дифференцировки Т-хелперов (40,41). Поэтому логично, что особые требования к сигналу через ТКР критически важны для индукции синтеза Foxp3 и специализации Трег как отдельной линии. Первым наблюдением, указывающим на то, что Трег нуждаются в более сильном сигнале через ТКР, стал анализ их поверхностного фенотипа, характеризующегося повышенным уровнем CD5, CD25 и CTLA-4, молекул, уровень которых возрастает при антигенной стимуляции Т-клеток. CD5 работает как реостат, аттенюируя сигнал от ТКР в регулируемой манере путем рекрутирования тирозинфосфатазы SHP-1 с помощью своего цитоплазматического хвоста (42,43). Понимание того, что сильный сигнал от ТКР способствует принятию решения клетки дифференцироваться в Трег, получено при изучении мышей, дефицитных по CD5 или SHP-1, и с нарушениями на уровне негативной регуляции сигнала от ТКР (44). У этих животных уровень Трег был существенно выше, чем у контрольных (см. рис. 2-3).

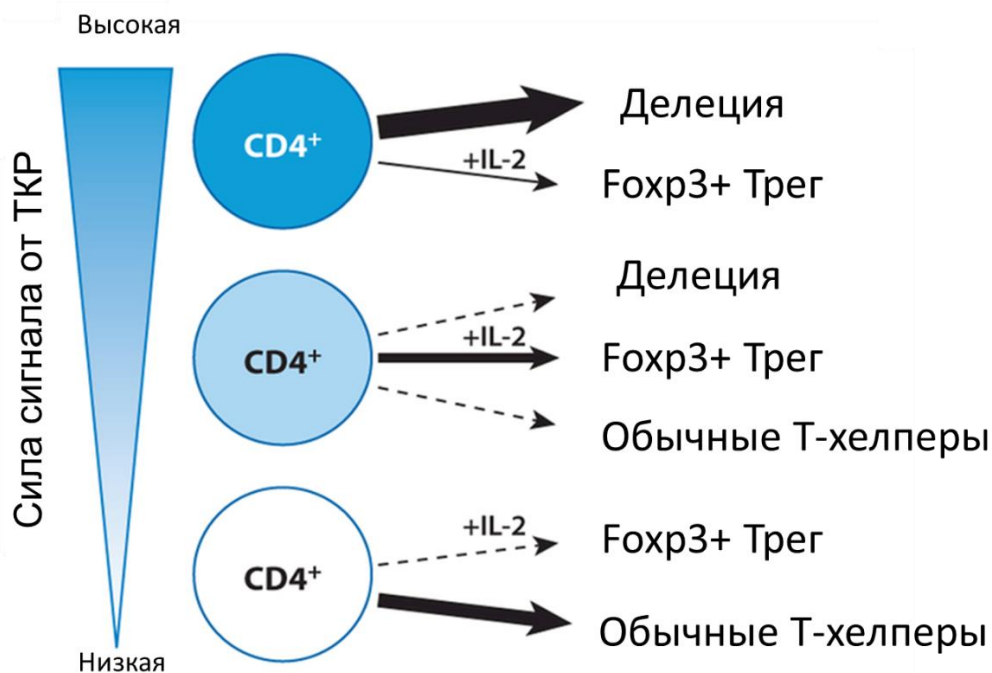


Рисунок 2-3. Инструктивная роль сигнала от ТКР в тимусной дифференцировке Трег, зависимость от силы сигнала (10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623).

Прямое экспериментальное подтверждение критической роли специфичности ТКР для дифференцировки Трег тимусного происхождения (тТрег) было получено неожиданно. Оказалось, что мыши, несущие трансгенный ТКР, специфичный к основному белку миелина (МВР), в отсутствие перегруппировки генов ТКР из-за нокаута рекомбиназы RAG страдают от возникновения очагов воспаления в мозге (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита). Однако популяция Т-клеток с эндогенными ТКР предотвращает развитие заболевания у мышей с нормальной активностью RAG (45,46). Для того, чтобы добиться дифференцировки Трег у мышей с трансгенным ТКР, необходимо обеспечить у них присутствие лиганда, который узнает этот трансгенный ТКР, например, путем их скрещивания с другой, несущей трансгенный лиганд, линией (47-50). В исследованиях клеток с трансгенными ТКР превалирование негативной селекции, сопровождающей образование синтезирующих Foxp3 Трег (47-49), указало на то, что аутореактивные Трег, узнающие собственные пептиды, за счет синтеза Foxp3 получают преимущество лучшего выживания при негативной селекции. В то же время, клетки без Foxp3, получающие такой же по силе сигнал от ТКР, подвержены элиминированию (51). В соответствии с этой идеей, многие молекулы, поддерживающие выживание Т-клеток, синтезируются Трег в Foxp3-зависимой манере.

Значительное число работ доказывают, что сигнал от ТКР является определяющим для индукции синтеза Foxp3 и дифференцировки в направлении Трег. Анализ

последовательностей поликлональных репертуаров ТКР и сравнение выборки Трег с не-Трег из животных с фиксированной трансгенной бета-цепью ТКР продемонстрировали, что последовательности альфа цепей в популяции Трег являются более вариабельными и лишь частично перекрываются с таковыми из не-Трег клеток (52-55). Синтез в трансгенных животных под контролем ретровирусного вектора ТКР из Трег или наивных CD4⁺ Т-клеток с определенной специфичностью к уникальному чужеродному антигену показал, что ТКР из популяции Трег имеют более высокую аутореактивность. Эта способность узнавать собственные антигены проявлялась в мощной экспансии эффекторных Т-клеток, трансфицированных конструкциями с генами ТКР Трег, а также индукции аутоиммунных заболеваний при трансплантации этих клеток иммунодефицитным мышам-реципиентам. Однако эти же патогенные Т-клетки с ТКР от Трег слабо отвечают *in vitro* на сингенные антиген-презентирующие клетки (АПК), хотя способны на мощный ответ в присутствии чужеродного лиганда, к которому специфичны ТКР (52). Это свидетельствует о том, что диапазон аффинностей «обычных» ТКР, связывающих антиген при типичном иммунном ответе, превосходит диапазон аффинностей ТКР Трег к собственным антигенам. Таким образом, селекция Трег, вероятно, зависит от ТКР с аффинностью и авидностью к комплексам собственных пептидов-МНС, которые находятся в промежутке между теми, что необходимы для позитивной селекции обычных Т-клеток и более сильными сигналами, которые вызывают негативную селекцию (и элиминирование) аутореактивных Т-клеток в нормальных условиях (Рис. 2-3). Данную гипотезу подтверждает и тот факт, что частичное нарушение негативной селекции вследствие снижения количества молекул МНС типа II в mTEC (клетках эпителия тимуса) сопровождается повышением частоты Трег (56). Подобным же образом усиление негативной селекции, вызванное отсутствием рецептора TGF- β (TGF- β R) на стадии дифференцировки тимоцитов CD4CD8 DP (double positive) или SP (single positive), сопровождается снижением образования Foxp3⁺ клеток у новорожденных мышей (57). Экспрессия гена Foxp3 не влияет на чувствительность к негативной селекции тимоцитов под действием высокоаффинных лигандов ТКР (33,34). Более того, ТКР, обнаруживаемые в Трег из мышей с нормальным уровнем Foxp3, можно найти в активированных Т-клетках из Foxp3-дефицитных животных. Этот факт согласуется с тем, что эти активированные клетки избегают негативной селекции, несмотря на отсутствие продукции Foxp3 (33). Дополнительные доказательства роли сигнализации через ТКР получены в следующих экспериментах с (а) мышами с репортерным Foxp3 null (-/-) аллелем (кодирующие Foxp3 экзоны в локусе заменены на кДНК GFP, Foxp3^{GFPKO}) (23), и (б) мышами, которые синтезируют укороченный вариант белка Foxp3. В обоих случаях

тимоциты, в которых были транскрипционно активны нефункциональные аллели Foxp3, можно было легко обнаружить по флуоресценции. Эти клетки, которые, по сути, эквивалентны предшественникам Трег и несут аутореактивные рецепторы, не подвергаются элиминированию, а, напротив, при созревании подвержены активации и вызывают патологию в Foxp3-дефицитных мышцах (очень похожую на патологию у животных с полным нокаутом Foxp3).

Исследования трансгенных мышей, у которых Т-клетки несут ТКР, выделенные из Трег, показали, что для дифференцировки Трег в тимусе характерна исключительная инструктирующая функция сигнала от ТКР. Эксперименты, проведенные в лабораториях Hsieh и Lafaille, демонстрируют, что, когда число клеток-предшественников очень мало, синтез отдельных, соответствующих ТКР Трег, трансгенных ТКР может обеспечивать эффективную селекцию Foxp3+ тимоцитов (58, 59). Эти данные подразумевают, что сильная конкуренция внутри клонов предшественников лимитирует дифференцировку многочисленных Трег с идентичной специфичностью, поэтому способствует образованию широкого репертуара ТКР Трег в тимусе.

Помимо стимуляции ТКР усилить индукцию гена Foxp3 позволяют и генетические манипуляции, направленные на изменение активности других рецепторов/сигнальных каскадов, такие как конститутивная активация NF-κB, потеря гомеостатического метилирования ДНК за счет выключения ДНК-метилтрансфераз, дефицит mTOR или рецептора сфингозин-1 фосфата 1 типа (S1P1), а также снижение активности PI3K (60-65). Эти наблюдения подтверждают идею о том, что определенная сила сигнала от ТКР и правильное согласование этого сигнала с другими внеклеточными и внутриклеточными процессами направляет и поддерживает дифференцировку Трег.

2.4.2 Сигналы от ко-стимулирующих молекул

Наряду с ТКР ко-стимулирующий сигнал от CD28 также играет очень важную роль в тимусной дифференцировке Трег, на что указывает существенное снижение частоты Трег у мышей, дефицитных по CD28 или CD80-CD86 (66, 67). Более того, связывающий Ick домен цитоплазматической части CD28 необходим для индукции синтеза Foxp3 (67), что говорит о важности согласования сигналов от ТКР и CD28 при дифференцировке Трег. Роль сигналов от ТКР и CD28 при дифференцировке Трег подтверждает и тот факт, что ряд факторов транскрипции, активируемых сигналом от ТКР/CD28, в частности, NFAT, NF-κB и AP-1, участвует в транскрипционном контроле дифференцировки Трег (Рис.2-4).

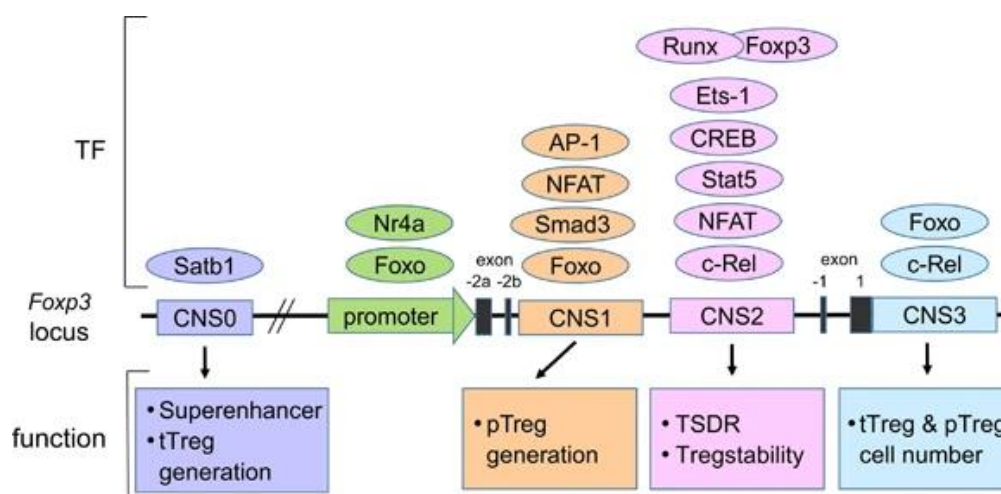
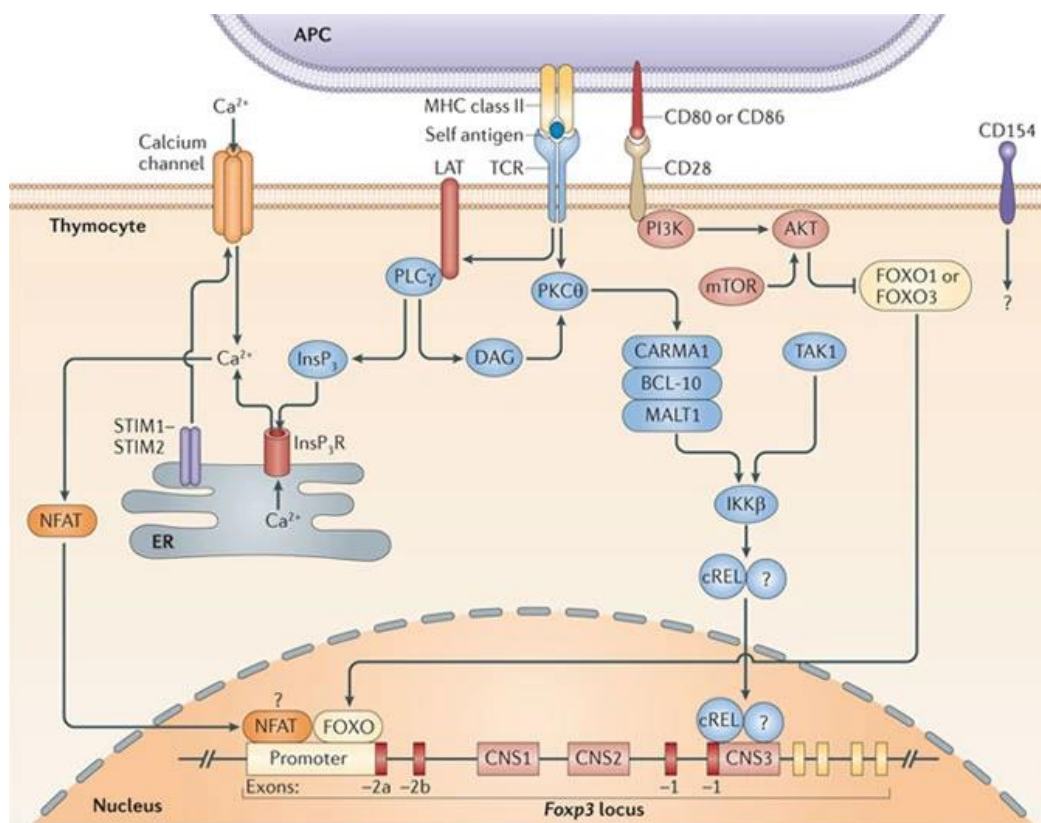


Рисунок 2-4. Структура 5'-концевой части локуса *Foxp3* с маркированными промотором и консервативными регуляторными участками (CNSs – conserved non-coding sequences). Черными прямоугольниками отмечены экзоны и показана их нумерация. Сверху в овалах – факторы транскрипции и транскрипционные регуляторы, связывающие соответствующие CNS. Внизу в прямоугольниках представлены функции/свойства Трег, на которые влияют соответствующие CNS и узнающие их факторы (<https://doi.org/10.1038/emm.2017.313>).

В частности, NFAT и AP-1 связывают промотор *Foxp3* (68). *Foxo1* и *Foxo3* тоже связывают промотор *Foxp3* и расположенный в интроне регуляторный элемент локуса *Foxp3*, названный *Foxp3*-CNS2 (conserved non-coding sequence 2) (69). Кроме того, CREB-ATF1 связывает *Foxp3*-CNS2, а комбинация CREB-ATF1 и *Foxo1*, синтезируемых с плазмидных векторов, усиливает экспрессию люциферазного репортера под контролем промотора *Foxp3* (69,70). Комбинированный нокаут *Foxo1* и *Foxo3* сильно снижает дифференцировку Трег в тимусе. Направленное выключение или сопровождающиеся потерей функции мутации в генах, белковые продукты которых участвуют в ТКР-зависимой активации NF- κ B, таких как PKC θ , CARMA1, Bcl10 и ИкВ киназа 2 (ИКК2), приводят к дефектам в образовании Трег (71-74) (Рис. 2-5).



Nature Reviews | Immunology

Рисунок 2-5. Молекулярные каскады, связывающие сигнал от ТКР с индукцией гена FOXP3 (<https://doi.org/10.1038/nri3155>).

2.4.3 Сигналы выживания: STAT5 и NF-κB

Следует отметить наблюдение Alegre и коллег (75), которые обнаружили, что сигналы выживания, обеспечиваемые за счет повышенной продукции Vcl-2 или конститутивно активной формы белка STAT5 (STAT5-CA) в предшественниках Т-клеток, нокаутных по CARMA-1, не защищают от дефекта в тимусной индукции Foxp3 и дифференцировке Трег (Рис. 2-б). Любопытно, что дефицитные по CARMA-1 периферические Т-клетки способны индуцировать синтез Foxp3, в отличие от CARMA-1 дефицитных тимоцитов (74). Наблюдаемая разница в требованиях к активности CARMA-1 может быть следствием необходимости более сильных сигналов от ТКР для дифференцировки индуцированных Трег (иТрег), что может приводить к качественным и количественным различиям в эффекторных механизмах, находящихся под контролем Foxp3, и вызывать апоптоз в тимусных предшественниках. Эти данные дополнительно подтверждают инструктивную роль сигнализации через ТКР в дифференцировке Трег.

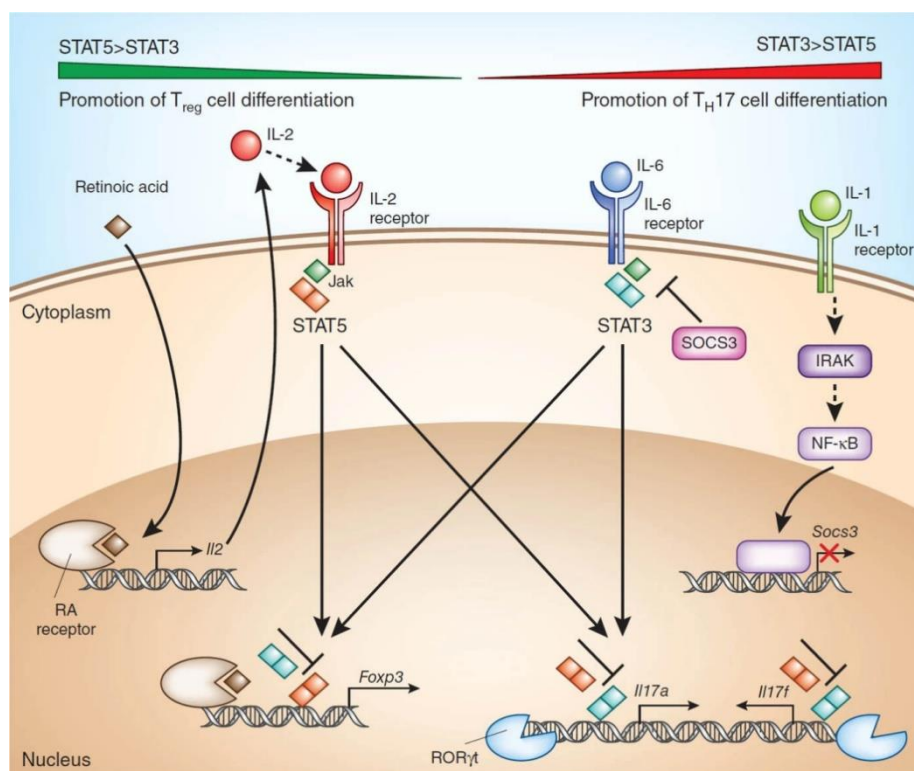


Рисунок 2-6. Роль факторов транскрипции STAT-5 и STAT-3 в балансе дифференцировки Treg/Th17 (<https://doi.org/10.1038/ni.3105>).

Хотя представленные результаты подчеркивают важность сигнала, опосредованного NF-κB в тTreg, какие именно белки семейства NF-κB необходимы для дифференцировки Treg, а также подконтрольные им гены-мишени всё ещё предстоит идентифицировать. Результаты одной из работ демонстрируют, что частота Foxp3-позитивных тимоцитов снижена у мышей с мутацией в гене, кодирующем p105, что вызывает неспособность ИКК фосфорилировать расщепленный белок p50 (76). Помимо этого, показано, что белок семейства NF-κB c-Rel имеет важную функцию, необходимую для индукции Foxp3 (60, 77-80). c-Rel связывает другой CNS, Foxp3-CNS3, в интроне гена Foxp3 (Рис. 2-4). Для Foxp3-CNS3 характерно метилирование гистона 3 в положении K4 (H3K4me1) в предшественниках Treg, что делает его доступным, в смысле готовности к транскрипции. Генетические исследования показали, что присутствие CNS3 значительно повышает вероятность индукции транскрипции гена Foxp3. Дополнительным доказательством связи CNS3 и c-Rel является сходство дефектов при индукции Foxp3 в тимоцитах, нокаутных по CNS3 или по c-Rel, обнаруженных в костномозговых химерах WT/CNS3- и WT/c-Rel-/- (80). Хотя молекулярный механизм, ответственный за индукцию Foxp3 при связывании c-Rel с CNS3 пока не охарактеризован, есть вероятность, что связывание c-Rel с CNS3 приводит к ремоделированию хроматина, подобно тому, как это происходит при связывании c-Rel с

элементом ответа на CD28 в локусе гена IL-2 (81). Другое возможное объяснение заключается в том, что связывание c-Rel и CNS3 инициирует образование энхансерного комплекса c-Rel на промоторе Foxp3 (78). Согласно последним данным, нокаут c-Rel негативно влияет на индукцию гена Foxp3 в тимусе, в то время как присутствие p65 необходимо для поддержания синтеза Foxp3 и супрессорной активности зрелых Трег на периферии (83).

Искусственное увеличение активности NF-κB, например, путем введения конститутивно активного трансгена IKKβ в Т-клетки, приводит к увеличению числа Трег в тимусе. Данный факт подтверждает гипотезу о том, что даже небольшие изменения в процессах, связанных с сигнальным каскадом, инициируемым ТКР и ко-стимуляторными сигналами, определяет эффективность индукции Foxp3 (60). Интересно, что в этой работе показано также связывание c-Rel с CNS2, регуляторным элементом, необходимым для поддержания и передачи при делении клеток способности синтезировать Foxp3, который не участвует в собственно индукции гена Foxp3 (60). Это указывает на роль c-Rel также и в поддержании стабильной транскрипции Foxp3. Подводя итог, следует сказать, что согласно существующим представлениям, элемент-«пионер» CNS3, связывая c-Rel, регулирует частоту индукции гена Foxp3 в популяции клеток-предшественников, действуя как классический энхансер (82). К сожалению, пока остаются открытыми вопросы о том, каков механизм поддержания CNS3 в открытом состоянии хроматина в процессе дифференцировки, и как меняется активность этого элемента в ответ на разные внешние стимулы.

2.5 Цитокины и их рецепторы в тимусной дифференцировке Трег

2.5.1 Цитокины с общей гамма цепью, интерлейкин-2 (IL-2)

Репертуары последовательностей ТКР тимусных предшественников Трег и обычных Т-хелперов частично перекрываются (33), следовательно, одна и та же последовательность ТКР с повышенной аутореактивностью может присутствовать и на Трег, и на обычной Т-клетке. Данный факт доказывает, что сигнала от ТКР самого по себе недостаточно для спецификации Т-клетки и индукции синтеза Foxp3. Поэтому лишь небольшая доля тимоцитов в трансгенных по ТКР и дефицитных по рекомбиназе RAG мышах дифференцируется в Трег, остальные предшественники становятся не-Трег клетками в состоянии анергии (48, 50). Аргументами в пользу необходимости дополнительных сигналов для дифференцировки Трег являются данные, показывающие, что у новорожденных мышах образование Трег происходит с задержкой, тогда как их ранние

предшественники (CD25+Foxp3-) присутствуют в тимусе уже в момент рождения (84-86). Эта ранняя «волна» тимоцитов обогащена клетками с аутореактивными ТКР, поскольку у них нет терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (87), а замедленное образование Трег связано именно с недостатком дополнительных сигналов, участвующих в дифференцировке Трег.

Добавочные сигналы продуктивной дифференцировки Трег обеспечивают IL-2 и, в меньшей степени, два других цитокина, IL-7 и IL-15, которые передают сигнал через рецепторы с общей гамма цепью (common gamma chain – γ c). Мыши с нокаутом генов IL-2 или IL-2R α характеризуются 50% снижением пропорции и численности тимоцитов, синтезирующих Foxp3. Отсутствие только IL-15 или только IL-7 не влияет на эффективность образования Трег. Одновременный же нокаут IL-2, IL-7 и IL-15 приводит к полной потере Foxp3+ тимоцитов и Т-клеток с фенотипом Foxp3+ на периферии, такой же дефект выявлен у мышей с нокаутом γ c (88–91).

В соответствии с тем, что предшественники тТрег в тимусе новорожденных мышей имеют фенотип CD25+Foxp3-, а также с учетом роли IL-2 и сильного сигнала через ТКР для дифференцировки тТрег, была предложена модель дифференцировки тТрег в два этапа (85, 86). Согласно этой модели, сигнал ТКР от связывания лиганда с высокой авидностью приводит к увеличению уровня CD25 на поверхности предшественников, а следовательно, к увеличению силы ответа на IL-2, который, в свою очередь, увеличивает экспрессию гена Foxp3 (85,86). Вероятный фактор транскрипции, который напрямую регулирует транскрипцию Foxp3 – это STAT5 (Рис. 2-6), активность которого зависит от сигнала от IL-2 и других цитокинов, связывающих рецепторы с γ c (85). И действительно, STAT5 связывает промотор Foxp3, а также консервативный элемент CNS2 в гене Foxp3 (Рис.2-4). Кондиционный нокаут Stat5 на стадии «двойных позитивных» тимоцитов приводит к сильному уменьшению популяции CD4 SP тимоцитов, синтезирующих Foxp3, а то небольшое число тимоцитов, которые все же синтезируют Foxp3, развивается из клеток, в которых не произошла делеция гена STAT5 (92, 93). В работах, посвященных, напротив, усилению функции STAT5, например, путем постоянной продукции в клетках конститутивно активной формы этого белка, выявлена экспансия Трег и восстановление числа Трег в отсутствие IL-2 (85, 94). Несмотря на обилие данных, точный механизм, обеспечивающий индукцию гена Foxp3 в предшественниках Трег в ответ на сигнал от IL-2, до сих пор не установлен.

2.5.2 Фактор роста опухоли TGF- β

Помимо ТКР и сигнала от рецепторов с общей γ с, для первой (после рождения) волны дифференцировки тТрег необходим сигнал от TGF- β . Роль рецептора TGF- β (TGF- β R) в дифференцировке периферической популяции индуцированных Трег из наивных CD4

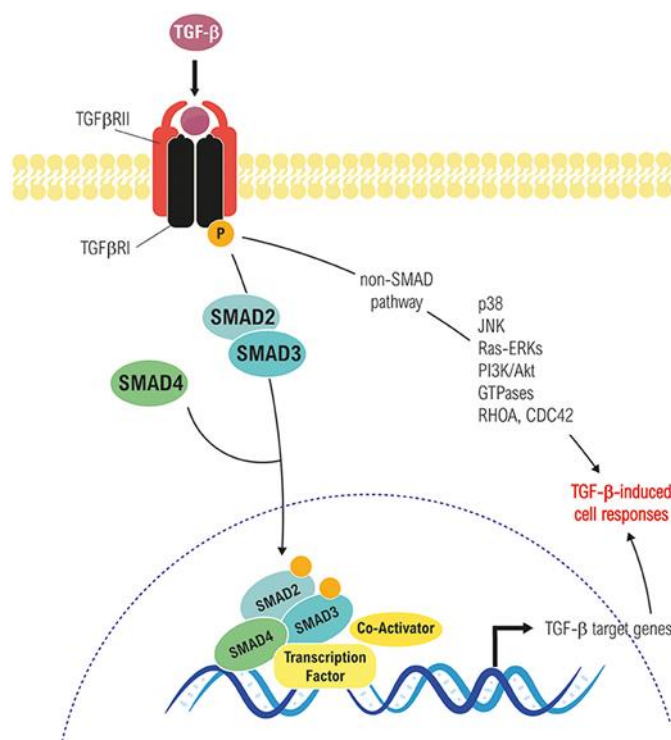


Рисунок 2-7. Канонический (Smad-зависимый) и неканонический пути передачи сигнала от TGF- β в ядро (<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00357>).

клеток хорошо доказана, предполагается, что зависящая от TGF- β R индукция Foxp3 может быть нужна только для созревания иТрег. Установлено, что делеция одной из субъединиц TGF- β R в тимоцитах на стадии CD4CD8 DP приводит к существенному, но непродолжительному снижению образования Foxp3⁺ Трег в течение первой недели жизни. Позднее популяция Foxp3⁺ Трег постепенно восстанавливается до нормального уровня, наблюдаемого у контрольных мышей (96). В ранних работах не было обнаружено снижения количества тТрег у семидневных мышей, дефицитных по TGF- β 1, либо мышей с выключенным на стадии DP TGF- β RII (97–999). На основании более детального исследования популяции тТрег новорожденных мышат, а также экспериментов с репортерными конструкциями на основе гена люциферазы, был предложен следующий механизм: связывание TGF- β с рецептором активирует Smad (Рис. 2-7), который через взаимодействие в тимоцитах с консервативным элементом ответа на Smad-NFAT (Foxp3-CNS1) индуцирует экспрессию гена Foxp3, необходимую для образования тТрег (Рис. 2-4) (100).

Такой механизм напоминает механизм периферической индукции образования Foxp3⁺ Трег при активации наивных Т-клеток, который будет обсужден позже. Восстановление количества тТрег с возрастом у мышей с дефицитом TGF- β или нокаутом CNS1 можно объяснить возрастным увеличением уровня IL-2 (96). Существуют альтернативные объяснения влияния TGF- β на число тТрег. Возможно, что сигнал от TGF- β способствует выживанию немногочисленных тТрег или их предшественников, когда относительно небольшая популяция тимусных предшественников образуется в «незаполненном» неонатальном тимусе (в условиях лимфопении). Недавно Li и соавторы (57) сообщили, что TGF- β необходим для защиты от Vim-зависимого апоптоза тимоцитов, узнающих собственные пептиды, что увеличивает размеры пула предшественников Трег. Также установлено, что Foxp3-CNS1 не важен для дифференцировки тТрег, но совершенно необходим для образования иТрег на периферии (Рис. 2-4) (80). Эти результаты в совокупности показывают, что в тимусе TGF- β поддерживает выживание предшественников Трег, но не нужен для индукции транскрипции Foxp3 в тимоцитах за счет связывания Smad с регуляторным участком Foxp3-CNS1.

2.6 Дифференцировка Трег на периферии: требования к качеству сигнала от ТКР

Несмотря на доказанную роль Foxp3⁺ Трег в контроле аутоиммунитета и связанных с ним лимфопролиферативных заболеваний, по-прежнему без ответа остается вопрос о том, насколько сильно перекрываются функции тимусных Трег и Трег, образующихся на периферии. Необходимость присутствия в гене Foxp3 интактного элемента CNS1 для индукции гена Foxp3 на периферии, но не в тимусе, указывает на то, что тТрег и иТрег, имеют разные функции.

Дифференцировка тТрег в тимусе зависит от высокоаффинных взаимодействий ТКР с комплексами собственных пептидов-МНС, в то время как дифференцировка иТрег на периферии, вероятно, зависит от не-своих (чужеродных) антигенов, таких как аллергены, антигены пищи, а также продукты жизнедеятельности комменсальных микробов (33, 48, 50, 101–103). Требования к различному по природе сигналу от ТКР и выбор лиганда, способствующего образованию иТрег, были охарактеризованы путем анализа репертуара ТКР Foxp3⁺ Т-клеток, полученных путем переноса CD4⁺Foxp3⁻ Т-клеток мышам с лимфопенией, и последующего сравнения с выборкой репертура ТКР клеток, которые при трансплантации не приобрели способность синтезировать Foxp3 (104). Последовательности ТКР двух выборок различаются и мало перекрываются с последовательностями ТКР Foxp3⁺ и Foxp3⁻ Т-клеток, выделенных из контрольных здоровых животных (52, 104).

Прямая демонстрация отличной специфичности иТрег получена путем сравнения и обнаружения различий репертуаров ТКР иТрег из кишечника и репертуаров Трег из других тканей и органов. Кроме того, было установлено, что часть этих ТКР специфична к антигенам, происходящим из бактерий-комменсалов (103). ТКР иТрег, вероятно, имеют высокую аффинность к лигандам, что подтверждает обнаружение редких высокоаффинных антигенных пептидов, которые наиболее эффективно индуцируют Foxp3 при стимуляции наивных CD4⁺ Т-клеток на периферии (Рис.2-2). Менее эффективно образование Трег происходит при стимуляции ТКР пептидами с меньшей аффинностью (105). Кроме этого, индукция Foxp3 происходит при стимуляции ТКР в толеризирующих условиях в присутствии не-деплетирующих блокирующих CD4 антител (106). В соответствии с идеей о необходимости субоптимальной активации Т-клеток для индукции Foxp3, отсутствие CTLA-4 не сказывается на дифференцировке тТрег, но негативно влияет на опосредованную TGF- β индукцию Foxp3 *in vitro* (107). В это же время, перекрестная сшивка CD28, вызванная связыванием антител, имеет противоположный эффект, то есть CD28 участвует в тимусной дифференцировке Трег (108, 109). В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что высокоаффинное связывание ТКР с лигандами вместе с субоптимальным сигналом от ко-стимуляторных молекул (высокий уровень сигнала от CTLA-4 и низкий от CD28) способствует индукции Foxp3 и образованию иТрег.

Трансгенные по ТКР Т-клетки, которые включают синтез Foxp3 после орального введения антигенного пептида (антигена), могут усугублять индуцированное антигеном воспаление дыхательных путей (110–112). В соответствии с этим фактом, хроническое системное введение низких доз чужеродного антигена вызывает образование антиген-специфических иТрег и в популяции Т-клеток с заданной трансгенным ТКР специфичностью, и в поликлональной популяции (102, 113, 114). Специфичные к мимотопу инсулина Трег, образующиеся в результате такой иммунизации, полностью защищают мышей линии NOD (nonobese diabetic) от спонтанного аутоиммунного диабета (115). Таким образом, репертуар ТКР иТрег, образующихся в условиях хронической гомеостатической невоспалительной стимуляции антигенами, производными комменсальных микробов или присутствующими в пище, изменяется. Это уникальное свойство репертуара ТКР иТрег свидетельствует об их особой функции и подразумевает, что их антигенная специфичность является главной детерминантой их функциональной ниши.

2.7 Роль TGF- β и IL-2 в дифференцировке Трег на периферии

Помимо сильного сигнала от ТКР, согласно результатам работ *in vitro* и *in vivo*, индукция экспрессии гена Foxp3 в периферических наивных CD4⁺ Т-клетках может быть увеличена под действием высоких доз TGF- β (102, 116-118). По-видимому, сигнал от TGF- β R требуется для индукции синтеза Foxp3 при любых способах периферической индукции наивных CD4⁺ Т-клеток, не считая популяции CD25⁺Foxp3⁻ CD4⁺, которая уже была коммитирована в направлении синтеза Foxp3 в тимусе, но не получила достаточно сильного сигнала от IL-2 (102, 116–118). Эти клетки, также как и их тимусные «сородичи», включают синтез Foxp3 при стимуляции IL-2 в отсутствие любых других (включая TGF- β) сигналов и повторной стимуляции ТКР (119). IL-2 также необходим для TGF- β -опосредованной индукции Foxp3 в периферических Т-клетках *in vitro* (120,121). Помимо потенциальной STAT5-зависимой активации локуса Foxp3 и повышения выживаемости клеток и скорости деления в присутствии высоких доз TGF- β , IL-2 препятствует дифференцировке активированных CD4⁺ Т-клеток в Т-хелперы Th17 (122). Преимущественная дифференцировка последних происходит, когда стимуляция ТКР наивных CD4⁺ Т-клеток сопровождается одновременной активацией TGF- β R и IL-6R (123). Другой механизм регуляции дифференцировки Трег в присутствии TGF- β заключается в репрессии Gfi-1, репрессора транскрипции, который одновременно ингибирует образование и Трег, и Th17 лимфоцитов при активации периферических Т-клеток в условиях перmissive для дифференцировки Th2-лимфоцитов (124).

Индукция Foxp3 путем хронической стимуляции антигеном *in vivo* также требует сигнала через TGF- β R, но обратно коррелирует с пролиферацией клеток (102). Объяснение этого феномена основано на результатах работы, показывающей, что происходит кооперация между каскадом TGF- β и сигналом от ТКР, которые приводят к активации Foxp3 частично за счет ингибирования связанного с клеточным циклом рекрутирования гомеостатической ДНК-метилтрансферазы-1 (Dnmt1) в локус Foxp3, которое выключает транскрипцию Foxp3 (62). Таким образом, цитостатические эффекты ингибирующих сигналов, вызванных CTLA-4 или TGF- β R, могут быть отчасти ответственны за усиление индукции Foxp3, поскольку они переводят ген в активное состояние за счет комбинации необходимых сигнальных каскадов (ТКР, IL-2, TGF- β R и др.) и замедления пролиферации (Рис.2-4). Иными словами, сигнал от TGF- β способствует дифференцировке Трег за счет индукции прямых и непрямых механизмов. Первый требует связывания Smad3 и NFAT с

Foxp3-CNS1, второй препятствует рекрутированию Dnmt1, третий заключается в поддержании выживания тТрег или их предшественников цитокином TGF- β .

Maizels и коллеги (125) с помощью очень убедительного эксперимента недавно доказали ключевую роль TGF- β R в дифференцировке иТрег, а также возможную функцию этих клеток в контроле воспаления слизистых оболочек. Оказалось, что паразитический червь *Heligmosomoides polygyrus* выделяет аналог TGF- β , который индуцирует Foxp3 и дифференцировку иТрег в TGF- β R зависимой, но TGF- β -независимой манере (126). Таким образом, в ходе эволюции некоторые черви научились использовать механизм TGF- β R-зависимой индукции иТрег для индукции иммунологической толерантности в слизистой оболочке. Вероятно, эта уловка позволяет добиться хронической инфекции желудочно-кишечного тракта *H. polygyrus*.

2.8 Дифференцировка Трег на периферии и активация Akt

Изучение вклада активации протеинкиназы Akt в индукцию гена Foxp3 расширило представления о том, какие сигналы необходимы для дифференцировки тимусных и периферических Трег. Блокада сигнала от PI3K с помощью ингибиторов PI3K-mTOR на ранних этапах активации (через 48 часов после начала стимуляции) приводит к сильной индукции транскрипции Foxp3 (126), а продолжительная активация Akt нарушает стабильную индукцию Foxp3 в периферических Foxp3-CD4+ Т-клетках (Рис. 2-8) (127). Сходная закономерность, которая наблюдается при изменении активности Akt в культуре органа фетального тимуса, указывает, что индукция тТрег похожа на индукцию иТрег (127). Существуют данные о том, что TORC2, который фосфорилирует Ser473, тем самым активируя Akt, репрессирует ген Foxp3. Также дефицит TORC2 усиливает индукцию гена Foxp3 в нормальных условиях активации Т-клеток (61). Помимо индукции пути Akt-mTOR через PI3K, за активацию которой отвечают сигнальные пути от ТКР и IL-2R, активация S1P1 в сигнальном каскаде Akt-mTOR также ингибирует индукцию Foxp3 и дифференцировку Трег (63). Результаты двух работ связывают эти наблюдения с прямой регуляцией транскрипции локуса Foxp3, демонстрируя, что Foxo1 и Foxo3a, которые инактивируют Akt, связывают промотор Foxp3 и CNS2, запуская экспрессию Foxp3 (Рис.2-4 и 2-8) (69, 128, 129). Однако относительный вклад транскрипционных факторов семейства Foxo в выживание и функциональный потенциал, по сравнению с прямой активацией локуса Foxp3 при дифференцировке Трег, пока неясен. Более того, сложный сигнальный каскад PI3K-Akt-mTOR включает в себя и пересекается с множеством факторов, которые тоже могут влиять на дифференцировку Трег. Специфические условия, необходимые для

оптимальной индукции транскрипции Foxp3 (Smads, NFAT, CREB, NF-κB, AP-1, Foxo, RAR и STAT5) и ограничивающих активность сигнальных путей, ингибирующих Foxp3 (например, Akt-mTOR), пока недостаточно полно охарактеризованы. Можно предположить, что незначительные количественные и временные изменения в стимуляции ТКР, в сигналах от ко-стимуляторных молекул и рецепторов цитокинов определяют вероятность индукции Foxp3, а не работают исключительно как строгие команды включения или выключения.

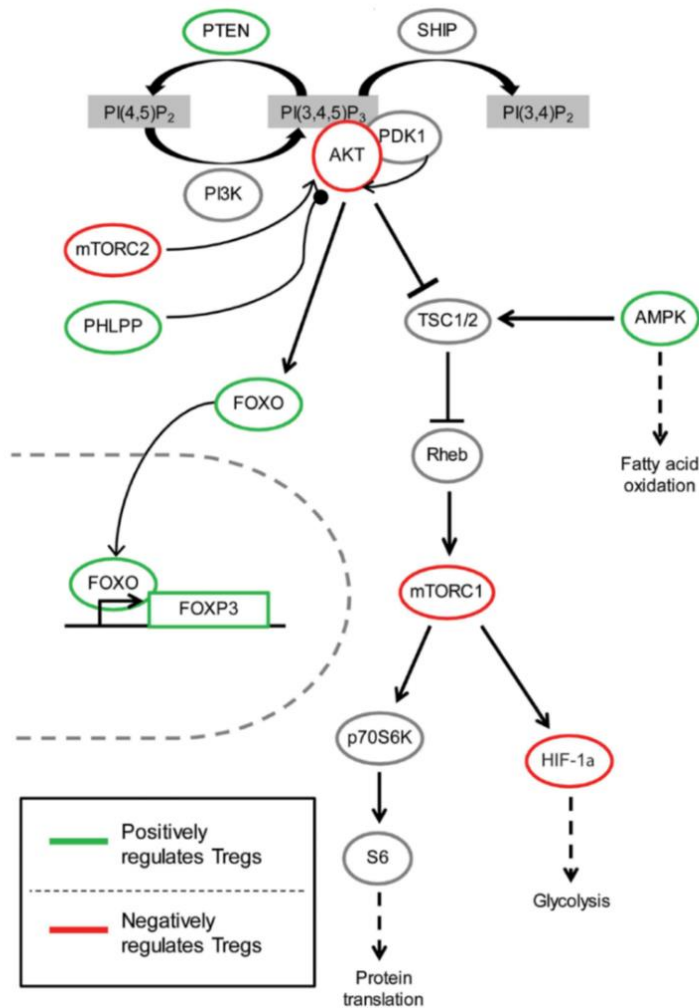


Рисунок 2-8. Передача сигнала через PI3K/Akt и ее влияние на Трег. Показаны компоненты соответствующих сигнальных каскадов и установленные между ними связи, которые идентифицированы именно в Трег. Зеленым показаны факторы, позитивно влияющие на дифференцировку и выживание Трег, красными – негативно. Стрелки означают активирующее фосфорилирование, линии с перпендикулярными отрезками на конце – ингибирующее фосфорилирование, линии с кружком на конце – дефосфорилирование, стрелки с пунктиром – указывают на затрагиваемую функцию (DOI: 10.3389/fimmu.2012.00245).

2.9 Органы и ткани, в которых происходит периферическая конверсия Т-хелперов в Трег

Особые требования к силе и специфичности сигнала от ТКР, например, комбинации сильного сигнала от ТКР и субоптимальных сигналов ко-стимуляции в присутствии TGF- β для дифференцировки иТрег не означают, что любой продолжительный (хронический) контакт периферической Т-клетки с подходящим собственным или чужеродным антигеном приведет к образованию иТрег. В самом деле, подавляющее большинство периферических Трег молодых животных созревает в тимусе, о чем свидетельствует значительное перекрытие репертуаров ТКР Foxp3⁺ клеток из тимуса и периферии, а также тимусных и периферических Foxp3-CD4⁺ Т-клеток, соответственно, но не репертуаров Foxp3⁺ и Foxp3⁻ популяций (33). Можно добавить, что у трансгенных мышей ТКРabBDC2.5 и тимусные, и периферические Foxp3⁺CD4⁺ Т-клетки несут очень похожие репертуары эндогенных альфа цепей ТКР, которые используют как уникальные теги для индивидуальных клонов Т-клеток. Эффекторные Т-клетки, которые несут ТКР BDC2.5, специфичный к хромогранину А, вызывают агрессивный диабет в отсутствие Трег. Для того, чтобы в трансгенных по ТКР BDC2.5 мышам образовывались Foxp3⁺ Т-клетки, необходима перегруппировка эндогенных альфа цепей ТКР. Анализ используемых альфа цепей ТКР выявил, что тимусные и периферические Foxp3⁻ Т-клетки (не-Трег) несут ТКР, отличные от таковых на поверхности Foxp3⁺ Трег (130). Интересно, что клоны экспрессирующих ТКР BDC2.5 Трег и клоны не-Трег в поджелудочной железе и панкреатических лимфатических узлах (подверженные хронической стимуляции собственным антигеном) отличались друг от друга, а использование эндогенных альфа цепей ТКР свидетельствует о тимусном происхождении клеток (130).

Полученные результаты доказывают, что большинство Т-клеток на периферии имеют тимусное происхождение, а также, что дифференцировка иТрег требует выполнения специальных условий, которые не ограничиваются хронической стимуляцией ТКР BDC2.5 антигеном, к которому они специфичны.

Обсуждаемые до этого данные показывают, что зависимость от ТКР продолжительная экспрессия Foxp3 на высоком уровне в иТрег зависит от особого типа сигнала от ТКР, кинетики клеточной пролиферации и совокупности дополнительных сигналов, например от IL-2 или TGF- β . Эти требования подразумевают, что дифференцировка иТрег должна осуществляться в специализированных местах или тканях (Рис. 2-9). Подходящие факторы собраны вместе в толще слизистых оболочек, которые являются важным местом контакта

с внешней средой, что позволяет обеспечивать постоянную стимуляцию антигенами комменсальных микроорганизмов и поступающими с пищей и из других внешних источников антигенами. Ассоциированные с желудочно-кишечным трактом лимфоидные ткани (GALT) или Пейеровы бляшки являются уникальным местом, в котором образование и Трег происходит очень эффективно. Способность этих тканей поддерживать дифференцировку и Трег отчасти обусловлено присутствием CD103⁺ дендритных клеток, находящихся в GALT или дренирующих брыжеечных лимфатических узлах, которые собирают антигены кишечника. Сочетание этих дендритных клеток и специализированного микроокружения может индуцировать в нормальных условиях синтез Foxp3 в периферических наивных CD4⁺ Т-клетках за счет презентации антигена в присутствии

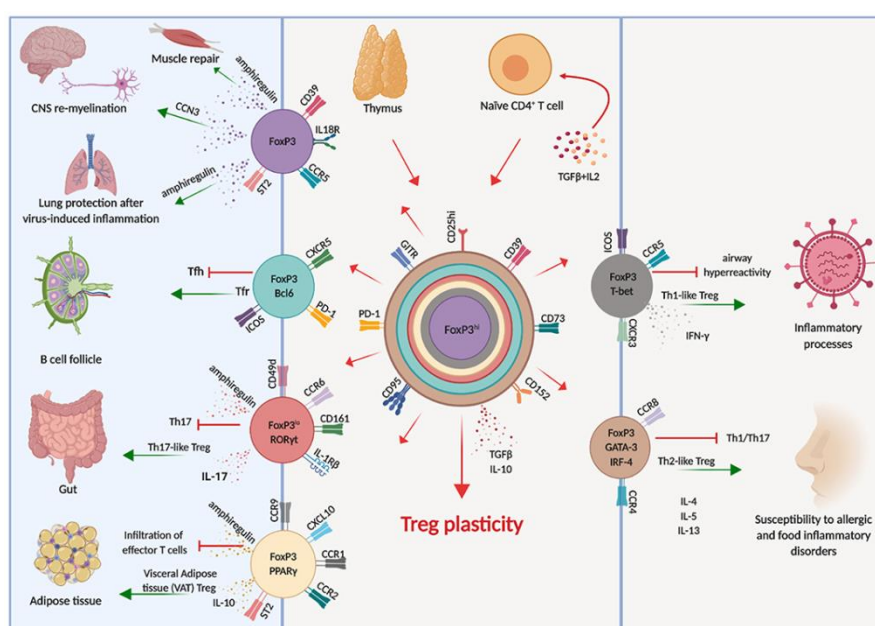


Рисунок 2-9. Периферическая пластичность и дифференцировка Трег в различных органах и тканях. Приведены основные факторы, связанные с активацией и супрессией, а также ключевые факторы, определяющие локализацию и фенотипическую адаптацию разных подтипов Трег (из <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02947>).

TGF- β и ретиноевой кислоты (109, 131–133). Если TGF- β действует напрямую через промотор Foxp3, механизм, за счет которого ретиноевая кислота индуцирует Foxp3, возможно, связан со снижением продукции IFN- γ , IL-4 и IL-21 окружающими CD44^{hi} CD4⁺ эффекторными Т-клетками памяти (134). Ретиноевая кислота также может непосредственно влиять на индукцию дифференцировки и Трег (135, 136), разобраться в том, чей вклад больше, внеклеточных или внутриклеточных механизмов *in vivo* крайне сложно. RAR связывает CNS1 (Рис. 2-4) и может активировать транскрипцию Foxp3 (137). Следует отметить, что хотя ретиноевая кислота усиливает индукцию Foxp3, она ингибирует

экспрессию гена IL-10, что говорит о различиях в условиях, необходимых для дифференцировки iTрег или секреторирующих IL-10 Tr1 клеток. Это косвенно подтверждает, что разные популяции индуцированных регуляторных клеток могут в действительности представлять разные линии (138).

Таким образом, GALT и брызжеечные лимфатические узлы богаты ретиноевой кислотой и поддерживают дифференцировку Трег (индукцию Foxp3) в ответ на хроническое присутствие антигена в толерогенных условиях (102, 110, 113, 139, 140). Доказательства образования в кишечнике особой популяции iTрег получены в работах по изучению репертуаров ТКР Т-клеток из брызжеечных узлов и толстого кишечника и их сравнению с репертуарами ТКР Трег, выделенных из других лимфоидных органов (103, 104). Вероятно, различия репертуаров ТКР продиктованы повышенной эффективностью образования iTрег в ответ на антигены комменсальной микрофлоры, пищевые и другие внешние антигены. Так, число Foxp3+Трег снижено в кишечнике мышей без микрофлоры, а колонизация кишечника этих мышей отдельными представителями нормальной кишечной флоры, такими как некоторые виды *Clostridium*, приводит к значительному увеличению числа Трег (141). В соответствии с этими данными, уже упомянутый выше анализ специфичностей ТКР кишечных Трег выявил субпопуляцию iTрег, специфичных к антигенам комменсальных микроорганизмов (Рис. 2-10) (103). Учитывая многочисленность iTрег слизистых оболочек, а также известную и предполагаемую специфичность их ТКР, можно допустить, что iTрег контролируют иммунный ответ на безвредные антигены и предотвращают аллергическое воспаление. Исследования фенотипа Rag-1-дефицитных мышей, трансгенных по ТКР Т-В, нокаутных или интактных в смысле экспрессии Foxp3, также поддерживают эту гипотезу. У этих животных iTрег, несущие трансгенный ТКР, способны поддерживать толерантность в слизистых оболочках и контролировать аллергическое воспаление, которое вызывает введение модельного антигена, узнаваемого ТКР (110). Остается непонятным, какова пропорция iTрег в пуле зрелых Трег, а также, является ли их способность контролировать аллергические реакции и иммунный баланс слизистых исключительной функцией этих клеток, и её не могут выполнять tТрег. Необходимы более точные и специфичные генетические модели, которые позволят селективно удалить tТрег либо iTрег, что даст возможность точно охарактеризовать функциональные ниши этих популяций регуляторных клеток.

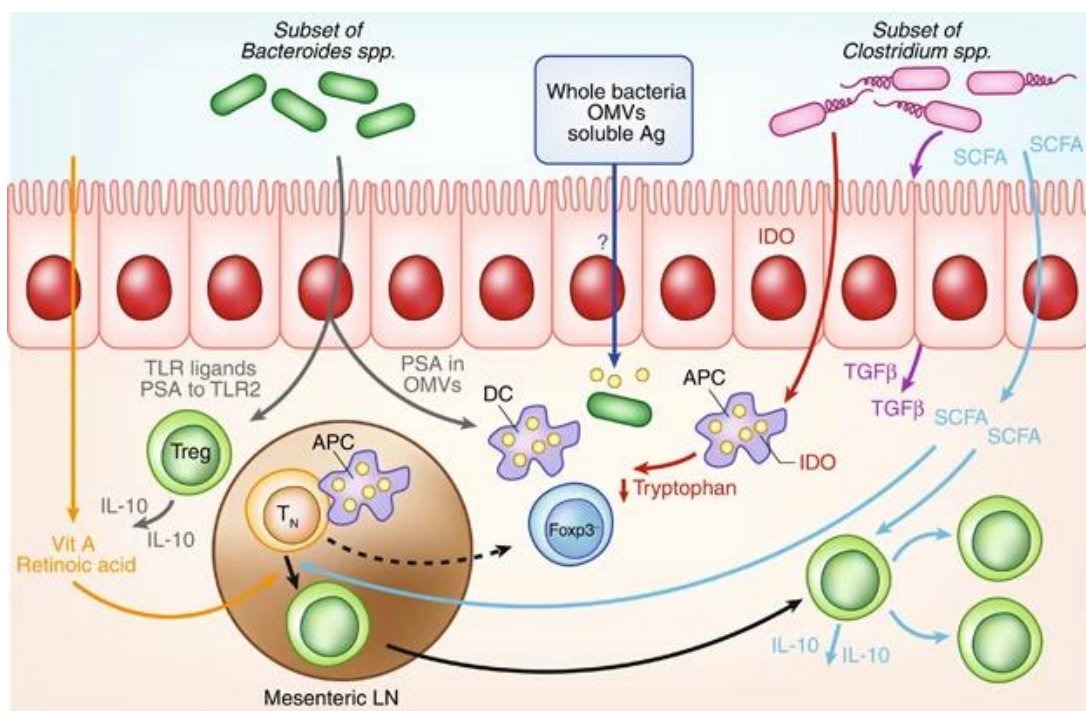


Рисунок 2-10. Влияние комменсальных микроорганизмов на дифференцировку, пролиферацию и функции Трег в кишечнике (<https://doi.org/10.1038/mi.2017.65>).

2.10 Зависимые от *Foxp3* транскрипционная программа и функции Трег

2.10.1 Транскрипционная программа *Foxp3*

Уникальный фенотип и функции Трег невозможны без участия *Foxp3*, что вызывает закономерный вопрос, как сильно прямое действие *Foxp3* сказывается на транскрипционном профиле Трег. Анализ профилей экспрессии генов *Foxp3*⁺ и *Foxp3*⁻ Т-клеток, которые образовались в разных условиях (142, 143), указывает на то, что независимые от *Foxp3* модули транскрипционной программы Трег предшествуют, либо формируются параллельно с проявлением *Foxp3*-зависимой транскрипционной программы. Сюда относится в первую очередь вклад от сигналов, поступающих при активации ТКР, IL-2R и TGF-βR. Определение непосредственного вклада *Foxp3* в транскрипционную программу и функциональные особенности Трег стало возможно после создания двух уже упоминавшихся линий мышей: трансгенной, несущей аллель *Foxp3*, в котором часть, кодирующая белок, заменена на репортер (*Foxp3*^{GFPKO}) (23), и линии, в которой белковый продукт гена *Foxp3* укорочен за счет делеции ДНК-связывающего домена, вместо которого встроен флуоресцентный белок GFP (*Foxp3*^{DeGFP}) (31). Клетки, в которых экспрессированы эти мутантные аллели, проявляют некоторые фенотипические и молекулярные характеристики *Foxp3*⁺ Трег, включая (а) неспособность пролиферировать и секретировать IL-2 в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора, (б) синтез малого количества IL-7Rα

(альфа цепи рецептора IL-7), и (в) наличие на поверхности повышенного уровня CD25, CTLA-4 и GITR, хотя и значительно меньшего, чем у зрелых Трег. В отличие от Трег, GFP+ Т-клетки *Foxp3^{GFPKO}* синтезируют Th2 и Th17 цитокины IL-4 и IL-17. Кроме того, в них утрачены механизмы блокировки автономной пролиферации, их деление можно вызвать путем слабой ко-стимуляции с помощью CD28. Репрессия гена IL-17, характеристического цитокина эффекторных Т-клеток Th17, опосредованная Foxp3, происходит путем модуляции транскрипционной активности генов орфанных ядерных рецепторов ROR γ и ROR α за счет прямого связывания Foxp3 с хроматином (144). В данном случае ROR γ играет роль фактора транскрипции, определяющего образование и свойства линии лимфоцитов Th17 (145). Следует также отметить, что популяция GFP+ Т-клеток из мышей *Foxp3^{GFPKO}* пролиферативно неактивна, а Foxp3+ Трег нормальных животных проявляют достаточно высокую пролиферативную активность *in vivo* в отсутствие воспаления. Наконец, что крайне важно, GFP+ Т-клетки линии мышей *Foxp3^{GFPKO}* полностью лишены супрессорной активности (23). Похожие результаты получены и в работе Chatila и коллег (31) при использовании животных *Foxp3^{DeGFP}*. Несмотря на то, что обе группы провели генетическую инактивацию Foxp3, между двумя линиями есть существенные отличия в фенотипе GFP+ Т-клеток, несущих нефункциональный аллель Foxp3. Вероятно, это результат того, что фрагмент мутантного Foxp3 без ДНК-связывающего домена способен к белок-белковым взаимодействиям (31) в отличие от полного нокаута белка Foxp3 в первой работе (23). Результаты этих исследований демонстрируют, что Foxp3 абсолютно необходим для супрессорной функции, способности пролиферировать и метаболического тонуса Трег.

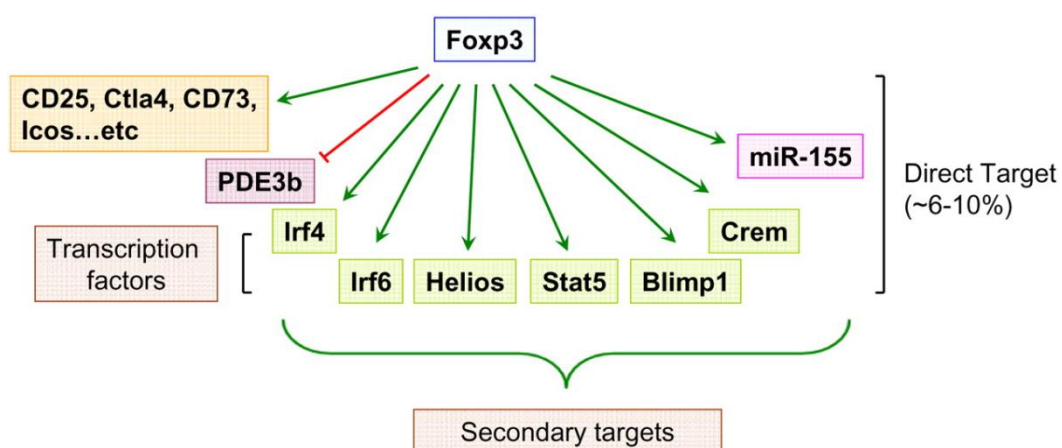


Рисунок 2-11. Прямые мишени Foxp3 (красным показаны гены, которые активируются при связывании Foxp3, зеленым – репрессуемые мишени) (10.1101/gad.1791009).

Foxp3, кроме того, препятствует дифференцировке предшественников Трег в эффекторные Т-клетки. Характерно, что Foxp3 усиливает и закрепляет экспрессию ряда генов, активность которых транзистентно возрастает при активации не-регуляторных Т-клеток. Многие белковые продукты этих зависящих от Foxp3 генов с повышенной или стабилизированной экспрессией в Трег (CTLA-4, IL-10, IL-10ra, FasI) (Рис. 2-11) действуют на клеточном уровне, снижая активацию обыкновенных Т-клеток и действуя как обратные негативные регуляторы. Существует гипотеза, что Foxp3 может объединять эти сигнальные пути для выполнения негативной регуляции клеток иммунной системы *in trans*. Одновременно, Foxp3 усиливает репрессию генов, задействованных в иммунном ответе, которые в норме индуцированы в наивных и эффекторных Т-клетках при стимуляции ТКР. Таким образом, Foxp3 контролирует дифференцировку Трег, усиливая или объединяя позитивные сигналы и корректируя негативные для дифференцировки Трег процессы, происходящие на уровне клеток-предшественников.

2.10.2 Прямые мишени Foxp3

Изучение Foxp3-зависимой транскрипционной программы вызывает вопрос о том, какие гены являются прямыми мишенями Foxp3. Гены-мишени Foxp3 идентифицировали с помощью комбинации методов иммунопреципитации хроматина (ChIP) с анализом гибридизации библиотек кДНК с микрочипами или анализом активных промоторов (146,147). Более точный анализ генов, связывающих Foxp3, с помощью ChIP в сочетании с высокопроизводительным секвенированием (ChIP-Seq) подтвердил и расширил список генов, с которыми связан Foxp3 (148, 149). Перекрестное сравнение наборов данных о генах, с которыми связан Foxp3, и генах, экспрессия которых сильно отличается в Foxp3+ Трег, по сравнению с GFP+ Т-клетках из мышей *Foxp3^{GFPKO}*, показало, что примерно 20-30% Foxp3-зависимых генов прямо регулируются Foxp3 (146, 149). «Прямые» мишени Foxp3 – это многочисленная группа сиквенс-специфических факторов транскрипции и микроРНК, которые выполняют важные функции в биологии Трег и отвечают за контроль уровня различных мРНК и белков в Трег (Рис. 2-11) (146). Анализ мишеней Foxp3 также продемонстрировал, что, в противовес общепринятому мнению, что Foxp3 является репрессором транскрипции (150-152), число генов, экспрессия которых возрастает под действием Foxp3, больше числа тех, чья активность снижается (146), то есть, Foxp3 может служить как активатором, так и репрессором транскрипции. Места связывания Foxp3 с хроматином коррелируют с повышенным содержанием пермиссивных для транскрипции (H3K4me3) и ингибирующих (H3K27me3) модификаций гистонов, локализованных в активируемых и репрессируемых Foxp3 генах, соответственно (146). Эти данные

подразумевают, что для выполнения своих регуляторных функций Foxp3 может взаимодействовать с или рекрутировать модифицирующие хроматин ферменты, следствием чего является формирование уникальной Foxp3-зависимой структуры хроматина и наследуемой при делении транскрипционной программы дифференцировки и поддержания функции Трег. Так, делеция кондиционного аллеля Foxp3 в зрелых Трег приводит к потере характеристической экспрессии генов и супрессорной функции, а также приобретению клетками функции эффекторных Т-клеток (28). Это говорит о том, что характерная для Трег транскрипционная программа и функциональное состояние определяется Foxp3, а наследуемое поддержание установившейся в процессе развития Трег транскрипционной и функциональной программы требует постоянного синтеза Foxp3. Аналогично, для поддержания характерных свойств Б-клеток требуется синтез фактора транскрипции Pax5 (153), а постоянная продукция фактора транскрипции PU.1 необходима для поддержания специфической структуры хроматина, образующейся в процессе дифференцировки макрофагов и Б-клеток (154, 155). Таким образом, стабильный синтез в клетке специфичных для неё факторов транскрипции является общей особенностью поздней дифференцировки, которая нужна для поддержания специализации клеток при делении дифференцированных клеток.

2.11 Белковые партнеры Foxp3

2.11.1 Рецепторы ретиноевой кислоты

Взаимодействия Foxp3 с рядом транскрипционных факторов подтверждено результатами экспериментов по ко-иммунопреципитации, таким образом доказано связывание Foxp3 с IRF4 (фактор ответа на интерферон 4) и ROR γ (рецептор ретиноевой кислоты гамма) (144, 156). ROR γ и Foxp3 присутствуют одновременно в субпопуляции человеческих и мышинных CD4 Т-хелперов из слизистой оболочки кишечника (*lamina propria*) (Рис. 2-12). Факт одновременного синтеза в клетках этих факторов транскрипции вероятно означает, что существует кратковременная фаза активации ещё не полностью коммитированных предшественников специализированных популяций Т-клеток (Трег и Th17) в присутствии повышенных концентраций TGF- β и воспалительных цитокинов – IL-6, IL-21 и IL-1. В этот момент «противоположные» по функции факторы транскрипции осуществляют «инструктаж» клеток, определяя их дальнейшую траекторию дифференцировки в направлении Th17 либо Трег (144). Возможно также, что ROR γ может стабильно присутствовать в некоторых Foxp3+ Т-клетках кишечника, роль которых пока не изучена.

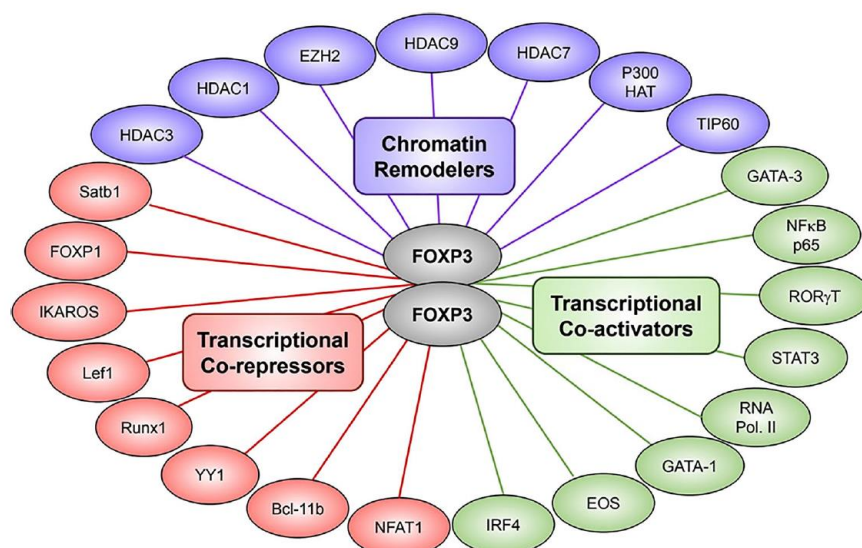


Рисунок 2-12. Белки, взаимодействующие с Foxp3. Видно, что партнеров Foxp3 можно разделить на три больших класса: транскрипционных факторов и ко-активаторов/ко-репрессоров транскрипции, а также белков, которые изменяют структуру хроматина (doi:10.1007/s10875-019-00684-7).

2.11.2 Факторы ремоделирования и модификации хроматина

Несомненно, важным является определение состава содержащих Foxp3 транскрипционных комплексов, поскольку именно он может влиять на результат связывания Foxp3 с хроматином. Масс-спектрометрический анализ транскрипционных комплексов Foxp3, выделенных с помощью иммунопреципитации, выявил в них многочисленные регуляторы экспрессии генов, в том числе, факторы ремоделирования хроматина (BRG1, Ku70/Ku80, and MBD3), ацетилтрансферазу TIP60 и деацетилазу гистонов HDAC7, а также сиквенс-специфические факторы транскрипции (157). На основании полученных данных предположено, что рекрутирование TIP60 в транскрипционные комплексы с Foxp3 вызывает ацетилирование последнего, в то время как HDAC7, напротив, де-ацетилюет Foxp3. Происходящие при этом изменения в ацетилировании Foxp3 могут модулировать активность Foxp3, аналогично тому, как это происходит с белком с-мус (158, 159).

2.11.3 Сиквенс-специфичные факторы транскрипции

Среди специфичных к последовательности факторов транскрипции, являющихся партнерами Foxp3, NFAT и Runx1, по-видимому, абсолютно необходимы для формирования транскрипционной программы и функций, характерных для Трег (161, 162). Молекулярные аспекты связывания Foxp3 и NFAT были исследованы методом рентгеноструктурного анализа тройного комплекса ДНК с ДНК-связывающими доменами NFAT и Foxp2, фактора транскрипции близкородственного Foxp3 (160). Позже была

установлена структура схожих комплексов, содержащих ДНК-связывающий forkhead домен Foxp3 (162). Взаимодействия Foxp3 и NFAT в контексте связывания с ДНК, как полагают, предотвращают образование комплексов NFAT-AP-1, которые необходимы для экспрессии усиливающих иммунный ответ генов в эффекторных Т-клетках. Таким образом, связывание Foxp3 и NFAT в ДНК-зависимой манере закрепляет репрессию связанных с такими комплексами генов в Трег. Кооперация NFAT и Foxp3 может включать геномную программу, необходимую для дифференцировки и функционирования Трег (160). Помимо этого, Foxp3 ингибирует AP-1 путем прямого связывания активированного AP-1 (163). Сайт-направленный мутагенез аминокислотных остатков в ДНК-связывающем домене Foxp3, которые, согласно предсказаниям, участвуют во взаимодействии с NFAT, приводит к потере у Foxp3 способности вызывать изменения в профиле транскрипции и поддерживать характерную для Трег супрессорную функцию (160). Похожая утрата функций Foxp3 происходит при внесении в белок мутаций, нарушающих его связывание с Runx1 в условиях дрожжевой двухгибридной системы (161). Серьезный недостаток основанного на точечном мутагенезе подхода состоит в том, что мутации в белке могут нарушать связывание Foxp3 и с другими белками-партнерами. Действительно, даже в отсутствие функциональных комплексов Runx1-CBFb, Foxp3 может поддерживать характерный для Трег паттерн экспрессии генов и супрессорную активность, а умеренное снижение супрессорной функции Трег в отсутствие Runx1/CBFb скорее связано с постепенным снижением уровня Foxp3 (164). Принимая во внимание сложность взаимодействий и большое число партнеров Foxp3, следует заключить, что необходимы дальнейшие биохимические, генетические и функциональные исследования транскрипционных комплексов Foxp3.

2.12 Функции микроРНК в Foxp3+ Трег

2.12.1 Делеция Dicer или Drosha приводит к потере супрессии и нарушениям в Foxp3-зависимой транскрипционной программе

Foxp3 контролирует дифференцировку и функцию Трег как за счет прямой регуляции активности экспрессии генов, так и опосредованной другими молекулами, к которым относятся и гены микроРНК (146), коротких нетранслируемых РНК, участвующих в процессах органогенеза, дифференцировки клеток, поддержании клеточного состава и многих других. Функция микроРНК состоит в деградации комплементарных им мРНК-мишеней, а также ингибирования их трансляции (165). Последние данные говорят о том, что пост-трансляционная регуляция с помощью микро-РНК играет важную роль в установлении Foxp3-зависимой транскрипционной программы (166–169). Делеция Dicer

или Droscha, двух ферментов, абсолютно необходимых для образования зрелых микроРНК, в Трег приводит к летальному аутоиммунному заболеванию мышей, которое по симптомам очень похоже на проявления аутоиммунной патологии у Foxp3-нокаутных мышей (167–169). Способность Dicer-дефицитных Трег к супрессии снижена в отсутствие воспаления, а в воспалительных условиях полностью отсутствует. Это означает, что микроРНК являются ключевыми молекулами, которые участвуют в стабилизации супрессорной программы Трег в условиях воспаления. И, также как и в обычных Т-клетках, микроРНК поддерживают способность Трег к делению и выживанию (167).

Катастрофические последствия и развитие системных фенотипов, наблюдаемых у животных с Трег-специфическим нокаутом Dicer или Droscha, вызывают закономерный вопрос о наличии специфических микроРНК, которые могут регулировать функции Трег. Отличия в уровне микроРНК между Foxp3+ Трег и обычными Т-клетками впервые установлены Cobb и коллегами (166). Оказалось, что многие из Трег-специфических микроРНК синтезируются в Foxp3-зависимой манере (Рис. 2-13) (146, 147, 170). Так, прямой мишенью Foxp3 является ген miR-155, активация которого при связывании Foxp3

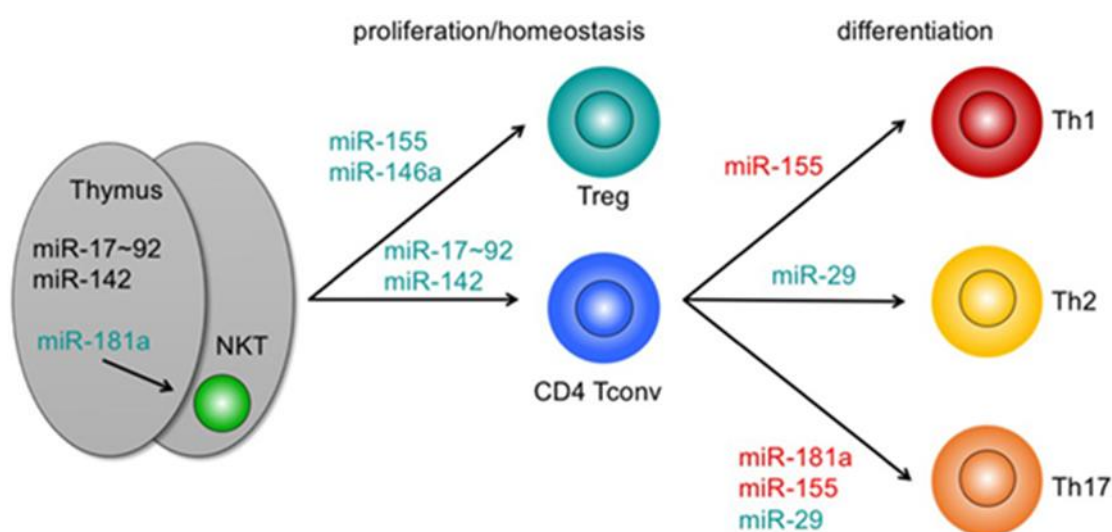


Рисунок 2-13. Роль отдельных микроРНК в созревании и сохранении функции Т-клеток (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00992>).

необходима для повышенной чувствительности клеток к IL-2. Усиленный ответ на IL-2 связан с miR-155-зависимой деградацией мРНК белка SOCS-1. Этот фактор негативно влияет на путь передачи сигнала через IL-2R, снижая численность и функциональность Трег в условиях конкуренции (170).

2.12.2 МикроРНК контролируют супрессорную активность Трег

Функция микроРНК в контроле супрессорной активности Трег впервые была продемонстрирована на примере микроРНК miR-142-3p (171). Авторы исследования обнаружили, что в условиях низкого уровня miR-142-р концентрация цАМФ в Трег повышена, а искусственное увеличение количества miR-142-3p ослабляет супрессорную функцию Трег *in vitro*. Удивительная потеря супрессорной функции Dicer- и Drosha-дефицитными Трег, скорее всего происходит из-за исчезновения микроРНК, которые в нормальных Трег представлены в большом количестве (167, 168). Что касается микроРНК мыши, то в Трег, по сравнению с обычными Т-клетками, достоверно документировано увеличение количества miR-155, miR-214, miR-23b, miR-22, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-27a, и miR-103, наряду с уменьшением miR-29c, miR-142-5p, miR-142-3p, отдельными представителями семейства let-7, miR-30b, miR-30c, miR-25a, miR-26b, и miR-150 (38). В Трег человека обнаружено увеличение miR-21, miR-181c, и miR-374 и снижение miR-31 и miR-125a.

Таблица 1. Основные микроРНК, участвующие в созревании и функционировании Трег (doi: 10.3389/fimmu.2018.00057).

miRNA	Effect on development	Mediated by	Reference
miRNA involved in tTreg development			
miR-155	Increases expression	Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)	(61)
miR-146a	Decreased	STAT1	(54)
miR-146b	Decreases expression	TRAF6/NF- κ B	(65)
miRNA involved in iTreg development			
miR-15b/16	Increased	Mammalian target of rapamycin (mTor)/Rictor	(30)
miR-99a	Increased	mTor	(29, 47)
miR-126	Increased	p85 β	(32)
miR-150	Increased	mTor	(31)
miR-155	Increased	SOCS1	(61)
miR-17	Decreased	TGF β RII	(40)
miR-100	Decreased	SMAD2/3	(31)
miRNA controlling Foxp3 mRNA stability/translation			
miR-15a-16	Decrease	Direct effect	(48)
miR-24	Decrease	Direct effect	(47)
miR-31	Decrease	Direct effect	(36)
miR-210	Decrease	Direct effect	(47)
miR-10a	Increase	Bcl-6	(38, 45)
miR-95	Increase	Unknown	(47)
miRNA effects on suppression-related molecules			
miR-15a-16	Decreases suppression	CTLA-4	(48)
let-7d	Increases suppression	Exosomes	(67, 72)
miR-155	Increases Teff susceptibility to Treg	Unknown	(73)

Функции многих микроРНК в Трег были идентифицированы с использованием генетических подходов, основанных на выключении или сверхпродукции отдельных микроРНК на уровне отдельных популяций клеток (Трег) или целого организма (Таблица 1).

2.12.3 Роль отдельных микроРНК

2.12.3.1 miR-155

miR-155 образуется из экзона некодирующей РНК, называемой VIC (или кластер интеграции Б-клеток). Уровень этой малой РНК существенно повышен в активированных Б- и Т-клетках (172, 173). Особое внимание к miR-155 связано с тем, что её ген, расположенный в интроне VIC, является прямой мишенью Foxp3 (174-176). Уровень экспрессии гена miR-155 строго контролируется Foxp3 в Трег, а увеличение синтеза miR-155, зависимое от Foxp3, в Трег обеспечивает повышенную чувствительность клеток к IL-2. Мыши, дефицитные по miR-155, демонстрируют снижение количества Трег тимусного и периферического происхождения, однако способность мутантных по miR-155 Трег супрессировать пролиферацию Т-клеток сохраняется как *in vitro*, так и *in vivo* (175). miR-155 ускоряет пролиферацию и выживание Трег, снижая уровень белка супрессора сигнала цитокинов 1 (SOCS1), который сам является негативным регулятором сигнального пути, инициируемого IL-2 (Рис. 2-14 панель А), таким образом, увеличивая чувствительность клеток к этому основному для развития и стабильного фенотипа Трег фактору роста (46, 176). В мышинной модели красной волчанки (MRL/lpr) развитие аутоиммунного заболевания ассоциировано с повышенным уровнем синтеза miR-155, что приводит к увеличению числа Трег с измененным фенотипом (CD62L-CD69+) и низким супрессорным потенциалом, которые, по сравнению с нормой, содержат мало Dicer (176). Таким образом, физиологический уровень miR-155 и SOCS1 важен для гомеостаза и поддержаний функций Трег.

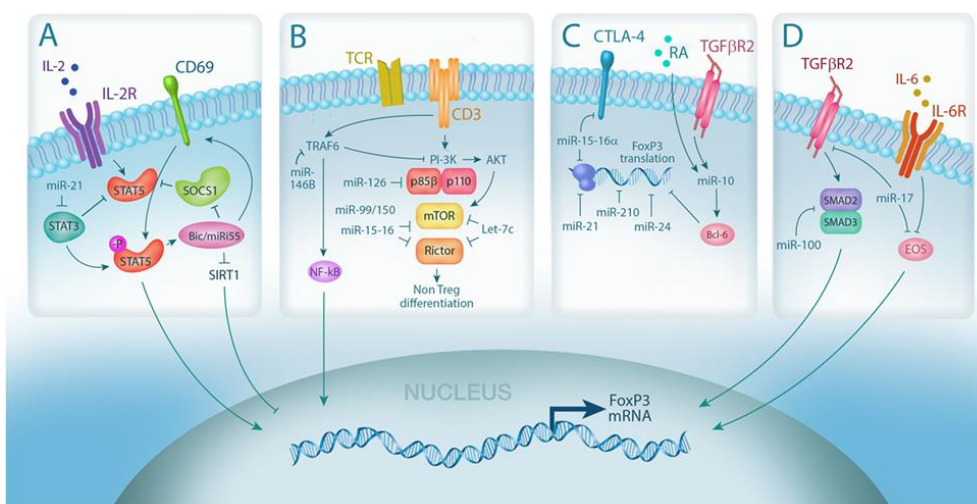


Рисунок 2-14. Молекулярные механизмы, с помощью которых отдельные микроРНК регулируют численность и функции Трег. МикроРНК (miRNA) интегрированы в множественные сигнальные пути в Трег. (А) передача

сигналов IL-2 необходима для дифференцировки Трег и усиливается за счет miRNA-опосредованного подавления ингибиторов передачи сигналов IL-2R, супрессора передачи сигналов цитокинов 1 (SOCS1), (miR-155) и STAT3 (miR-21); (B) Экспрессия miRNA контролирует индукцию Трег путем отрицательной регуляции силы сигнала ТКР посредством понижающей модуляции PI3K β (miR-126) и mTOR/Rictor (miR-99/150, miR-15-16 и Let-7); (C) стабильность и трансляция мРНК Foxp3 также может напрямую негативно регулироваться miRNA через (miR-15-16a, miR-24 и miR-210) или позитивно регулироваться через не прямые механизмы (miR-10 через Bcl-6); (D) miRNA также контролирует пластичность Трег, регулируя экспрессию транскрипционных факторов, необходимых для транскрипции Foxp3, включая SMAD (miR-100) и EOS (miR-17).

2.12.3.2 miR-146

Семейство малых РНК miR-146 состоит из двух молекул miR-146a и miR-146b, которые узнают одинаковые последовательности в РНК-мишенях (т.н. seed sites), но закодированы в разных локусах генома (146, 171). Зрелые последовательности miR-146a и miR-146b отличаются всего лишь двумя нуклеотидами. Тем не менее, в силу одинаковой последовательности, которую они должны узнавать, они обязаны, в принципе, обладать одинаковым набором мишеней. В Трег miR-146a представлена в больших количествах, что указывает на важную роль этой РНК для функционирования Трег (171-173). Так, при дефиците miR-146a наблюдают увеличение числа Трег с нарушенной функцией, вследствие чего происходит нарушение иммунологической толерантности, массивная активация лимфоцитов, которые накапливаются в некоторых органах (177). Следует заметить, что Трег, в которых отсутствует miR-146a, содержат гораздо большее, по сравнению с контролем, количество белка STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) и секретируют значительно больше IFN-g (177). Похожее увеличение уровня Tbet и продукции IFN- γ выявлено у животных с нокаутом Dicer исключительно в Трег (168). Как именно miR-146a регулирует функции Трег пока не совсем понятно. Возможно, miR-146a определяет величину критического порога активации и специализации Трег.

Последствием Трег-специфического нокаута SOCS1, который является ключевым негативным регулятором STAT1, также как и нокаута miR-146a, является развитие тяжелого аутоиммунного заболевания (178). Takahashi и соавторы обнаружили, что Трег, дефицитные по SOCS1, продуцируют много IFN- γ , а также постепенно теряют Foxp3, будучи перенесены (трансплантированы) в иммунодефицитных мышей (51,52). Существует линия мышей, позволяющая необратимо генетически пометить клетки, в которых синтезируется Foxp3 и/или T-bet. Эффекторные T-bet позитивные Трег, которые теряют способность секретировать этот фактор транскрипции, возвращаются к фенотипу Трег в состоянии покоя и стабилизируют синтез Foxp3 (259). Следовательно, сильная

активация STAT1 и T-bet дестабилизируют Трег и снижают их способность супрессировать *in vivo*. miR-146a и miR-155, соответственно, негативно влияют на уровень STAT1 и SOCS1, что может быть необходимо для поддержания оптимального уровня активации Трег и их специализации в направлении Th1.

2.12.3.3 miR-10a

Ген, расположенный рядом с 5'-концом гена *Nox4*, кодирует miR-10a (179,180). Эта малая РНК преимущественно синтезируется мышечными Трег тимусного происхождения, хотя, вероятно, и не является прямым регулятором *Foxp3* и других молекул, участвующих в поддержании пула Трег. Интересно, что количество miR-10a ниже в Трег из линии мышей NOD (non-obese diabetic), для которых характерно спонтанное развитие аутоиммунного диабета с возрастом. Уровень miR-10a в Трег выше в устойчивой к спонтанным проявлениям аутоиммунитета линии C57BL/6 (54). Синтез miR-10a можно индуцировать путем инкубации клеток в среде с добавлением ретиноевой кислоты или TGF- β . Эта РНК ингибирует фенотипическую конверсию (превращение) иТрег в фолликулярные хелперные клетки Tfh, связанную с транскрипционным репрессором Bcl-6 и ко-репрессором Ncor2 (Рис. 2-15) (181). Предполагаемая функция miR-10a заключается, вероятно, в поддержании характерного для Трег фенотипа. Кроме того, miR-10a участвует в регуляции Трег, ассоциированных с иммунным ответом типа Th1. Анализ *Foxp3*⁺ и *Foxp3*⁻ клеток, выделенных из мышей, хронически инфицированных паразитическим простейшим *Leishmania major*, показал, что сигнал от цитокинов IL-12/IFN- γ регулирует количество miR-10a. Также было установлено, что снижение miR-10a в Th1-ассоциированных Трег играет важную роль в осуществлении их супрессорной функции (182).

2.12.3.4 Кластер miR17-92

Кластер miR-17-92 кодирует полицистронный ген микроРНК, с которого транскрибируется общий предшественник сразу шести микроРНК: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a и miR-92a-1 (183). Результаты исследований микроРНК из этого кластера, а также нокаутных мышей, дефицитных по кластеру miR-17-92, показали, что данные микроРНК усиливают продукцию IFN- γ клетками типа Th1 и ингибируют дифференцировку наивных Т-клеток в иТрег (184). В модели трансплантат против хозяина (GVHD) дефицитные по miR17-92 Т-клетки, по сравнению с нормальными Т-клетками, хуже секретируют IFN- γ и более склонны к превращению в хелперы типа Th2 или супрессорные иТрег (184). Транскрипция кластера miR-17-92 зависит от стимуляции ТКР и CD28, что указывает на возможную роль этого кластера в обеспечении эффекторной

функции Трег (Рис. 2-15). У мышей с Трег-специфическим нокаутом кластера miR17-92 наблюдается дефект продукции IL-10, а также происходит формирование антиген-специфической популяции Трег при индукции EAE *in vivo* (185). Мишени малых РНК кластера miR-17-92 в Трег пока охарактеризованы неполно. Нормальный фенотип не может быть восстановлен у животных с Трег-специфическим нокаутом miR-17-92 с помощью выключения фосфатазы Pten (ингибитор каскада PI3K/AKT/mTOR). Yang и коллеги обнаружили, что miR-17 может супрессировать Eos, являющийся ко-регулятором Foxp3, и участвует в обеспечении фенотипа Трег. Сверхпродукция miR-17 в Трег снижает их супрессорную активность и способность предотвращать развитие колита *in vivo* (186). Дальнейшее изучение кластера микроРНК miR-17-92 позволит разобраться с противоречивыми данными, полученными при изучении функций микроРНК этого семейства.

2.12.3.5 miR-27

miR-27 входит в семейство miR-23-27-24. Оно содержит множество членов, которые кодируют два паралога: miR-23a-27a-24-2 (miR-23a cluster) на хромосоме 8 мыши и 19 человека, а также miR-23b-27b-24-1 (miR-23b cluster) на хромосоме 13 мыши и 9 человека (187). В обычных Т-клетках miR-27 и miR-24 совместно контролируют иммунитет типа Th2, прямо и опосредованно действуя на гены IL-4 и GATA3 (63). Уровень miR-27 существенно повышен в CD4 Т-клетках пациентов с рассеянным склерозом (РС) (212-214). Любопытно, что сверхпродукция miR-27 в мышечных Т-клетках приводит к развитию аутоиммунной патологии, проявляющейся в виде лимфаденопатии, спленомегалии и накопления лимфоцитов в тканях и органах. Этот фенотип связан с aberrantными Т-клеточными реакциями, результатом нарушений на уровне Трег. В ходе тимусной селекции избыток miR-27 сильно снижает выход Трег за счет ингибирования c-Rel. Кроме того, Трег с повышенным уровнем miR-27 характеризует сниженная продукция ряда супрессорных молекул, к которым относятся IL-10, GzmB, IL-35, CTLA-4 и TIGIT, что негативно сказывается на активации Трег и их супрессорной активности. Эти данные подтверждают, что контроль уровня miR-27 в Трег важен для их функционирования (211).

2.12.3.6 Семейство miR-125

Семейство miR-125 состоит из трех гомологов has-miR125a, has-miR-125b-1 и has-miR-125-2. Члены семейства играют важнейшую роль в регуляции многих клеточных процессов, например, пролиферации и апоптоза, контролируя уровень факторов транскрипции, матриксных металлопротеиназ и факторов роста (210). Показано, что

количество miR-125a снижено в периферических CD4⁺ Т-клетках пациентов с аутоиммунными заболеваниями, а также мышей с аутоиммунными заболеваниями – аналогами человеческих (206-209). Важно, что именно CD4⁺CD25⁺ Трег являются основным типом клеток, в которых много miR-125a. У Трег с дефицитом miR-125a снижен синтез Foxp3, но повышена экспрессия генов, участвующих в функционировании Т-хелперов, таких как IL-5, IL-13, IFN- γ и IL-22. Дефицит miR-125a приводит к более тяжелым симптомам индуцированного колита и ЕАЕ. Следовательно, miR-125a нужна как для поддержания фенотипа, характерного для Трег, так и для обеспечения их иммуносупрессорной функции. Наконец, искусственный аналог miR-125a (agomir) может предотвратить развитие ЕАЕ и смягчает симптомы уже развившегося заболевания. Прямыми мишенями miR-125a являются многие эффекторные гены, например STAT3, IL-13 и IFN- γ . Есть данные, что miR-125a может супрессировать синтез IL-6R и STAT3, чтобы стабилизировать популяцию Трег в условиях воспаления (202-205). Таким образом, можно заключить, что miR-125a является важным регулятором зависящего от Трег иммунного гомеостаза и контролирует развитие аутоиммунитета (190).

2.12.3.7 miR-31

miR-31 кодирует интрон гена некодирующей РНК LOC554202, расположенного на человеческой хромосоме 9, которая является известным местом потери генетического материала в нескольких видах опухолей человека (192). Количество miR-31 понижено в Трег человека, поскольку она негативно влияет на уровень Foxp3, напрямую взаимодействуя с потенциальным сайтом связывания в 3'-UTR мРНК Foxp3 (173). В мышинных Трег синтез miR-31 можно индуцировать стимуляцией ТКР, в результате чего происходит ингибирование образования iTрег под действием ретиноевой кислоты. Дело в том, что мРНК необходимого для такой периферической индукции белка Grp5a (индуцируемого ретиноевой кислотой белка 3) является мишенью miR-31. Удаление miR-31 усиливает индукцию iTрег и снижает симптомы ЕАЕ (193-195). Таким образом, miR-31 контролирует активность гена Foxp3 в прямой и опосредованной манере.

2.12.3.8 miR-142

miR-142 может присутствовать в двух разных зрелых формах, miR-142-5p и miR-142-3p, что согласуется с вариантами созревания шпилечных РНК (196-199). Количество miR-142-3p в Трег ниже, чем в обычных Т-клетках, причем уровень miR-142-3p связан с количеством Foxp3. Уровень miR-142-3p возрастает при стимуляции ТКР. Zhou и соавторы сообщают, что miR-142-3p связывает 3'-UTR мРНК GARP (Glycoprotein A repetitions

predominant) и репрессирует синтез этого полипептида путем Ago2-зависимой деградации мРНК. Контроль со стороны miR-142-3p ограничивает экспансию Трег в ответ на активацию (197). Кроме того, miR-142-3p в CD4+CD25+ Трег снижает уровень мРНК аденилатциклазы 9, что повышает продукцию цАМФ. Иными словами, miR-142 участвует в поддержании и гомеостаза и функций Трег (201).

Таким образом, отдельные микроРНК контролируют определенные функции Трег, подтверждая гипотезу о том, что отдельные аспекты биологии/функционирования Трег регулируют разные микроРНК.

2.13 Регуляция уровня Foxp3 и стабильность Трег

2.13.1 Стабильная экспрессия Foxp3 определяет фенотип и функции Трег

Учитывая центральную роль, которую Foxp3 играет в поддержании транскрипционной программы, характерной для Трег, а также в сохранении фенотипа, контроль уровня синтеза Foxp3 является центральным моментом поддержания стабильности Трег как отдельной популяции Т-клеток. Foxp3 репрессирует продукцию провоспалительных цитокинов в Трег, в число которых входят IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-4 (23, 27, 31). Это особенно важно, поскольку Трег несут на поверхности ТКР с повышенным сродством к комплексам собственных пептидов с МНС, поэтому потенциально способны вызвать аутоиммунный ответ (48, 50, 52, 55). Так, у мышей, дефицитных по Foxp3, активированные Т-клетки, в отличие наивных, используют варианты ТКР, которые у нормальных мышей находят в Трег. Это наблюдение согласуется с предположением, что в отсутствие Foxp3 существенное количество предшественников аутореактивных клеток, которые в норме становятся Трег, не элиминируются и не претерпевают функциональную инактивацию, а превращаются в активированные эффекторные Т-клетки, которые участвуют в развитии связанного с нежелательным иммунным ответом воспаления (33).

Делеция кондиционного аллеля Foxp3 в зрелых Трег вызывает постепенную потерю зависимой от Foxp3 и формируемой в процессе развития Трег функциональной и транскрипционной программ (28). Постоянная продукция Foxp3 требуется для поддержания транскрипционной программы Трег и супрессорной функции, а также для подавления эффекторных функций, которые присущи обычным Т-клеткам, включая секрецию цитокинов. Форсированное искусственное уменьшение количества Foxp3 в Трег вызывает иммунологические патологии, а также увеличение секреции цитокинов типа Th2, что подчеркивает потенциальную опасность дестабилизации или снижения продукции Foxp3 (27). Таким образом, высокий и постоянный уровень экспрессии гена Foxp3 и

присутствие в клетке больших количеств этого белка необходимо для сохранения особых свойств и функций Трег, а также препятствует их превращению в потенциально вредные эффекторные Т-клетки, узнающие собственные антигены.

Представленные данные свидетельствуют о том, что стабильная экспрессия гена *Foxp3* или отсутствие таковой в нормальных условиях или при воспалении – это важные детерминанты иммунного равновесия. Стабильность *Foxp3* также имеет непосредственное отношение к более общему вопросу: представляют ли Трег отдельный специализированный тип (lineage) клеток, стабильно передающих свой фенотип и свойства при делении, либо являются переходным метастабильным состоянием, которое поддерживается за счет хронической стимуляции ТКР и IL-2R.

Вопрос этот достаточно сложен, поскольку получено много противоречивых данных. Результаты одного из исследований указывают на нестабильную экспрессию *Foxp3*, а также значимое число экс-Трег, образующихся из небольшого числа клеток, количество которых сильно возрастает при делении Т-клеток в условиях лимфопении (172). Интересным объяснением данного феномена был бы механизм, заключающийся в том, что редкая популяция *Foxp3*+CD25- Т-клеток может быть обогащена клетками, уровень *Foxp3* в которых временно повышен при дифференцировке в другие виды эффекторных Т-клеток, что возможно в отсутствие стабильной транскрипционной программы, зависящей от *Foxp3*. Другие работы указывают на то, что экспрессия гена *Foxp3* в Трег исходно нестабильна в нормальных условиях и в случае воспаления. Согласно экспериментальным доказательствам, потеря *Foxp3* происходит в Трег под действием TNF- α , IL-6 или OX40 (214–218). Большинство этих результатов получено при использовании выделенных *Foxp3*+ Трег, которые стимулировали *in vitro* в присутствии воспалительных цитокинов (IL-6), либо при трансплантации этих клеток мышам донорам с лимфопенией или нормальным реципиентам. Однако наблюдаемую пластичность Трег можно объяснить потенциально более быстрым делением немногочисленных примесных *Foxp3*-негативных Т-клеток, связанным с процедурами выделения стрессом, а также, условиями культивирования клеток, способствующими конверсии *Foxp3*+ Трег в эффекторные Т-клетки.

2.13.2 Пластичность фенотипа Трег

Идеи о пластичности Трег и способности этих клеток к дифференцировке в эффекторные Т-клетки получили серьезную поддержку благодаря результатам работы Bluestone и коллег. Они обнаружили, что нестабильность синтеза *Foxp3* Трег приводит к появлению популяции экс-Трег, которые в определенных условиях могут вызывать

аутоиммунные заболевания. В этом исследовании для генетического маркирования клеток, которые в какой-то момент своей жизни синтезировали Foxp3, использовали рекомбиназу Cre, которая была закодирована в трансгенной конструкции Foxp3 BAC под контролем промотора Foxp3. Помимо этого, трансгенные животные несли репортерный аллель, в котором в ответ на появление Cre происходила рекомбинация, приводящая к выщеплению конструкции, блокирующей экспрессию гена YFP. Промотор ROSA26, контролирующей экспрессию гена YFP постоянно активен во всех типах клеток, независимо от стадии эмбрионального развития(219). Результаты работы демонстрируют потерю синтеза Foxp3 в условиях развития аутоиммунного заболевания, спонтанно развивающегося у описанных репортерных животных, при скрещивании с мышами линии NOD, либо при переносе Foxp3+ клеток из репортерных мышей в реципиентов линии NOD. Однако, эти результаты не исключают возможности того, что коммитированные в направлении Трег предшественники стабильно синтезируют Foxp3 и являются отдельным типом клеток с детерминированной судьбой.

В связи с необходимостью изучения стабильности экспрессии гена Foxp3 и поддержания популяции Трег в неинвазивных условиях у взрослых животных мы создали собственную генетическую модель, которая будет описана ниже и исследования которой позволили убедительно ответить на вопрос о стабильности Трег мыши *in vivo*.

2.13.3 Молекулярные механизмы поддержания экспрессии гена Foxp3: роль модификаций хроматина

Определение Трег как стабильной линии клеток подразумевает существование специализированных механизмов, поддерживающих экспрессию гена Foxp3. Один из таких гипотетических механизмов может состоять в связывании Foxp3 в комплексе с Runx1-CBF β с участком CNS2, проксимальным консервативным некодирующим элементом ДНК в локусе Foxp3 (Рис. 2-15) (80). Такое связывание, зависящее от деметилирования CpG островка в составе CNS2, позволяет передавать по наследству активное состояние локуса Foxp3 потомкам делящихся Трег, возможно, за счет эпигенетических механизмов, которые пока не установлены (65, 80).

Базальный промотор Foxp3 обладает достаточно низкой транскрипционной активностью, согласно результатам, полученным при помощи люциферазных репортеров (70, 99). Следовательно, экспрессия гена Foxp3 сильно зависит от активности прилегающих к нему регуляторных элементов ДНК. CNS1, о котором уже сказано выше, содержащий сайты связывания NFAT, RAR/RXR и Smad3, активируемого TGF- β , чрезвычайно важен

для индукции Foxp3 в наивных периферических CD4+ Т-клетках (221). Помимо CNS1, вероятно, существуют и другие элементы в ДНК локуса Foxp3, которые влияют на состояние хроматина, увеличивая доступность локуса Foxp3 и рекрутируя активирующие факторы, которые повышают вероятность индукции гена Foxp3. При этом, несомненно, модификации хроматина, ассоциированные с активным статусом гена (H3K4me3 и ацетилирование гистонов) в районе CNS1 и промотора Foxp3 происходят одновременно или предшествуют экспрессии Foxp3 (68, 70, 100, 126). Однако поскольку переход хроматина в активированное состояние в районе промотора Foxp3 и CNS1 согласованы с экспрессией Foxp3, маловероятно, что эти регуляторные элементы участвуют в ранних событиях ремоделирования хроматина и активации локуса *de novo*. Напротив, должны быть особые регуляторные элементы, действующие раньше, чем CNS1 или промотор Foxp3. Таким элементом является CNS3, для которого характерны модификации хроматина, происходящие в дистальных регуляторных элементах ДНК, включая H3K4me1 и H3K27Ac (Рис. 2-15). Этот элемент доступен не только в Трег, уже экспрессирующих Foxp3, но и в тимусных и периферических предшественниках, что позволяет предположить, что CNS3 участвует в ранней регуляции активации локуса Foxp3. В соответствии с этим утверждением, CNS3 контролирует вероятность экспрессии Foxp3 в популяции клеток предшественников (но не уровень экспрессии), связывая фактор семейства NF-κB, c-Rel (80). Таким образом, CNS3 является регуляторным ДНК-элементом, функционирующим на уровне дифференцировки Трег, на ранних стадиях активации локуса Foxp3, вероятно до других регуляторных элементов в ДНК, таких как промотор Foxp3, CNS1 и CNS2. Также крайне интересно определить вклад других факторов транскрипции, регуляторных мотивов в ДНК и комплексов, модифицирующих и ремоделирующих хроматин в события, связанные с активацией уже идентифицированных элементов, таких как промотор Foxp3, элементов CNS1, CNS2 и CNS3, в создание и сохранение активированного состояния хроматина, необходимого для индукции и поддержания экспрессии гена Foxp3 на высоком уровне.

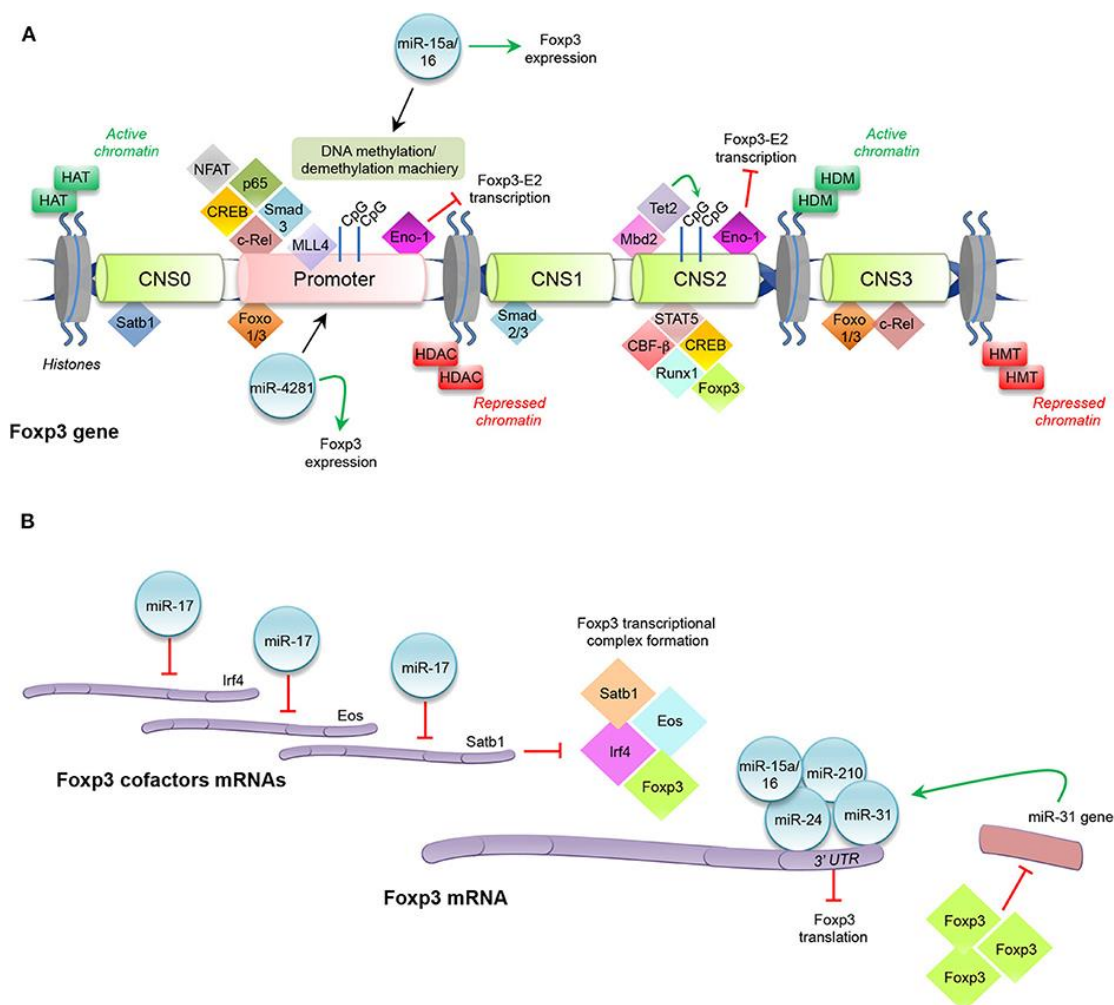


Рисунок 2-15. Эпигенетические механизмы, контролирующие экспрессию гена Foxp3. Показаны основные компоненты комплексов, связывающих промоторную область или 3'UTR мРНК Foxp3, а также модификации гистонов и ДНК, которые с этими комплексами ассоциированы. (<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03136>).

С учетом высокой стабильности экспрессии гена Foxp3 в зрелых Трег крайне интересны молекулярные механизмы, которые используются в Трег для ее поддержания. Несколько работ указывают на деметилирование динуклеотидов CpG в промоторе Foxp3 и участке CNS2 как важное условие для стабильного синтеза Foxp3. Деметилирование метилцитозина коррелирует со стабильной экспрессией гена Foxp3 в свежесинтезированных Трег человека и мыши. Интересно, что эти элементы остаются сильно метилированными в иТрег, полученных *in vitro* и нестабильно синтезирующих Foxp3 (65, 222, 223). Метилированные мотивы CpG могут участвовать в репрессии или abortивной активации локуса Foxp3 в иТрег за счет как маскирования (закрытия) мотивов, связывающих факторы транскрипции, так и привлечения белков, переводящих хроматин в неактивное/закрытое состояние. Эти пути, скорее всего, задействованы в работе элемента CNS2, а факторы транскрипции, которые определяют стабильную наследуемую экспрессию гена Foxp3, должны связываться с CNS2 в деметилированном состоянии.

Действительно, CNS2 связывает комплекс белков, в состав которого входят Foxp3/Runx1/CBF β (Рис. 2-15), а эффективность связывания зависит от деметилирования CpG динуклеотидов в составе CNS2 (80). Взаимодействие этого содержащего Foxp3 комплекса с CNS2 не происходит в иТрег, полученных *in vitro*, в которых высок уровень CpG метилирования CNS2. Другие факторы, например CREB/ATF, NF- κ B, и Ets-1, также связывают CNS2 в деметилированном состоянии (214). Таким образом, нестабильная экспрессия гена Foxp3 в полученных *in vitro* иТрег может быть результатом неэффективного деметилирования CNS2, которое необходимо для формирования позитивной ауторегуляции экспрессии гена Foxp3 самим Foxp3 и другими факторами транскрипции. В пользу этой гипотезы свидетельствуют экспериментальные данные о том, что и Foxp3, и Runx1/CBF β необходимы для поддержания стабильно высокого уровня транскрипции гена Foxp3 в зрелых Трег (23, 27, 164, 215–217). В этом предполагаемом ауторегуляторном цикле белковые комплексы Foxp3 с партнерами, передаваемые при делении зрелых Трег дочерним клеткам, связывают деметилированный CNS2, чтобы поддерживать экспрессию гена Foxp3, а следовательно, стабильность Трег. Такая двухстадийная петля прямой положительной связи в ауторегуляции экспрессии Foxp3 может объяснить удивительную стабильность транскрипции этого гена в зрелых Трег (210).

Хотя функции Foxp3 в клетках мыши и человека очень похожи, в человеческих Трег выявлены существенные отличия в контроле экспрессии FOXP3 активированными Т-клетками (187). Стабильная экспрессия FOXP3 на высоком уровне характерна для Трег этих двух видов млекопитающих, однако в человеческих Т-клетках при антигенной стимуляции происходит кратковременное повышение экспрессии FOXP3 (49, 219–221). Этот относительно небольшой «всплеск» экспрессии Foxp3 активированными Т-клетками требует TGF- β , выделяемого самими активированными Т-клетками или циркулирующего в сыворотке, но не придает клеткам фенотипа Трег и стабильной экспрессии FOXP3 (27, 231). Кроме того, экспрессия FOXP3 обычными Т-клетками человека в присутствии высоких концентраций TGF- β не приводит к появлению супрессорных свойств (220, 223). По-видимому, такая низкоуровневая экспрессия гена FOXP3 в активированных Т-хелперах человека, а также нестабильная экспрессия Foxp3 в иТрег, полученных *in vitro*, является следствием невозможности задействовать CNS2, который метилирован и находится в репрессированном состоянии. Ряд фактов поддерживает это предположение. Нокаунт, ингибирование низкомолекулярными соединениями либо удаление гена метилтрансферазы Dnmt1 и сопутствующее деметилирование CpG мотива повышает и вероятность индукции, и, что особенно важно, стабильность экспрессии Foxp3 (62, 65, 70). Механизм, отвечающий

за перевод соответствующих участков хроматина в активированное состояние, а также приводящий к деметилированию CNS2 изучен плохо, равно как и зависящее от комплексов Foxp3 поддержание этих активных состояний, а также наследуемое сохранение экспрессии гена Foxp3 на высоком уровне.

2.14 Молекулярные механизмы иммуносупрессии, опосредованные Трег

2.14.1 Обзор основных механизмов Трег-опосредованной иммуносупрессии

Несмотря на быстро накапливающиеся знания о роли Трег в регуляции иммунитета, наше понимание молекулярных механизмов супрессии пока весьма ограничено. Определение профилей транскрипции Трег и их сравнение с профилями транскрипции активированных Т-клеток позволили выделить значительное число генов, в том числе, кодирующих поверхностные белки и секретируемые молекулы, которые потенциально могут обладать функцией супрессорных молекул в опосредованной Трег регуляции иммунитета (224–227).

Среди поверхностных молекул особняком стоит маркер CD25 или IL-2R α , первый идентифицированный маркер Трег, уровень которого также значительно повышен в эффекторных Т-клетках, и который постоянно присутствует в большом количестве на поверхности Трег. Этот белок абсолютно необходим для гомеостатической пролиферации Трег (88, 228). В то же время, большие количества IL-2R α на поверхности Трег могут отвечать за депривацию эффекторных Т-клеток по IL-2, что негативно влияет на их пролиферацию (229). Другая молекула, стабильно высокий уровень которой на поверхности характерен для Трег, CTLA-4, помимо функции ограничения ответа на стимуляцию активированных Т-клеток, участвует в иммуносупрессорной функции Трег (230). Функция CTLA-4 в Трег, которую ранее исследовали путем адоптивного переноса Трег и блокады CTLA-4 моноклональными антителами (231-233), была установлена с помощью генетического подхода, а именно, создания трансгенных животных с селективной потерей гена CTLA-4 исключительно в Трег с последующим анализом их фенотипа (234, 235). Селективная потеря CTLA-4 в Трег приводит к сильному увеличению числа и активации Трег в условиях воспаления, вызванного нарушением супрессорной активности таких мутантных Трег. У животных с генетическим фоном BALB/c, известных своей склонностью к развитию патологий, связанных с активацией иммунной системы, снижение супрессорной способности CTLA-4-дефицитных Трег связано с их неспособностью понижать на поверхности дендритных клеток количество молекул CD80 и CD86 (B7-1, B7-2) путем транс-эндоцитоза (234, 236). Эти результаты хорошо согласуются с феноменом

сильного увеличения и мощной активации дендритных клеток, наблюдаемым через короткое время после резкого селективного удаления Трег (35).

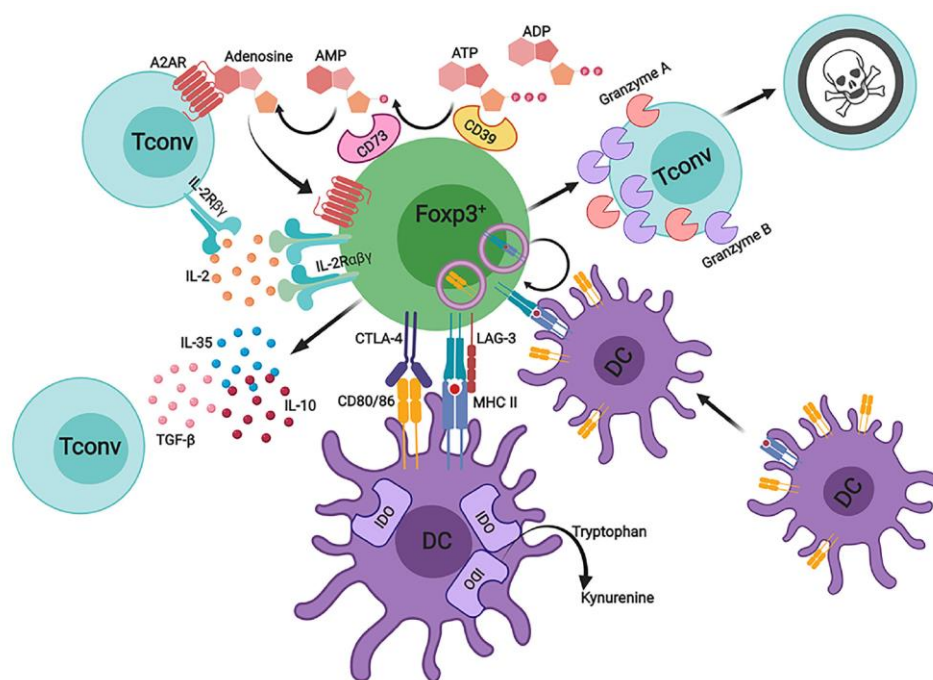


Рисунок 2-16. Основные механизмы Трег-опосредованной супрессии иммунного ответа (doi:10.1007/s10875-019-00684-7).

Другие поверхностные молекулы, например CD39 и CD73, являющиеся эктоферментами, уровень синтеза которых высок в Трег, как было недавно показано, также принимают непосредственное участие в опосредованной Трег иммуносупрессии, увеличивая уровень внеклеточного аденозина и снижая количество АТФ и цАМФ (237–239). Выделяемый аденозин не только прямо ингибирует пролиферацию эффекторных Т-клеток, но и негативно влияет на функции дендритных клеток. Поскольку, согласно доминирующим представлениям, ключевая функция Трег состоит именно в контроле праймирования эффекторных клеток через АПК, было предложено ещё несколько кандидатов, которые Трег могут использовать для контроля функций АПК. В частности, LAG-3, гомолог CD4, который обладает высокой аффинностью к молекулам МНС II, вероятно, необходим для достижения тТрег и иТрег максимальной супрессорной активности (241). Связывание молекул МНС на поверхности незрелых дендритных клеток с LAG-3 может ингибировать их созревание и способность предоставлять Т-клеткам ко-стимуляционные молекулы (242). Ещё одной молекулой, которая в больших количествах присутствует на поверхности активированных обычных Т-клеток и Трег, является белок TIGIT, входящий в семейство Ig-подобных белков. При взаимодействии Трег с дендритными клетками, TIGIT индуцирует секрецию последними иммуносупрессорных ИЛ-

10 и TGF- β (243). Долговременные контакты между Трег и ДК были убедительно продемонстрированы методами прижизненной микроскопии на мышах (244, 245). Эти взаимодействия усиливает белок, направляющий рост нейронов, нейропилин-1, который как правило, в большом количестве обнаруживают в разных типах Трег. Блокада нейропилина-1 или его нокаут нарушают способность Трег к иммуносупрессии (246, 247). По-видимому, нейропилин-1 не является эффекторной молекулой в её обычном понимании, скорее он необходим для усиления связывания Трег с клетками-мишенями. Высокий уровень нейропилина характерен для Трег, образующихся на периферии из обычных CD4 Т-клеток, что позволяет рассматривать его как потенциальный маркер и Трег.

Белки семейства рецепторов TNF, например GITR, являются важными регуляторами функций Трег (224,225). Помимо Трег уровень GITR повышен в активированных эффекторных Т-клетках, в которых, как и другие члены семейства, OX40, 4-1BB и TNFRII, он проявляет мощные ко-стимуляторные функции, а также способствует выживанию клеток. Скорее всего, роль GITR на поверхности эффекторных Т-клеток заключается в их дополнительной стимуляции, которая способствует освобождению от Трег-зависимой иммуносупрессии (226, 227). В соответствии с этой гипотезой дефицит GITR не приводит к заметным нарушениям иммунного гомеостаза или толерантности (248), что не отменяет потенциального использования GITR в качестве мишени для иммунотерапии онкологических заболеваний.

Согласно данным по исследованию профилей экспрессии генов некоторые секретлируемые белки также участвуют в опосредованной Трег супрессии. В их число входят IL-10, IL-35, гранзим Б и TGF- β (249, 250).

Так, секретлируемый Трег цитокин IL-35 участвуют в поддержании иммунологической толерантности в кишечнике. В отсутствие IL-12p35 или Ebi3, двух основных компонентов IL-35, Трег при адоптивном переносе реципиентам, лишенным Т-клеток, не могут контролировать гомеостатическую пролиферацию, что приводит к развитию IBD (inflammatory bowel disease) (252). TGF- β , продуцируемый Трег, супрессирует активацию Th1 клеток (253).

Прямой цитолиз клеток-мишеней – это одно из проявлений иммуносупрессорной активности Трег. Показано, что продукция гранзима А, приводящая к индукции апоптоза клеток-мишеней, может быть индуцирована в Трег при комбинации стимуляции через CD3 и CD46, (254). Позже было установлено, что ген гранзима Б (но не гранзима А), подвержен

сильной индукции в Трег мыши. В процессе активации Трег могут убивать и эффекторные клетки, и АПК в гранзим-зависимой манере *in vitro* (255, 256). Эти результаты подтверждены результатами экспериментов *in vivo*, показавшими, что гранзим Б критически важен для поддержания долговременной зависящей от Трег толерантности при пересадке кожи, а также Трег-зависимой супрессии иммунного ответа на опухоли (257, 258).

2.14.2 Супрессия отдельных типов иммунного ответа Трег

Следует отметить, что ни один из вышеупомянутых механизмов супрессии не может быть полностью ответственным за способность Трег контролировать иммунный ответ. Более того, зависящая от Foxp3 супрессорная программа может контролировать различные виды иммунного ответа на патогены или собственные антигены. Исходно было непонятно, обладают ли Трег универсальной строго детерминированной программой для угнетения любых форм иммунного ответа или их функция поделена на отдельные модули, каждый из которых при активации ответственен за ингибирование определенного типа иммунного ответа. Накапливающиеся экспериментальные доказательства убеждают, что существуют отдельные виды иммуносупрессии, которые характерны для отдельных органов и воспалительного фона (микроразрушения) (Рис. 2-17). Например, исследование роли фактора транскрипции IRF4 в Трег позволило выяснить, что этот белок, который необходим для дифференцировки эффекторных Т-клеток Th2, формирует комплексы с Foxp3 и регулирует набор генов, которые определяют способность Трег супрессировать

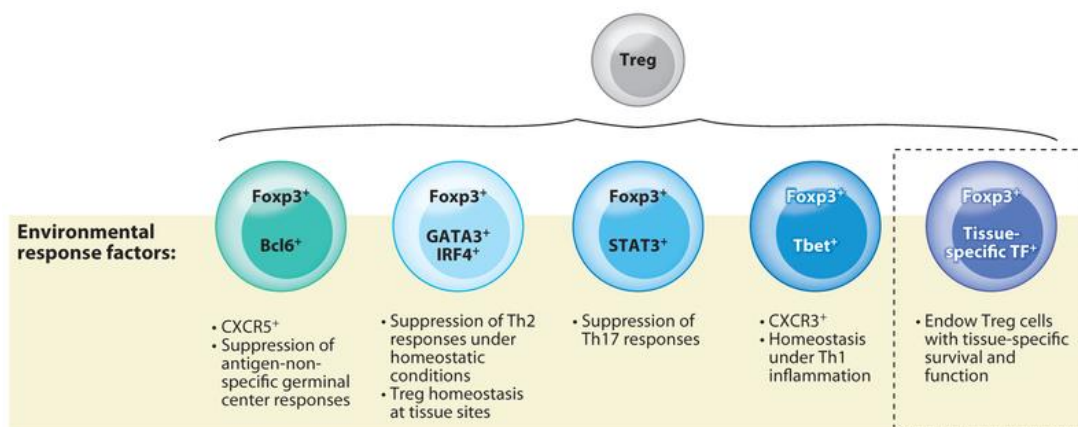


Рисунок 2-17. Супрессия Трег разных типов эффекторных Т-клеток определяется активацией разных факторов транскрипции (doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.).

эффекторные Т-клетки Th2. Делеция кондиционного аллеля *Irf4* в Трег приводит к селективному нарушению толерантности и развитию спонтанных Th2 ответов, состоящих в повышенной продукции цитокинов Th2, зависящей от IL-4 продукции IgE и

инфильтрации в ткани плазматических клеток (156). Аналогичным образом в другой работе установлено, что появление в клетках Трег T-bet, ключевого фактора транскрипции при дифференцировке эффекторных клеток Th1, позволяет Трег увеличить на поверхности количество CXCR3, который определяет их миграцию, пролиферацию и скопление в местах образования Th1-клеток (259). Хотя не наблюдается явного изменения супрессорной активности Трег, дефицит T-bet в Трег приводит к нарушению регуляции ответов Th1, но не Th2 или Th17. Данные результаты коррелируют с тем фактом, что селективная абляция STAT3, необходимого для индукции Th17 транскрипционного фактора, в клетках Трег приводит к неконтролируемой Th17-зависимой патологии (260). Кроме того, как показали два недавних исследования, в клетках Трег экспрессия транскрипционного фактора Bcl6, играющего ключевую роль в развитии Т-фолликулярных хелперных клеток, важна для Трег-зависимой регуляции ответов, происходящих в зародышевых (герминальных) центрах, вероятно, посредством индукции CXCR5 (261, 262). Позволяют ли Th-специфические транскрипционные факторы Трег (а) обладать селективными миграционными свойствами, (б) усиливать определенные способности подавления, специализирующиеся на эффективном контроле соответствующего типа иммунных ответов, или (с) выполнять оба эти действия, еще предстоит детально изучить. Тем не менее, существующие данные ясно указывают на возможность того, что факторы транскрипции, необходимые для развития различных Th-линий, играют одинаково важную роль в гомеостазе Трег и функционируют при наличии сходных воспалительных сигналов. Кроме того, как упоминалось выше, клетки Трег, дефицитные по miR-146a, не способны контролировать ответы Th1, вероятно, из-за неограниченной экспрессии и активации Stat1. Точно так же чрезмерная активация Stat1 в SOCS1-дефицитных клетках Трег также приводит к дисрегуляции Th1 и патологии (172).

Эти данные подтверждают вышеупомянутую концепцию симметрии в интеграции сигналов окружающей среды с помощью клеток Трег и иммунных эффекторных клеток. Однако в более ранних исследованиях именно недостаток Th-специфических транскрипционных факторов Bcl6, Stat3, IRF4 и Stat1/T-bet в линиях Трег приводил к нарушению подавления Т-фолликулярного хелперного ответа, Th17, Th2 и Th1, соответственно. Напротив, вышеупомянутые исследования роли miR-146a и SOCS1 показали, что неограниченная активация Stat1 в клетках Трег приводит к иммунопатологии. Тот факт, что как отсутствие Stat1, так и бесконтрольная активация Stat1 приводят к нарушению иммунологической толерантности, подразумевает существование общих закономерностей, согласно которым специализированные программы подавления клеток

Трег устанавливаются в динамически изменяющихся воспалительных средах путем поддержания оптимального порога активации факторов транскрипции зависящих от рецепторов цитокинов, имеющих решающее значение для соответствующего типа иммунного ответа.

Расширяя это утверждение, можно предположить, что другие специфичные для клетки/ткани геномные программы, управляемые соответствующими факторами транскрипции, могут также способствовать способности субпопуляций Трег-клеток, обитающих в тканях, поддерживать гомеостаз тканей. Первые экспериментальные доказательства в пользу такого предположения были предоставлены исследованием, показавшим, что в клетках Трег, выделенных из жировой ткани, экспрессия гена PPAR γ выше, чем в клетках, выделенных из вторичных лимфоидных тканей (263). Роль клеток Трег в противодействии метаболическому воспалению в жировой ткани была предложена и другой группой (264). Кроме того, недавнее исследование Mathis, Benoist и коллег продемонстрировало, что большое количество активируемого пролифератором пероксисом гамма-рецептора (PPAR γ), транскрипционного фактора, необходимого для дифференцировки адипоцитов, является уникальной отличительной особенностью жировых клеток Трег, и PPAR γ играет центральную и важную роль в гомеостазе жировых Трег и их функции (265).

2.15 Трег в патогенезе аутоиммунных заболеваний на примере ревматоидного артрита

2.15.1 Основные факторы патогенеза РА

Хотя этиология РА недостаточно изучена, мнение о её аутоиммунной природе получило широкое признание. Считается, что взаимодействие между генетической предрасположенностью и факторами окружающей среды, такими как курение и микробные инфекции, вызывает развитие болезни (Рис. 2-18) (266, 270). Вклад генетических факторов в патогенез РА связан, в основном, с определенными аллелями HLA класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС) (267). Помимо представления антигенных пептидов CD4⁺ Т-клеткам на периферии, молекулы HLA класса II также отвечают за отбор репертуара CD4⁺ ТКР в тимусе и, таким образом, контролируют высвобождение аутореактивных клеток (268, 269). Консенсусный аминокислотный мотив в пептид-связывающем кармане P4 субъединицы β 1 молекулы HLA-DR, обозначаемый как «общий эпитоп» (SE), является основным фактором риска РА (270, 271). Среди аллелей HLA-DR, содержащих SE, DRB1 * 0401 и * 0101 наиболее подробно исследованы в контексте РА

(272). Было показано, что различные пептиды, полученные из эндогенных суставных белков, таких как коллаген типа II (CII), хрящевой протеогликан агрекан и человеческий хрящевой гликопротеин (HCgp) (268), связываются с SE-содержащими молекулами HLA-DR и специфически распознаются Т-лимфоцитами пациентов с РА (270, 271). В частности, пептиды, посттрансляционно модифицированные цитруллинированием, связываются с высокой аффинностью с SE, инициируя цитруллин-специфические ответы Т- и В-клеток (273,274). Цитруллинирование катализируется пептидиларгининовыми деаминазами (PAD), которые превращают аминокислоту аргинин в цитруллин, что приводит к потере положительного заряда и образованию иммуногенных пептидов (275).

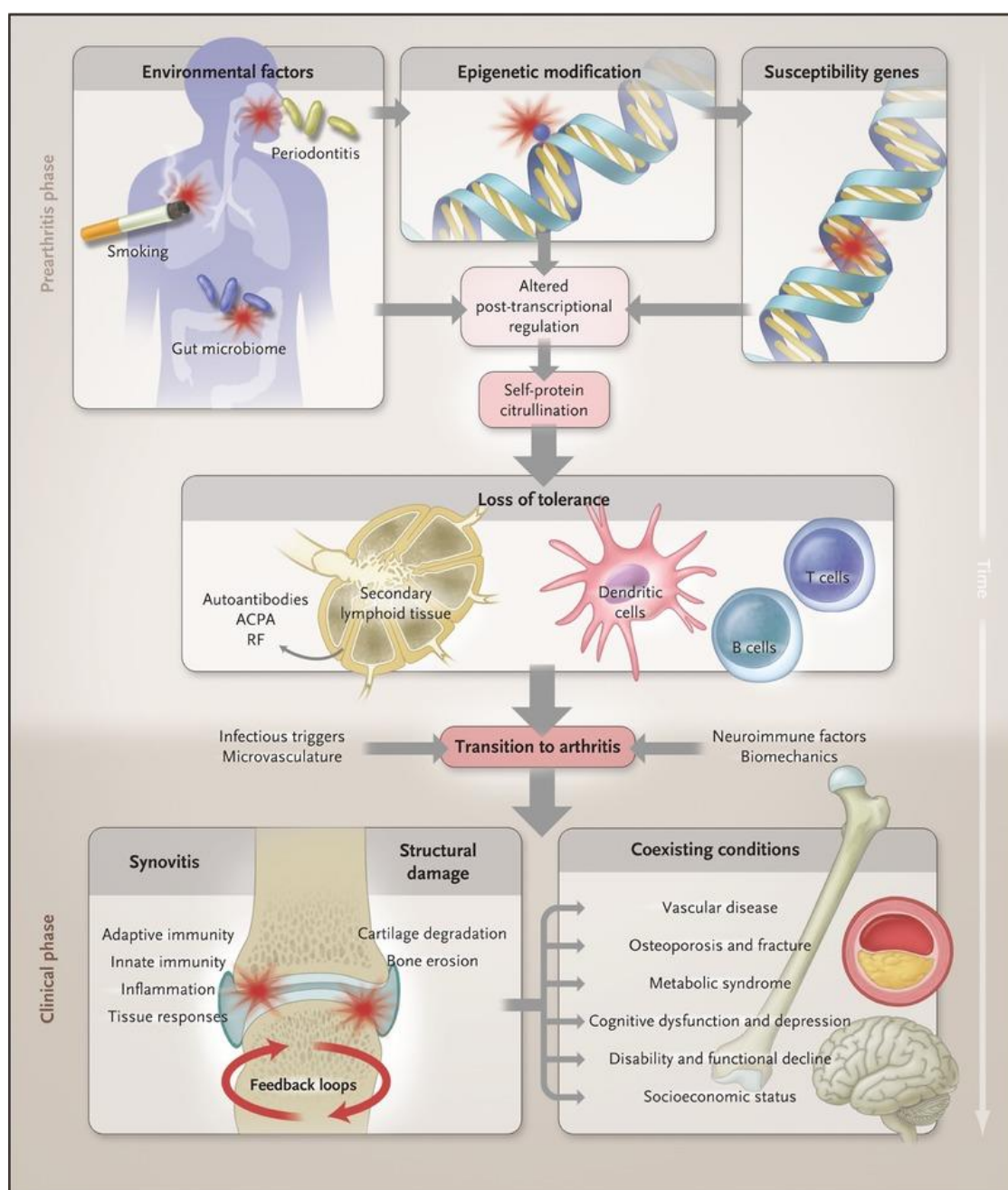


Рисунок 2-18. Патогенез ревматоидного артрита (DOI: 10.1056/NEJMra1004965).

Цитруллинированные пептиды – фрагменты фибриногена, виментина, α -енолазы, агрекана и СР, присутствуют в суставах при РА и являются мишенями для ответов лимфоцитов у пациентов с РА, несущих SE (276, 277). Антитела, направленные против цитруллинированных белков/пептидов (АСРА), специфичны для РА и связаны с наличием SE и повышенной тяжестью заболевания (Рис.2-18) (278, 279).

АПК, особенно ДК, играют ключевую роль в инициации и развитии аутоиммунного ответа при РА (280). ДК могут активировать аутореактивные CD4⁺ Т-клетки, предоставляя аутоантигены в контексте молекул МНС класса II и обеспечивая костимулирующие и провоспалительные сигналы (281–283). Активированные аутореактивные CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в подгруппы воспалительных Т-хелперов (Th), продуцирующие интерферон (IFN- γ) и фактор некроза опухоли (TNF) в Th1,

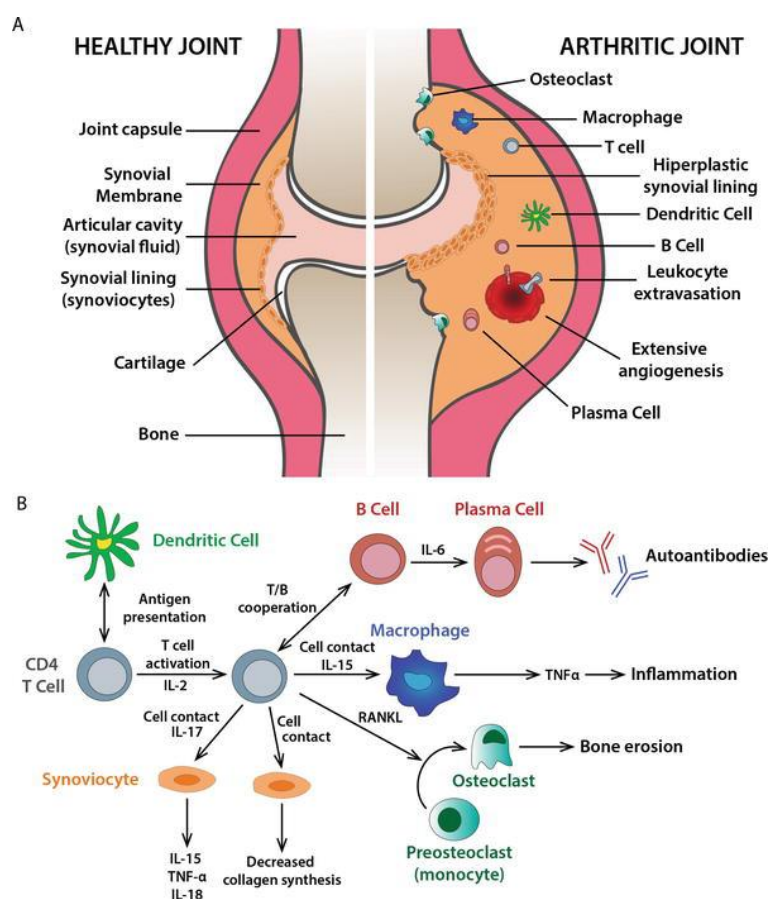


Рисунок 2-19. Основные типы иммунных клеток и суставов и молекулы, участвующие в патогенезе РА (по DOI: 10.5772/intechopen.70239).

IL-17 и IL-21 в Th17, или профиль смешанных цитокинов (Th1/17), и накапливаются в воспаленном суставе (284-286). Эти аутореактивные Т-клетки управляют дифференцировкой В-лимфоцитов в плазматические клетки, продуцирующие аутоантитела, такие как АСРА (287), которые, в свою очередь, способствуют

дифференцировке и активации остеокластов, что приводит к эрозии хряща и кости (288,289). Аутореактивные CD4⁺ Т-клетки также стимулируют макрофаги и синовиальные фибробласты к секреции провоспалительных медиаторов, таких как TNF, IL-1 и IL-6 (Рис. 2-19), способствующих синовиальному воспалению посредством рекрутирования иммунных клеток и экспансии синовиальных фибробластов с образованием инвазивного паннуса (290, 291).

2.15.2 Современные методы терапии РА

Текущие варианты лечения РА включают нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды и противоревматические препараты – обычные, такие как метотрексат, нацеленные (таргетные), такие как ингибиторы киназы Janus, или биопрепараты, включающие антагонисты провоспалительных цитокинов, модификаторы Т-клеточной костимуляции и антитела к В-клеткам (292, 293). Недостатком такой терапии, помимо того, что часть пациентов остаются невосприимчивыми к лечению (294), является то, что ни один из этих препаратов не обеспечивает излечения от РА, требующего пожизненного лечения, связанного с прогрессирующей потерей эффективности, токсичностью и появлением серьезных побочных эффектов препаратов (295-297). Многообещающей стратегией для восстановления собственной толерантности и, таким образом, достижения долгосрочной ремиссии, является истощение или перепрограммирование аутореактивных Т-клеток в Трег клетками пациента или терапия толерогенными ДК (tolDCs) (298-300). Хотя клетки Трег присутствуют в синовиальной жидкости пациентов с РА, они не способны ингибировать иммунный ответ типа Th1 (301,302). Стратегии, нацеленные на клетки Трег для лечения РА, включают (i) экспансию аутоантиген-специфических естественных клеток Трег *in vivo*, (ii) их размножение *in vitro* и последующий перенос обратно в хозяина и (iii) конверсию антиген-специфических Т-клеток в Трег *in vitro* или (iv) *in vivo* (298, 303,304). Дендритные клетки (ДК) являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками, которые инструктируют Т-клетки. TolDC с иммунорегуляторными свойствами могут генерироваться *in vitro* из моноцитов или гемопоэтических стволовых клеток и способны контролировать aberrantные ответы CD4⁺ Т-клеток за счет индукции анергии, превращения Т-эффекторов в Трег-клетки или делеции аутореактивных Т-клеток (303, 304).

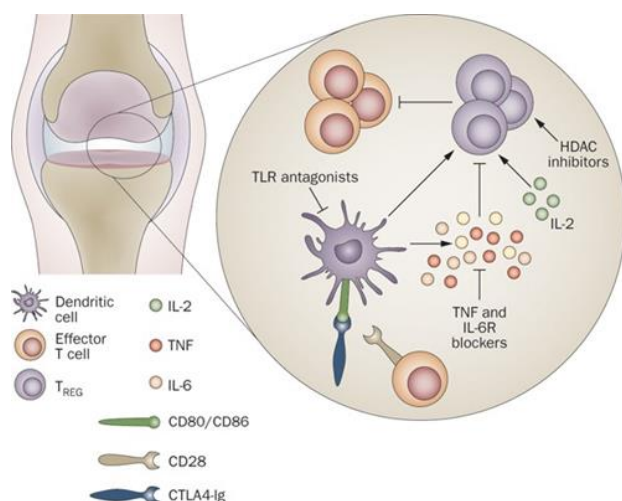


Рисунок 2-20. Влияние различных видов терапии РА на Трег (<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.183>).

Важным преимуществом терапии на основе tolDC или Трег по сравнению с традиционным лечением РА является ее способность модулировать иммунные ответы антиген-специфическим образом, что может позволить избирательное подавление аутореактивных ответов лимфоцитов, избегая при этом общего отключения иммунитета против патогенов. Подходы, основанные на использовании Трег и tolDC, были тщательно протестированы на традиционных мышинных моделях РА-подобного заболевания (305), а безопасность tolDCs была доказана в клинических испытаниях I/II фазы (306,307).

2.15.3 Дефекты в Трег при ревматоидном артрите

CD4⁺CD25⁺ Трег-клетки составляют приблизительно 5–10% зрелых CD4⁺ Т-клеток у мышей и людей, и приблизительно 1–2% CD4⁺ Трег-клеток обнаруживаются в периферической крови. Клетки нТрег мыши и человека фенотипически сходны на основе поверхностных маркеров, экспрессирующих молекулы МНС-класса II, CD25, CD122, CD132, GITR, CTLA-4, PD-L1, CD62, CD38, CD45RO и Foxp3. Хотя нТрег могут использовать механизм межклеточного контакта для обеспечения своей супрессирующей функции, мышинные клетки нТрег, в отличие от человеческих, используют гранзим-В-зависимый и перфорин-независимый пути, а не гранзим-А и перфорин-зависимый пути. Количество CD4⁺CD25⁺ Трег-клеток в периферической крови пациентов различно в зависимости от стадии заболевания; однако частота клеток Трег в синовиальной жидкости постоянно выше, чем в периферической крови. Кроме того, хотя клетки Трег от пациентов с РА все еще сохраняют свою супрессивную способность, они не способны остановить выработку воспалительных цитокинов, таких как TNF- α , моноцитами или активированными Т-клетками (301). Этот функциональный дефект клеток Трег при РА связан с высокой концентрацией TNF- α , что снижает экспрессию Foxp3 или приводит к

некорректной экспрессии CTLA-4 (302). Количество клеток является критическим при развитии артрита. При многих аутоиммунных заболеваниях, например ювенильном идиопатическом артрите, псориатическом артрите, рассеянном склерозе, системной красной волчанке, аутоиммунном гепатите и диабете 1 типа, количество и супрессорная активность циркулирующих CD4⁺CD25⁺ Трег-клеток резко снижаются (308). Несмотря на присутствие в суставах пациентов с РА, Трег не обладают нормальной иммуносупрессивной активностью. Трег в синовиальной жидкости пациентов с РА подвергаются воздействию ряда воспалительных цитокинов; высокое количество TNF- α , секретируемое воспаленной синовиальной оболочкой в суставную жидкость, вероятно, вызывает аномальное фосфорилирование Foxp3, что приводит к дефектам в супрессивной функции клеток Трег.

Функцию и число Трег-клеток можно определять в периферической крови, а также в месте воспаления у пациентов с артритом. Циркулирующие клетки Трег у пациентов с РА обладают сниженной функциональной активностью, особенно в отношении супрессии (309); однако в обогащенных Трег, выделенных из воспаленных суставов, супрессирующая активность *in vitro* высока и стабильна (310). Согласно принятому мнению, это высокоактивные Трег, которые обладают повышенной супрессивной активностью (310). В синовии пациентов с РА метилирование ДНК Foxp3 приводит к более высокой частоте формирования iTрег (311). В воспаленной синовии пациентов с РА местная ткань и различные иммунные клетки взаимодействуют через цитокины и/или межклеточные контакты. Провоспалительные цитокины, например TNF- α , IL-6, и антигенпрезентирующие клетки (АПК) также влияют на функцию клеток Трег (Рис. 2-20). Несмотря на то, что клетки Трег присутствуют в больших количествах и обладают супрессивной функцией *in vitro*, они, по-видимому, проявляют различную супрессивную способность *in vivo* в воспалительном микроокружении или сталкиваются с резистентностью эффекторных Т-клеток к супрессии (312).

2.15.4 Новые подходы к лечению РА: терапия, направленная на Трег

Новые подходы для лечения РА, включают: таргетную иммунотерапию, терапию стволовыми клетками, терапию мезенхимными стволовыми клетками (MSC), терапию гемопоэтическими стволовыми клетками (HSC) и клеточную терапию Трег. В области РА биологическая терапия является новым типом терапии и обычно проводится на конкретных биологических мишенях, которые входят в воспалительные каскады. Как правило, этими мишенями являются TNF- α , IL-6, антагонист рецептора IL-1 и растворимый CTLA-4.

Известны три препарата, нацеленных на TNF- α – инфликсимаб, адалимумаб и этанерцепт. В настоящее время эти таргетные агенты используются для лечения РА. Несмотря на то, что нацеливание на TNF- α является успешной терапевтической стратегией при лечении РА, метотрексат (MTX), не нацеленный на TNF- α , также является эффективным лекарственным средством (313). MTX – это антифолатный препарат, который подавляет синтез пурина и пиримидина и ингибирует репликацию ДНК. Раннее лечение ингибиторами TNF- α в сочетании с MTX, как было показано, значительно улучшает успех при терапии РА (314, 315). В дополнение к агентам, нацеленным на TNF- α , и MTX существует ряд других препаратов для лечения РА разной тяжести, например, абатацепт, ритуксимаб и тоцилизумаб (316).

Другой эффективной биологической мишенью при РА является IL-6. Уровень IL-6 значительно повышен в синовиальной жидкости пациентов с РА. Белок функционирует как провоспалительный цитокин, который непосредственно снижает подавляющую функцию клеток Трег (Рис. 2-20) (317). Кроме того, IL-6 оказывает значительное влияние на превращение Foxp3⁺ CD4 Т-клеток в клетки Th17 (318). Клетки Th17 играют важную роль в патологии РА за счет секреции IL-17. IL-17 обладает способностью активировать ряд клеток, таких как синовиальные фибробласты и моноциты, которые участвуют в повреждении суставов (Рис. 2-19) (319,320). Нейтрализация IL-17 во время реактивации антиген-индуцированного артрита у животных предотвращает воспаление суставов и эрозию кости (321,322). Лекарственным средством, нацеленным на рецептор IL-6, является тоцилизумаб, гуманизированное антитело, которое одобрено в качестве успешной терапии для лечения РА (323). Тоцилизумаб может облегчить симптомы РА, уменьшая численность клеток Th17 и увеличивая количество CD4⁺CD25⁺ Трег в месте воспаления. Фактически, тоцилизумаб корректирует баланс клеток Th17/Трег у пациентов с РА (324).

IL-1 является центральным провоспалительным цитокином, который негативно воздействует на клетки сустава, вызывая тем самым разрушение костей и хрящей. IL-1 является важным фактором патогенеза РА. Человеческий рекомбинантный антагонист рецептора IL-1 (IL-1R α) может блокировать опосредованные IL-1 эффекты и восстанавливать баланс клеток Th17/Трег. Несмотря на недостаточное понимание механизма действия, использование анакинры (человеческого рекомбинантного антагониста рецептора IL-1) для терапии РА является эффективным и безопасным (325).

Клетки Трег синтезируют много CTLA-4, который контролирует их супрессорную функцию (326). CTLA-4 также появляется на поверхности активированных Т-клеток,

однако связывание лигандов вызывает противоположные эффекты в Трег и эффекторных клетках. Например, лигирование CTLA-4 с CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) ингибирует функцию эффекторных клеток, но увеличивает супрессорную активность Трег. CTLA-4-Ig (также известный как абатацепт) представляет собой рекомбинантный белок человека, который состоит из внеклеточного домена CTLA-4 и Fc-части IgG1, и используется для лечения пациентов с РА (326).

Таким образом, исследование фенотипа и функций Трег у пациентов с РА представляет научный и практический интерес, поскольку динамика этой важнейшей популяции супрессорных клеток и уровень эффекторных молекул на их поверхности может служить неинвазивным методом предсказания ответа на определенные типы терапии, а также оценки эффективности этой терапии. В нашей работе мы сфокусировались на анализе субпопуляции Трег периферической крови у пациентов с нелеченым РА, оценили уровень характерных для Трег маркеров у пациентов с различными проявлениями заболевания, в том числе при терапии метотрексатом.

2.16 Заключение

Представленные в обзоре литературе данные свидетельствуют о том, что изучение молекулярных механизмов, определяющих фенотип и функцию Трег, являются актуальной задачей, как с точки зрения фундаментальной науки, так и с практической стороны. Контролируемое изменение активности и числа Трег позволит модулировать хрупкий баланс между нормой, аутоиммунными патологиями и онкологическими заболеваниями, которые ассоциированы с избыточной функцией Трег. Для решения данной задачи необходимо создание физиологически релевантных экспериментальных моделей, которые позволяли бы выключать отдельные гены с целью выяснения их роли исключительно в популяции Трег. Без таких животных моделей невозможно получение прямых однозначных ответов на вопрос о роли отдельных молекул, участвующих в поддержании фенотипа и функций Трег. Для понимания перспектив использования трансплантации этих клеток в медицине важна также оценка стабильности этой популяции. Большая часть настоящей работы посвящена созданию новых линий мышей для выяснения функций отдельных молекул в Трег.

Отдельным вопросом является изменение свойств и активности популяции Трег при аутоиммунных патологиях, например, ревматоидном артрите. Поскольку снижение активности и изменение числа Трег могут быть ассоциированы с тяжестью течения и прогнозом заболевания у пациентов с РА, детальная характеристика циркулирующих Трег

и изменений в этой популяции представляет большой интерес с диагностической точки зрения. Такая характеристика позволит более точно подбирать эффективные схемы лечения пациентов. Вторая часть настоящей работы посвящена исследованию динамики и изменений поверхностного фенотипа популяции Трег больных РА в ходе их лечения метотрексатом.

Наконец, поддержание иммунологического равновесия невозможно без учета взаимодействий клеток паренхимы тканей, стромальных клеток мезенхимного происхождения и фибробластов с клетками иммунной системы. Поэтому последняя часть диссертационной работы рассматривает молекулярные механизмы взаимодействия мезенхимных стромальных клеток человека с активированными Т-клетками, в частности, зависимость иммуносупрессии Т-клеток мезенхимными клетками от молекулы клеточной адгезии ICAM-1.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Лабораторные животные

3.1.1 Мыши для проекта по кондиционному нокауту IL-10

Мыши $Il10^{flox/flox}$ были описаны ранее (327). $Il10^{-/-}$ животные были приобретены в The Jackson Laboratory (США). Мыши $Il10^{flox/flox}$ были на генетическом фоне C57BL/6, а мыши $Foxp3^{YFP-Cre}$, первоначально на смешанном фоне B6/129, подвергались обратному скрещиванию с линией C57BL/6J на протяжении трех-четырёх поколений в процессе получения мышей линии $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$. Всех мышей содержали в специализированном помещении, не содержащем патогенных микроорганизмов в Университете Вашингтона в Сиэттле, в котором были обнаружены виды *Helicobacter*, с ними обращались в соответствии с установленными правилами и инструкциями по уходу за животными и их использованию.

Мыши B6.SJL-Ptprca Pep3b/BoyJ (Ly5.1 + B6) были приобретены в The Jackson Laboratory. $Foxp3^{GFP}$ (22) и ТКРВ-дефицитных мышей размножали в UW и MSKCC. Мыши R26Y были любезно предоставлены доктором Франком Костантини. Селезенки и тимусы мышей $RAG2^{pGFP}$ были любезно предоставлены доктором Памелой Финк. Мыши Thy1.1 и BDC2.5 были получены из модифицированного ядра в Центре JDRF для изучения иммунной толерантности при диабете; мыши линии $Foxp3^{gfp}$ (инсерция кассеты IRES-GFP в локус $Foxp3$) на генетическом фоне NOD и B6 любезно предоставлен доктором Виджаем Кучру. Всех мышей содержали и обслуживали в Вашингтонском университете, MSKCC, Диабетическом центре Джослина и SPF-вивариях Гарвардской медицинской школы в соответствии с принятыми рекомендациями.

3.1.2 Мыши для проекта с кондиционным аллелем $Foxp1$

Мышей содержали в SPF виварии Онкологического центра MSKCC (Нью-Йорк, США) в соответствии с принятыми комитетом MSKCC и IACUC правилами работы с лабораторными животными. Во всех экспериментах, если не оговорено особо, использовали самцов и самок в возрасте 8-10 недель. Конструкция для таргетирования гена $Foxp1$ содержала два набора сайтов для сайт-специфические рекомбинации *in vivo*: (а) для рекомбиназы Flp для удаления гена резистентности к неомицину в зародышевой линии и (б) для рекомбиназы Cre и кондиционного нокаута $Foxp1$. Сайты loxP были расположены по краям экзона 11, вырезание которого должно вызывать делецию части аминокислот и сдвиг рамки считывания. Рекомбинация должна приводить к образованию укороченного белка, лишённого доменов, необходимых для димеризации и связывания ДНК. Мыши

Foxp1^{fl/+} (на смешанном фоне C57BL/6/129) после подтверждения передачи в зародышевой линии скрещивали с мышами C57BL/6 в течение, по крайней мере, пяти поколений. Генотипы *Foxp1^{fl/+}*, *Foxp1^{fl/fl}* определяли с помощью ПЦР-амплификации. Аллель дикого типа идентифицировали по продукту ПЦР длиной 376 п.н., а мутантный аллель *Foxp1* по продукту ПЦР длиной 257 п.н. Мышей *Foxp1^{fl/fl}* скрещивали с трансгенными мышами *Foxp3^{YFP-Cre/+}* для получения *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/+}* самок. Затем этих самок скрещивали с самцами *Foxp3⁺Foxp1^{fl/fl}*. Самок *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}* и *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}*, а также самцов *Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}* и *Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{+/+}* использовали в экспериментах. В экспериментах с опухолями молочной железы мышью *Foxp3^{YFP-Cre/YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}* были использованы в качестве экспериментальных мышей, а мыши *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}* использовались в качестве контрольных животных. Мышей *Foxp1^{fl/fl}* скрещивали с трансгенными мышами *Cd4Cre* для получения *Cd4CreFoxp1^{fl/+}* мышей. Затем их скрещивали для получения гомозигот *Cd4CreFoxp1^{fl/fl}* экспериментальные и контрольных мышей *Cd4CreFoxp1^{+/+}* мыши. *Tcrb^{-/-}Tcrd^{-/-}* мыши и C57BL/6 конгенные мыши *Ly5.1* были приобретены в Jackson Labs, а затем размножены выращены на месте.

3.2. Создание конструкций для таргетирования и трансгенных животных

3.2.1 Создание knock-in аллеля *Foxp3^{YFP-Cre}*

XbaI-фрагмент длиной 7,9 т.п.о. локуса *Foxp3*, содержащий экзоны с 6 по 11, клонировали из космиды размером 30,8 т.п.н., содержащей полный ген *Foxp3*, в вектор pBluescript, содержащий селекционную кассету PGK-DTA. Новый уникальный сайт рестрикции SalI заменил сайт BaeI, присутствующий в 3'-UTR гена *Foxp3* перед сигналом полиаденилирования. Для создания целевой конструкции клонировали кассету IRES-YFP-Cre-BGHpA-FRT-Neo-FRT, предоставленную Ричардом Локсли (UCSF), в созданный ранее сайт SalI. Линеаризованную таргетирующую конструкцию электропорировали в клетки ES R1, а устойчивые к неомицину клоны скринировали с помощью ПЦР в области 3'-плеча гомологии для доказательства гомологичной рекомбинации. Положительные клоны дополнительно подвергали скринингу с помощью Саузерн-блота расщепленной BspHI геномной ДНК. Клоны ES-клеток, несущие правильно таргетированный локус *Foxp3*, инъецировали в бластоцисты C57BL/6, и химерное мужское потомство спаривали с трансгенным штаммом мышей с трансгенной рекомбиназой FLPe, чтобы удалить кассету PGK-Neo. Передача зародышевой линии целевого аллеля была подтверждена с помощью ПЦР с геномной ДНК из хвоста.

3.2.2 Создание мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}*

Аллель, включающий *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}*, был получен путем замены кодирующей последовательности YFP-Cre в ранее описанном плазмидном таргетирующем векторе, который использовали для получения аллеля *Foxp3^{YFP-Cre}*, на фрагмент, кодирующий тройной химерный белок eGFP-Cre-ERT2 (220). кДНК Cre-ERT2 (плазида с кДНК любезно предоставлена доктором Пьером Шамбоном) клонировали в одной рамке считывания с кДНК, кодирующей eGFP. Таргетирование в эмбриональных стволовых клетках и получение химерных мышей проводили, как описано ранее (22).

3.3 Методы, использованные в проекте по Трег-специфическому нокауту IL-10

3.3.1 Подтверждение вырезания аллеля *Il10^{flox}* с помощью ПЦР на геномной ДНК

Геномную ДНК из отсортированных Т-клеток выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) и разводили до конечной концентрации 5 нг/мкл в буфере Tris-EDTA (pH 7,4). Последовательные разведения матрицы использовали в ПЦР с двумя парами *Il10*-специфических праймеров: 5'-ACTGGCTCAGCACTGCTATGC-3' и 5'-GCCTTCTTTGGACSTCCATACCAG-3' для выявления аллелей *Il10^{flox}* или *Il10^{wt}*; 5'-CAGGATTTGACAGTGCTAGAGC-3' и 5'-AAACCCAGCTCAAATCTCCTGC-3' для обнаружения аллеля *Il10*, в котором отсутствует вырезанный фрагмент. Чтобы нормализовать количество вводимой ДНК, мы использовали ПЦР с праймерами к гену *Foxp3*: 5'-AGACAGACCAGAGGTGTAGT-3' и 5'-TCCTGGGGATGGGCCAAGGGCCAAGG-3'.

3.3.2 Приготовление одноклеточных суспензий лимфоцитов из легких, толстой кишки и кожи

Перед сбором легкие перфузировали 10 мл PBS и измельчали ножницами. После добавления 10 мл раствора DMEM/5% FCS/коллагеназа D (Roche, 2 мг/мл) и ДНКазы (30 мкг/мл) фрагменты ткани инкубировали при 37°C в течение 30 минут в орбитальном шейкере и собирали центрифугированием. Ресуспендировали в HBSS с 5 mM EDTA и 5% FCS в течение 5 мин при 37°C при встряхивании и фильтровали через сито для клеток с диаметром пор 100 мкм (BD Biosciences). Клетки дважды промывали PBS, а затем использовали для окрашивания антителами и проточной цитометрии. Содержащая кишечные лимфоциты клеточная суспензия была приготовлена в соответствии с модифицированным протоколом (329). Содержащие лимфоциты клеточные популяции выделяли из кожи уха, как описано (330).

3.3.3 Выделение (сортировка) клеток и проточно-цитометрический анализ клеток, анализ продукции цитокинов

Клеточные популяции очищали с помощью магнитных шариков и сортировщика магнитных клеток AutoMACS (Miltenyi Biotec) или с помощью флуоресцентного сортировщика клеток FACS Aria и FACS Aria II (BD Biosciences). Чистота всех клеточных препаратов составляла >90%. Проточно-цитометрический анализ проводили с помощью проточных цитометров LSR II (BD Bioscience) и FACSCanto (BD Biosciences). Использовали конъюгированные с флуорохромом антитела к мышинным маркерам. Клетки окрашивали следующими непосредственно конъюгированными антителами: анти-CD4 (RM4-5), анти-CD62L (MEL-14), анти-CD44 (IM7), анти-CD45.1 (A20), анти-CD45.2 (104), анти-CD103 (2E7), анти-CD25 (PC61.5), анти-CD8 (53-6.7), анти-CTLA-4 (UC10-4B9), анти-GITR (YGL-386), анти-ICOS (7E.17G9), анти-CXCR3 (CXCR3-173), анти-Foxp3 (FJK-16s), анти-IFN- γ (XMG1.2), анти-IL-2 (JES6-5H4), анти-TNF α (MP6-XT22), анти-IL-17 (eBio17B7 или TC11-18H10.1 от Biolegend), анти-T-bet (4B10) (все из eBioscience) и Ki-67 (B56) (BD Pharmingen). Проточно-цитометрический анализ продукции цитокинов проводили, согласно протоколу (28). Для анализа секреции IL-10 клетки высевали в круглодонные планшеты в количестве 5×10^5 клеток/мл в 0,2 мл RPMI/10% FCS. Клетки LPL стимулировали *in vitro* PMA (100 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл) в течение 4 часов в присутствии Golgi Plug (BD Pharmingen). Спленциты стимулировали связанными с чашками антителами CD3 и CD28 (1 мкг / мл каждый) в течение 72 часов в присутствии rhTGF- β 1 (2 нг/мл) и IL-2 (100 ед/мл) и повторно стимулировали в течение 4 часов с помощью PMA и иономицина (50 нг/мл и 500 нг/мл соответственно) в присутствии Golgi Plug. Стимулированные и нестимулированные контрольные клетки окрашивали антителами к CD4, FoxP3 и IL-10 в соответствии с протоколом производителя (eBioscience).

3.3.4 Гистопатологическая оценка спонтанного колита

Образцы тонкой, слепой и толстой кишки от 3-4 животных на группу фиксировали в 10% нейтральном формалине, после чего использовали для стандартного окрашивания парафиновых срезов гематоксилином и эозином. Гистологическую оценку колита в слепой кишке, проксимальной и средней ободочной кишках выполняли, как описано ранее (331), за исключением того, что в анализ был включен тонкий кишечник. Патолог, которому неизвестен генотип животных, с помощью шкалы 0–4 оценивал изменения слизистой оболочки (эрозия, изъязвление и/или гиперплазия), воспаление и степень поражения среза. Показатель воспалительного заболевания кишечника (IBD) был получен из суммы баллов отдельных срезов.

3.3.5. Индукция аллергического воспаления легких, оценка функции и гистопатология легких

Мыши получали две i.p. инъекции 100 мкг OVA (Pierce Chemical Co.) в комплексе с осадком, полученным при титровании щелочью раствора алюмокалиевых квасцов (Alum, Sigma-Aldrich) в 0,2 мл в дни 1 и 14. Мышей анестезировали путем введения 130 мг/кг кетамина и 8,8 мг/кг ксилазина в физиологическом растворе перед интраназальным введением 100 мкг OVA (0,05 мл; 2 мг/мл) на 14-й день и 50 мкг OVA (0,05 мл; 1 мг/мл) на 25-й день (332, 333). Контрольные группы мышей получали 0,2 мл физиологического раствора свежесосажденного гидроксида алюминия без OVA в дни 1 и 14, и 0,05 мл физиологического раствора в дни 14 и 25. Для выделения клеток БАЛ правое легкое трижды промывали 0,5 мл физиологического раствора через 24 часа после заключительной обработки OVA, и клетки анализировали, как описано (332). Чтобы оценить легочную функцию, проводили инвазивную легочную плетисмографию у мышей в ответ на метахолин, как описано ранее (332,334), за исключением того, что грудная клетка не была открыта. Оценка патологии легких проводилась слепым способом, как описано ранее (335).

Тотальную РНК выделяли из правого легкого с помощью мини-набора RNeasy (QIAGEN), и количество мРНК для IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ и GAPDH определяли методом количественной ПЦР на приборе 7900HT (Applied Biosystems). Для конструирования всех праймеров использовали программное обеспечение Primer 3 для интронных последовательностей. Размеры продукта ПЦР \sim 100 п.н. были подтверждены гелем электрофорезом.

3.3.6. Кожно-контактная реакция гиперчувствительности

Гиперчувствительность кожи индуцировали, окрашивая выбритый живот 100 мкл 0,5% (вес/объем) динитрофторбензола (DNFB; Sigma-Aldrich) в смеси ацетона и оливкового масла 4:1 для сенсibilизации. Через 6 дней мышей повторно обрабатывали DNFB путем нанесения 10 мкл 0,2% (вес/объем) DNFB в оливковом масле на каждую сторону одного уха. Толщину уха определяли с помощью штангенциркуля (Mitutoyo) до заражения и через 48 часов после обработки. Процент увеличения толщины уха сравнивали для разных экспериментальных групп с помощью t-критерия Стьюдента для независимых образцов (327). Образцы ушей после измерения толщины фиксировали, помещая в формалин, для характеристики гистопатологических изменений после окрашивания гематоксилином/эозином.

3.4 Методы, использованные в проекте по изучению стабильности Трег

3.4.1 Обработка тамоксифеном, нейтрализация IL-2 и кросс-сшивание CD40

Тамоксифен (Sigma) растворяли в оливковом масле (Fluka) до конечной концентрации 40 мг/мл при умернном нагревании (50°C). Мышам вводили три дозы тамоксифена (8 мг каждая) в дни 0, 1 и 3 перорально через желудочный зонд, животных анализировали на 14 день или позже после начала обработки тамоксифеном. В некоторых экспериментах у мышей удаляли тимус (проводили тимэктомию) две недели до введения тамоксифена. Для индукции блокады IL-2 мышам, получавшим тамоксифен, вводили внутривенно 1 мг крысиного mAb к IL-2 мыши (клон S4B6, BioXCell) (328) или 1 мг тотальных крысиных IgG (Caltag) (контроль) и анализировали через 9 дней. Th1-ответы у мышей, получавших тамоксифен, были индуцированы внутривенными инъекциями 25 мкг агонистического крысиного mAb к CD40 мыши (клон FGK45) в дни 0, 2 и 4 (BioXCell) или контрольного крысиного IgG (Caltag), как описано (328). Мышей анализировали через 14 дней и 5 месяцев после первой инъекции.

3.4.2 Инфекция *Listeria monocytogenes*

Мышей заражали внутривенно суспензией *Listeria monocytogenes* (LM) (3000-5000 КОЕ на мыш) и анализировали через 9 дней. Для LM-специфической повторной стимуляции спленоциты от инфицированных мышей инкубировали в присутствии 10⁻⁶M пептида LLO190-201 (NEKYAQAYPNVYCS) и реактива GolgiBlock (BD Bioscience, в рекомендованном производителем концентрации) в течение пяти часов при 37°C в CO₂-инкубаторе. Продукцию IFN- γ и IL-17 оценивали с помощью окрашивания специфическими антителами фиксированных параформальдегидом и обработанных пермеабиллизующим раствором клеток и последующей проточной цитофлуориметрии.

3.4.3 Распад мРНК *in vitro*

Для оценки скорости распада мРНК, отсортированные с помощью FACS Т-клетки инкубировали в 96-луночных планшетах с плоским дном в течение 0, 1 и 2 часов при 37°C, 5% CO₂ в присутствии 5 мкг/мл актиномицина D (Sigma). РНК выделяли с использованием TRIzolR (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя, а кДНК (первую цепь) синтезировали с использованием тотальной РНК в качестве матрицы со случайными гексамерными праймерами и SuperMix (SuperScript III, Invitrogen). Относительное содержание кДНК Foxp3 измеряли с помощью кПЦР. Последовательности праймеров ПЦР в реальном времени, комплементарные экзону 11 гена Foxp3 и HPRT: hprt 5'-

agctactgtaatgatcagtcacag и 5'-agaggtcctttcaccagca; Foxp3 Exon 11 5'-acatgaagagcctgccttggtaca и 5'-tggtccagatgtgtgggtgagt.

3.4.4 Адоптивный перенос Т-клеток

Для адоптивных переносов клетки GFP+CD4+ Трег из мышей Ly5.2 + *Foxp3^{GFP}* или *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* xR26Y дважды сортировали с помощью FACS (чистота > 98%).

Ly5.1+ CD4+ Т-клетки выделяли из мышей C57/B6 с использованием магнитных шариков (Invitrogen). 3×10^5 Ly5.2+GFP+ Трег и $1,5 \times 10^6$ Ly5.1+ CD4+ Т-клеток инъецировали внутривенно в ТКР-дефицитных мышей-реципиентов. Ly5.2+ Т-клетки анализировали на предмет уровня Foxp3 через три недели после переноса. Для анализа индукции клеток Трег *in vivo* клетки GFP-CD4+CD62L^{low} и GFP+CD4+ сортировали из мышей Ly5.2+Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} xR26Y и совместно переносили с клетками GFP+CD4+ или GFP-CD4+, соответственно, которые были выделены с помощью FACS из мышей Ly5.1+Foxp3^{GFP} (чистота > 98%). 5×10^5 GFP + Трег-клеток и $1,5 \times 10^6$ GFP-CD4+ Т-клеток инъецировали внутривенно в ТКР-дефицитных реципиентов, которых обрабатывали тамоксифеном через две недели после переноса. Ly5.2+ Т-клетки анализировали на YFP и Foxp3 через шесть недель после переноса. Для адоптивных переносов в линию мышей, склонную к развитию спонтанного диабета, $1-2 \times 10^5$ CD4+GFP+ клеток из мышей NOD.*Foxp3^{gfp}*.BDC2.5 дважды сортировали (чистота > 99%) и переносили внутривенно в сингенных 12-недельных мышей-реципиентов NOD.Thy1.1. Анализ поджелудочной железы, селезенки и лимфатических узлов поджелудочной железы проводили через 4 недели после переноса. Thy1.2 донорские клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на GFP и, после внутриклеточного окрашивания, на экспрессию IFN- γ , IL-17A или FoxP3. Для модели артрита $1-2 \times 10^5$ CD4+GFP+ клеток были выделены из мышей линии K/BxN.*Foxp3^{gfp}*, дважды отсортированы и перенесены внутрибрюшинно 20-дневным мышам линии K/BxN.CD45.2. Ткани собирали у 35-дневных реципиентных мышей K/BxN, когда были обнаружены явные признаки клинического артрита, о чем свидетельствует утолщение лодыжек и передних лап. Донорские клетки CD45.1+ /CD45.2+ анализировали на GFP или внутриклеточную экспрессию IL-17A.

3.5 Методы, использованные для проекта по Трег-специфическому нокауту Foxp1

3.5.1 Ответ на IL-2 *ex vivo*

Для измерения ответа Трег на IL-2 наивные CD62L+ Трег выделяли из лимфоидных органов и помещали в круглодонные 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток на лунку в среде RPMI с 10% FBS и инкубировали с IL-2 в различных концентрациях в течение

15 мин при 37°C. Клетки подготавливали для анализа с помощью проточной цитометрии в соответствии с методикой BD Phosflow для мышинных спленоцитов (BD Biosciences). Клетки окрашивали антителами анти-STAT5 (p-Y694) (BD Biosciences).

3.5.2 Оценка спонтанного апоптоза *ex vivo*

Для определения пропорции Т-клеток в состоянии апоптоза, суспензии клеток селезенки, лимфоцитов и лимфоцитов из брыжеечных лимфатических узлов в количестве 1×10^6 клеток окрашивали аннексином V и 7-AAD в буфере для окрашивания аннексином по инструкции производителя (BD Biosciences).

3.5.3 Мечение клеток реагентом CellTrace и культивирование меченых клеток

YFP+ Трег или наивные CD62L+CD4+ клетки выделяли с помощью FACS-сортирования из пулированных селезенок и лимфатических узлов мышей с генотипом $Foxp3^{YFP-CreFoxp1^{+/+}}$, $Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}$ и $Cd4CreFoxp1^{fl/fl}$ дважды промывали PBS и инкубировали 10 минут при 37°C при плотности 1×10^7 клеток на мл в PBS с добавлением 1 мкМ реагента CellTrace Violet (Invitrogen), а затем промывали средой RPMI с сывороткой. Меченые флуоресцентным красителем клетки культивировали 7 дней в присутствии или без рекомбинантного IL-7 (3 нг/мл; R&D systems) в полной среде RPMI при 37°C. Профили распределения реагента CellTrace по клеткам, выживаемости и поддержания синтеза CD4 или Foxp3 анализировали методом проточной цитометрии на день 7.

3.5.4 Культивирование клеток с IL-2

Суспензии клеток, приготовленные из селезенок и лимфатических узлов мышей, инкубировали в полной среде RPMI при 37°C в течение 24 ч в присутствии IL-2 человека (500 ед./мл; NIH). Жизнеспособность Трег и уровни CD25, CTLA-4, Foxp3 и SATB1 определяли с помощью проточной цитометрии.

3.5.5 Эксперимент по определению супрессорной активности *in vitro*

CD4+ Т клетки (4×10^5) выделяли из $Foxp3^{GFP-DTR}Ly5.1$ и инъецировали вместе с YFP+ Трег (1×10^5), полученными из $Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}$ или $Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{+/+}$ мышей, в кровотоки реципиентных без-Т-клеточных мышей. Реципиентам вводили дифтерийный токсин в дни 0, 1, а затем каждые 4 дня после пересадки клеток. Измеряли вес животных в течение всего эксперимента, по окончании которого анализировали лимфоидные и не-лимфоидные органы.

3.5.6 Секвенирование РНК

Клетки Трег CD44^{hi} или CD62L^{hi} YFP⁺ Foxp1⁺ или Foxp1⁻ выделяли с помощью прямой FACS-сортировки из мышей *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}* и *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}* в пробирки с реагентом TriZol LS (ThermoFisher), объем образцов выравнивали после сортировки. До экстракции РНК образцы хранили при температуре -80°C. Суммарную РНК выделяли согласно инструкции и определяли ее количество и качество с помощью инструмента Agilent BioAnalyzer. Затем проводили ПЦР-амплификацию образцов по технологии SMARTer на протяжении 12-16 циклов. Библиотеки кДНК готовили, используя метод спаренных концов Illumina TruSeq по методике производителя. Секвенирование осуществляли с помощью прибора Illumina HiSeq 2500 со средней глубиной чтения 30 миллионов ридов длиной 50-п.о. на образец.

3.5.7 Иммунопреципитация хроматина и секвенирование

Выделенные с помощью FACS-сортировки популяции клеток (2x10⁶ клеток для ChIP-seq Foxp3; 6x10⁶ клеток для ChIP-seq Foxp1) обрабатывали 1% параформальдегидом в PBS в течение 10 минут при 21°C. Реакцию останавливали добавлением 125 мМ раствора глицина. Сшитые параформом клетки лизировали, высвобожденные ядра ресуспендировали в буфере для лизиса ядер, содержащем 1% SDS. Клетки озвучивали в три подхода 10x30 секунд с помощью Bioruptor (Diagenode) в условиях высокой мощности. Озвученные образцы разбавляли буфером для лизиса ядер до концентрации SDS 0,1%. Образцы осветляли путем добавления магнитных шариков, покрытых белком A/G (Pierce), и перемешивания в течение 1 ч при 4°C. 5% (по объему) осветленных образцов ДНК сохраняли как «input». Образцы хроматина инкубировали ночь при 4°C при перемешивании с поликлональными антителами к Foxp3 (лаборатория Руденского) или Foxp1 (EMD Millipore ABE68). Иммунные комплексы инкубировали с магнитными шариками, покрытыми белком A/G, в течение 1 ч при 4°C и перемешивании. Осажденные иммунокомплексы промывали буфером (для лизиса ядер), ДНК осажденного хроматина и образцов input отделяли от пришитых к ним белков с помощью обработки протеиназой К при 65°C, фрагменты ДНК выделяли из смеси, используя Qiagen PCR purification kit. Очищенную ДНК подготавливали к секвенированию с помощью Illumina HiSeq 2500 и получали в среднем 30 миллионов ридов длиной 50 п.о. на образец.

3.5.8 Биоинформатический анализ

Геномные данные. Для всех выравниваний ридов использовали версию сборки мышиного генома mm10.GRCm38. Аннотацию генов из базы Ensembl (*Mus musculus*

GRCm38.83) применяли для всех видов биоинформатического анализа. Если не оговорено особо для всюду при анализе использовали пакет самообучающихся программ R v3.4.0.

RNA-seq. Положение ридов в геноме мыши определяли с помощью программы HISAT2 v2.0.1-beta49, используя параметры по умолчанию, в том числе по положению сайтов сплайсинга, полученным из геномных данных. Однозначно выровненные риды экстрагировали используя команду «grep» с параметрами ‘-v ‘NH:i:[2–9]’ и SAMtools v1.250 с параметрами ‘view -h -F 4 -q 20 -b’, а также сортировку и индексирование с помощью SAMtools. Для анализа RNA-seq образцов наивных или активированных Foxp1+ или Foxp1– Трег, риды сравнивали с генами, полученными с помощью алгоритма Rsubread v1.22.351 на языке R v3.3.0. Обсчет ридов для RNA-seq образцов наивных и активированных Tconv и Трег проводили с помощью версии R3.4.0, Rsubread v1.26.0. Дифференциальную экспрессию генов между сравниваемыми парами популяций клеток определяли с помощью DESeq2 v1.16.152, при дефолтных установках FDR для значений параметра P при множественной проверке гипотез. Различия в экспрессии всего 1091 гена были признаны существенными при сравнении популяций наивных Foxp1+ и Foxp1– Трег, при сравнении активированных Foxp1+ и Foxp1– Трег 2,353 были признаны различающимися по экспрессии (скорректированный по FDR $P < 0.01$), в сумме в обоих выборках был 2,881 ген с дифференциальной экспрессией в Foxp1+ и Foxp1– Трег. Для визуализации в виде «тепловых» карт и для кластерного анализа, значения счета для ридов (площадь пиков) переводили в логарифмический вид (с помощью логарифма степени 2 (count +1), и вычисления значений z трансформированных значений в каждом ряду. Кратность изменения значений \log_2 использовали для создания графиков кумулятивного распределения на рис. 4-30e, используя профили экспрессии характеристических генов, уровень которых возрастает или, наоборот, снижается в STAT5-зависимой манере. Гены, уровень транскрипции которых сильно возростал (163) или снижался (108) в Трег с STAT5bCA, по сравнению с контрольными Трег, определяли как экспрессируемые гены с разницей в значении параметра $\log_2\text{fold}$ не менее 1 и с скорректированным с помощью FDR $P \leq 0.05$ (GSE84553).

ChIP-seq. Наборы данных ChIP-seq для факторов транскрипции Foxp3 и Foxp1 были получены для Foxp1+и Foxp1– Трег а также наивных Foxp1+ Tconv клеток (описано в разделе *Иммунопреципитация хроматина и секвенирование*). Риды выравнивали против иышиного генома с помощью программы Bowtie2 v2.2.5o53 с параметрами ‘–no-unal -X 500 –no-mixed –no-discordant’. Риды с однозначными выравниваниями экстрагировали с помощью SAMtools v1.1 и параметров ‘view -h -bS -F 4 -q 20’, их сортировали и

индексировали, применяя SAMtools. Для определения положения пиков применяли пакет MACS2 v2.1.1.2016030954 и параметры '-f BAM -B -SPMR -g mm -p 0.1 --keep-dup 'auto' --call-summits'. Для Foxp1 анализировали образцы ChIP-seq пулированных Foxp1+ Treg и Foxp1+ Tconv от нескольких мышей, при этом образцы Foxp1- Treg служили контролем. В результате получили список из 55,265 предполагаемых пиков, расположенных на стандартном наборе хромосом (chr1–chr19, chrX, chrY, chrM), с учетом пиков, содержащих несколько вершин. Средняя длина фрагмента для ChIP-seq составила по оценке MACS2 198 п.о. Для получения пиков с существенным покрытием в Treg, ряды ChIP-seq из каждого образца Foxp1+ Treg и из пулированных контрольных образцов выделяли среди предполагаемых пиков с помощью Rsubread v1.26.0, после чего к этой выборке применяли DESeq2 v1.16.1 с уточненными по FDR значениями *P* values для множественной проверки гипотез. Для оценки факторов размера образцов к рядам из тех же образцов применяли DESeq2 для анализа районов, расположенных по краям предполагаемых пиков, определяемых путем сдвига предполагаемого пика на 2 килобазы влево и вправо, и рассматривая только те фланкирующие области, которые не перекрываются с исходными предполагаемыми пиками. Значения изменения параметра log2fold значений ChIP-seq для Foxp1 ChIP по сравнению с контролем оценивали, используя факторы размера образцов на графиках рис. 4-23 *d,e*; 4-24*a*. Этот анализ выявил 3,071 пик для Foxp1 в Treg cells при использовании MACS2 и $q < 0.05$, а также DESeq2 FDR < 0.01 , в результатах которого было 4,619 пиков. Такая же процедура была применена к каждому образцу из клеток Foxp1+ Tconv и объединенного контроля, что привело к выявлению 1,088 пиков Foxp1 в клетках Tconv. Из 3,071 пика Foxp1 в Treg, 881 пик присутствовал среди 1,088 пиков Foxp1 клетках Tconv. Однако среди этих 3,071 пика Foxp1 в Treg, 2,521 пиков были идентифицированы как пики Foxp1 в клетках Tconv при сниженных пороговых значениях (MACS2 $q < 0.05$ и DESeq2 FDR < 0.1), в то время как 550 присутствовали только в Treg. Из 1,088 пиков Foxp1 в Tconv, 1,049 были также найдены как Foxp1 пики в Treg при сниженном пороге (MACS2 $q < 0.05$ и DESeq2 FDR < 0.1), в отличие от остальных 39.

Аналогичная процедура для определения пиков была применена к пулированным образцам ChIP-seq Foxp3 ChIP-seq Foxp1+ и Foxp1- Treg, результаты Foxp3 ChIP-seq в Foxp1+ и Foxp1- наивных клетках Tconv использовали в качестве контроля. Этот анализ выявил 141,556 предполагаемых пиков Foxp3 на стандартных хромосомах, расчетная длина фрагмента ChIP-seq составила также 198 п.о. Аналогичная описанной выше процедура анализа значимости покрытия пиков ChIP-seq была применена к каждому из образцов Foxp3 ChIP-seq из Foxp1+ Treg и пулированным контрольным образцам. Оценка изменения

параметра $\log_2\text{fold}$ значений ChIP-seq для Foxp3 ChIP по сравнению с контролем с помощью данной процедуры использовали для построения графиков на рис. 4-23 d,e, 4-24a. Эта процедура дала 7,174 пиков Foxp3 в Foxp1+ Treg при MACS2 $q < 0.05$ и DESeq2 $\text{FDR} < 0.01$, у которых было 13,997 вершин. Применение такой же процедуры к каждому образцу Foxp3 ChIP-seq из Foxp1- Treg и пулированных контрольных образцов позволило выделить 3,935 пиков Foxp3 в Foxp1- Treg. Пики связывания только Foxp3 были определены как часть из 7,174 пиков Foxp3 в Foxp1+ Treg, которые не перекрывались с 55,265 предсказанными пиками Foxp1. Это привело к идентификации всего 1,101 пика связывания исключительно Foxp3, в которых было 1,956 вершин. Пики только Foxp1 были определены как те из 3,071 пика Foxp1 в Treg, которые не перекрываются ни с одним из 141,556 предполагаемых пиков Foxp3. Это привело к выявлению всего 54 пиков связывания только Foxp1, содержащих 66 вершин. Каждый пик был ассоциирован с ближайшим геном в соответствии с расстоянием в геномных координатах, если она не превышала 20 т.п.о. Пики на расстоянии менее 2 т.п.о. от точки начала транскрипции любого аннотированного транскрипта классифицировали как пики в промоторе, остальные пики причислили к экзонным при перекрывании с экзонами любого аннотированного транскрипта. Остальные пики причислили либо к интронным, если они попадали в тело описанного гена, либо межгенными, если они были расположены ближе, чем 20 т.п.о от гена. Те пики, которые не попали ни в одну из перечисленных категорий остались неклассифицированными.

Была проведена кластеризация по методу k -средних данных RNA-seq связанных с Foxp1 генов, которые были дифференциально экспрессированы в неивных Foxp1+, по сравнению с Foxp1- Treg, или в активированных Foxp1+, по сравнению с Foxp1- Treg (всего 661 ген), с помощью функции $k\text{means}$ в языке R. Анализ онтологии генов провели с помощью GOstats v2.44.0 и GO.db v3.5.0 в языке R. Для значимых пиков Foxp3 в Foxp1+ и Foxp1- Treg применили протокол DESeq2 к счету ридов для всех образцов Foxp1+ и Foxp1- Treg. Факторы размеров библиотек были оценены, используя счет ридов в областях, примыкающих к пикам, как описано выше, и были получены сбалансированные оценки. Затем факторы размера библиотек использовали для каждого образца в анализе счета ридов в актуальных пиках. При значениях $\text{FDR} < 0.1$ были идентифицированы 38 пиков (ассоциированных с 20 уникальными генами) с более сильным сигналом Foxp3 ChIP-seq в Foxp1- Treg и 94 пика (связанных с 53 генами) в которых был более сильный сигнал Foxp3 ChIP-seq в Foxp1+ Treg. Информация по всем генам с существенными различиями экспрессии, связанные с этими 94 пиками была использована для создания «тепловых» карт на рис. 4-25a. Для построения графиков на рис. 4-24b использовали значения изменения

параметра $\log_2\text{fold}$ значений Foxp3 ChIP-seq в Foxp1- Трег, по сравнению с Foxp1+, рассчитанные в соответствии с описанным ранее методом. В качестве контроля на рис. 4-24b, использовали изменение $\log_2\text{fold}$ величин сигнала Foxp3 ChIP-seq в областях, примыкающих к пикам. В качестве дополнительного контроля применяли изменения $\log_2\text{fold}$ значений сигнала Foxp3 ChIP-seq в пиках доступности хроматина. Для этого объединили данные по ATAC-seq образцов из базы GEO (GSE83315)²². Их сличили с геномом и провели поиск пиков так же, как было описано для ChIP-seq. Это привело к выявлению 101,224 пиков доступности при использовании MACS2 $q < 0.01$. В сумме 98.9% найденных нами значимых пиков Foxp3 (как в Foxp1+ так и в Foxp1- Трег) перекрывались с пиками, полученными при анализе данных ATAC-seq. Мотивы в последовательностях, расположенных не далее 150 п.о. от вершин пиков были идентифицированы *de novo* с помощью программы HOMER50 и скрипта findMotifsGenome.pl с параметрами ‘mm10 -p 1 -size given -len 6,8,10,12 -noknown -mset vertebrates’. Для Foxp3, 20 мотивов были идентифицированы, как существенно обогащенные в областях рядом с пиками, 17 были идентифицированы для Foxp1. Для идентифицированных мотивов определили позицию относительно вершины пиков с помощью FIMO55 и параметров ‘-no-qvalue -verbosity 1 -max-strand -thresh 0.01’. Все варианты наиболее значимых мотивов (по данным анализа HOMER) с FIMO $P < 2 \times 10^{-4}$ показаны на рис.4-23. Обогащения мотивами связывания белков семейства Runx пиков связывания Foxp1 не обнаружено. Мы идентифицировали все возможные варианты мотива forkhead в пиках Foxp3 и сравнили число пиков, с более чем двумя мотивами с рандомизированным числом. Для каждой рандомизации мы поместили одинаковое число мотивов в такое же число пиков, причем распределение каждого мотива было равномерным по всем пикам. Мы повторили эту рандомизацию 10000 раз и вычислили ожидаемое число пиков, в которых мотив появляется два или больше раз. Реальное число пиков с двумя или более мотивами forkhead было не выше того, которое предсказано с помощью вероятностной оценки.

Статистический анализ. Все виды статистического анализа (в том числе RNA-seq и ChIP-seq) проводили в программе Prism7 (GraphPad Software). Различия между индивидуальными группами анализировали с помощью непарного двухпараметрического t-теста Стьюдента. *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; ****, $P \leq 0.0001$. Если нет *, разница не является статистически достоверной ($P > 0.05$). Величина столбцов ошибок показана как s.e.m. относительно средней величины.

3.6 Материалы и методы проекта по МСК

3.6.1 Материалы для проекта по МСК

Использовали следующие материалы: L-NMMA 1 мМ (Sigma), 1-МТ (Sigma), антитела к белкам человека ICAM-1 SC-107L (Santa Cruz), IDO (H-110 sc-25808, Santa Cruz), iNOS (пептид 781-798), клон 2D2-B2, MAB9502, R & D Systems), CD28 NA/LE (BD 555725), CD3 NA/LE (BD 555336), CD4 (558116, BD PharMingen), CD25 (555346, BD PharMingen), CD45 (304026, BioLegend), CD3 (300431, BioLegend), CD90 (328110, BioLegend), CD73 (344006, BioLegend), HLA-DR (307610, BioLegend), мембрана для культивирования Transwell (Greiner 665640), реагент TRIzol® (Invitrogen, 15596-018), CyQUANT®NF (C35006, Invitrogen), мастер-микс Maxima SYBR Green/ROX qPCR (2X) (K0221 Thermo Scientific), обратная транскриптаза SuperScript® III (Thermo Scientific), хемилюминесцентный субстрат SuperSignal™ West Pico (34078 Thermo Scientific).

Все доноры были уведомлены и согласились принять участие в исследовании в соответствии с пунктами б (b и c) Декларации о биоэтике и правах человека (REV SHS/EST /05/CONF.204/3). Все операционные процедуры и протоколы строго соблюдались в соответствии с правилами комитета по биоэтике МГУ. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с правилами GLP, подписанными Министерством здравоохранения (приказ № 267 от 19 июня 2003 года).

3.6.2 Выделение МСК из жировой ткани

МСК выделяли из подкожного жира человека путем расщепления коллагеназой (336). Измельченную жировую ткань инкубировали с равным объемом раствора коллагеназы типа I/диспазы (200 ед/мл коллагеназы, Worthington Biochemical M8M10816, 40 ед/мл диспазы, BD Biosciences 354235, растворенных в DMEM/F12 (HyClone) без добавок) в течение 30–45 минут при 37°C. После центрифугирования (200g) осадок ресуспендировали в 10 мл DMEM/F12 с добавлением 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2 мМ глутамина, 1 мМ пирувата натрия и 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) (стандартная культура). Суспензию высевали при плотности 50000 фрагментов ткани/мл, и среду меняли, когда клетки достигали 70% конфлюэнтности. После выделения МСК анализировали на поверхностные маркеры CD90, CD73, CD105 и CD45, используя соответствующие моноклональные антитела и проточную цитометрию.

3.6.3 Выделение и активация лимфоцитов

25–50 мл венозной крови здоровых доноров помещали в стерильные пробирки, содержащие раствор ЭДТА (1,5 мг/мл крови, pH 7,2). Лейкоциты выделяли центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 г/мл, Pharmacia Biotech). Лимфоциты активировали путем инкубации с раствором фитогемагглютинаина (10 мкг/мл, Sigma) в течение 6 часов или антителами к CD3 человека (НТ3а 1 мкг/мл, BD Biosciences) и CD28 человека (CD28,2 0,5 мкг/мл, BD Biosciences), предварительно сорбированными на поверхности пластика, в течение 48 часов в DMEM/F12 с 10% сыворотки.

3.6.4 Анализ пролиферации лимфоцитов

Набор для анализа пролиферации клеток CyQUANT®NF (Invitrogen) использовали для измерения способности hASC ингибировать пролиферацию лимфоцитов. Смешанные культуры hASC и активированных лимфоцитов инкубировали двумя различными способами: контактным (прямое взаимодействие между hASC и Т-клетками) и бесконтактными (transwell, клетки не соприкасаются друг с другом, но могут обмениваться растворимыми факторами)., Время инкубации составило 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Лимфоциты собирали, осаждали центрифугированием, а затем ресуспендировали в 1X растворе Хенкса перед добавлением реагента CyQUANT®NF и пермеабилizующего раствора для проницаемости для определения базового уровня сигнала. Образцы хранили в темноте в течение 1 часа при 37°C. Флуоресценцию измеряли при 530 нм с использованием спектрофотометра Zenyth 3100 (Anthos). Нестимулированные лимфоциты использовали для построения калибровочной кривой.

3.6.5 Ингибиторный анализ

Для измерения уровня кинуренина использовали набор для конкурентной ELISA на кинуренин (BA E-2200 LDN). Супернатанты культур, к которым добавляли 1 мМ ингибитор IDO, 1-метил-DL-триптофан или контрольный растворитель (DMCO), переносили в 96-луночный планшет с адсорбированным ацилированным конкурирующим антигеном. Уровни кинуренина рассчитывали путем измерения оптической плотности при 405 нм и сравнения значений оптической плотности с эталонной кривой, построенной с использованием стандартного раствора, предоставленного производителем. Все результаты были нормализованы по значениям уровня кинуренина в супернатантах культур hASC без добавления лимфоцитов.

Для измерения уровня NO использовали колориметрический набор для анализа оксида азота (K262-200, Biovision). Супернатанты смешанных культур, инкубированные с или без 1 мМ ингибитора iNOS NG-монометил-L-аргинина, инкубировали с нитратредуктазой для превращения всех нитратов в нитрит. После инкубации с реактивом Грисса измеряли оптическую плотность при 540 нм. Значения абсорбции были нормализованы для контроля значений, полученных для супернатантов hASC.

3.6.6 ОТ-ПЦР

Клетки растворяли в 800 мкл TRIzol (Invitrogen) и инкубировали в течение ночи при 4°C до стандартного выделения РНК. Образцы РНК, обработанные ДНКазой I (EN0521 Thermo Scientific, 37°C, 20 мин), использовали для обратной транскрипции с помощью SuperScript III (Invitrogen). ОТ-ПЦР проводили с использованием 2X Maxima SYBR Green / ROX Master Mix (Thermo Scientific), содержащего 10 мМ dNTP с dUTP, ДНК-полимеразу AmpliTaq Gold® (5000 ед/мл), краситель SYBR Green I и пассивным внутренним эталон. Накопление продуктов ПЦР регистрировали с использованием DTprime Thermal Cycler DT96 в режиме реального времени (ДНК Технология). Последовательности праймеров для ПЦР перечислены в дополнительном материале, доступном в Интернете по адресу <https://doi.org/10.1155/2017/6516854>.

3.6.7 Вестерн-блоттинг

Белковые экстракты разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, GE Healthcare) с использованием системы Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями производителя. Мембрану инкубировали с первичными антителами против IDO 1: 700 (sc25808), iNOS 1: 500 (aa 781-798, Clone 2D2-B2, MAB9502, R&D Systems). После промывки мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами. Сигналы были нормализованы против винкулина (поликлональные антитела CST #4650) для IDO, против GAPDH (CST 14C10# 2118) в случае iNOS. Для iNOS использовали контрольные лизаты эндотелиальных клеток пупочной вены человека (hUVEC), инкубированные с 25 нг/мл HGF или VEGF в течение 20 часов. Вторичные антитела были любезно предоставлены доктором Франческо Блази (IFOM-IEO). Белковые полосы визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата West Pico (Thermo Scientific).

3.6.8 Анализ данных

Анализ данных проводили в программе Prism GraphPad 5.0 и Statsoft Statistica 6.0. Данные были представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для анализа нормальности был выполнен тест Колмогорова-Смирнова. Для непараметрических данных был проведен ранговый тест Крускала-Уоллиса ANOVA. Для парного анализа (активированные, не активированные лимфоциты) проводили U-тест Манна-Уитни.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

3.7 Методы, использованные в проекте по РА

3.7.1 Пациенты и лечение метотрексатом

В исследовании приняли участие 45 пациентов с ранним не-леченным РА (критерии ACR / EULAR 2010, мониторинг и лечение в Научно-исследовательском институте ревматологии им. В.А. Насонова, Москва, Россия). Клинические и основные иммунологические характеристики пациентов представлены в дополнительной таблице 1. Большинство пациентов – это женщины среднего возраста, с ранним или очень ранним РА (медиана продолжительности заболевания 5 месяцев) ревматоидный фактор (RF) и анти-CCP IgM-положительный, имели острое воспаление, рентгенологические стадии I и II, функциональный класс I). До участия в исследовании пациентов не лечили нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП) и глюкокортикоидами. Все пациенты получали подкожный метотрексат (Methoject) в качестве первого НПВП в начальной дозе 10 мг/неделю с быстрым увеличением до 20-25 мг/неделю. Начальные характеристики образцов от не-леченных пациентов сопровождалась аналогичными измерениями после 12 и 24 недель терапии МТ.

3.7.2 Измерение уровня сывороточных антител

Измерение СОЭ проводили по стандартному методу Вестергрена (нормальная скорость < 30 мм/ч). Сывороточные концентрации CRP и RF IgM измеряли с использованием иммунотурбидиметрического метода и анализатора BN ProSpec (Siemens, Германия). Нормальный уровень CRP в сыворотке был $< 5,0$ мг/л. В соответствии с инструкцией производителя верхний предел нормального значения RF IgM был установлен на уровне 15,0 МЕ/мл. Количественное определение анти-CCP в сыворотке крови проводили с использованием измерения электрохемилюминесценции с помощью анализатора Cobas e411 (Roche, Швейцария) (верхнее нормальное значение 17,0 ЕД / мл) и ELISA с использованием коммерческого набора (Axis-Shield, Великобритания) (верхний предел нормы 5,0 Ед/мл).

3.7.3 Выделение РВМС и FACS-анализ поверхностных и внутриклеточных маркеров Трег

РВМС из цельной крови выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll, промывали PBS и окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флуорофором, против поверхностных и внутриклеточных белков в соответствии с протоколом окрашивания Foxp3 для соответствующего набора (eBioscience) (FoxP3+CD25+; поверхность CTLA4+; поверхность CTLA4+ внутриклеточный; FoxP3+CD127-; CD25+CD127-; FoxP3+ICOS+; FoxP3+CD40L+; FoxP3+PD-L1+). Перед многоцветным анализом методом проточной цитометрии (BD LSR Fortessa, США) клетки фиксировали 1% PFA. Здоровая контрольная группа состояла из 20 доноров, подобранных по возрасту и полу. Процент FoxP3+CD25+, FoxP3+CD127-, CD25+CD127-популяций рассчитывали на основе анализа CD4+ Т-клеток, другие популяции определяли как долю субпопуляции Foxp3+ CD25+ (поверхность CTLA4+; внутриклеточная CTLA4+, FoxP3+ ICOS+; FoxP3+ CD40L+; FoxP3+ PD-L1+).

Чтобы рассчитать абсолютное количество интересующих нас популяций клеток, сначала подсчитывали общее число клеток, используя гемоцитометр (камера Горяева), чтобы определить количество клеток на 1 мл крови пациента. Затем при анализе данных проточной цитометрии строили гейты для живых клеток, используя прямое и боковое рассеяние, затем клетки в этих гейтах анализировали по CD4, а затем среди CD4+ клеток выбирали Foxp3+CD25+ клетки. Наконец, проводили расчет сложного процента клеток с высоким уровнем определенного маркера и применяли этот комплексный процент к параметру числа клеток/мл крови.

3.7.4 Статистический анализ

Программную «Statistica 10.0» (Statsoft, США) использовали для статистического анализа, включая общий параметрический и непараметрический анализ. U-критерий Манна-Уитни использовали для сравнения двух наборов значений с ненормальным распределением, а критерий Крускала-Уоллиса - для сравнения трех или более выборок. Результаты представлены в виде медианы (Me) с межквартильным диапазоном 25–75 перцентилей. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена был рассчитан для анализа корреляций между значениями. Разница считалась статистически значимой, если $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Генетические модели для Трег-специфического нокаута генов в мышах

4.1.1 Создание генетической модели для специфического нокаута генов в Трег

4.1.1.1 Введение (Обоснование необходимости создания линии мышей для направленного выключения генов в $CD4+Foxp3+$ Трег)

Проблема в 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% примеси) можно пренебречь, однако для получения однозначно интерпретируемых результатов требуется специфически определить и выделить популяцию функциональных Трег. Это позволяет создание трансгенных животных, в которых природный ген *Foxp3* заменен на рекомбинантный ген, кодирующий химерный белок *Foxp3* с флуоресцентным белком EGFP (22) или его аналогами. При этом, одновременно с сохранением ядерной локализации *Foxp3* и подавляющего большинства его биологических функций, флуоресценция ковалентно-связанного с *Foxp3* GFP позволяет отсортировать и идентифицировать Трег с фенотипом $CD4+Foxp3+$. Подобный подход логично использовать и для создания трансгенных *knock-in* животных, которые бы одновременно с синтезом *Foxp3* могли бы с той же мРНК считывать и транслировать белок рекомбиназу Cre, появление которого в клетке вызывало бы удаление фрагментов ДНК, расположенных между сайтами узнавания loxP в одинаковой ориентации (т.н. «флоксированных» аллелей генов интереса). Эффективность такого подхода была доказана при создании похожих генетических моделей, основанных на использовании других генов, кодирующих белки-мастер-регуляторы дифференцировки специализированных популяций соматических, в том числе иммунных, клеток. В дополнение к введению кДНК фаговой рекомбиназы Cre в 3'-нетранслируемую область гена *Foxp3*, мы решили декорировать этот фермент молекулой YFP, что должно облегчить идентификацию Cre⁺ клеток и их выделение из смесей, равно как и выделение Cre⁺ клеток, в которых произошел нокаут гена интереса. В случае удачного исхода, мы рассчитывали, что продукция рекомбиназы и свечение YFP будут однозначно соответствовать популяции исключительно *Foxp3+* клеток.

4.1.1.2 Создание и характеристика мышей Foxp3YFP-Cre. Определение специфичности синтеза химерного белка YFP-Cre в мышцах линии C57/BL6 Foxp3YFP-Crex ROSA26-stop/flox-YFP

Для создания мышей с селективной инактивацией генов исключительно в клетках Трег с помощью базовых генно-инженерных манипуляций встроили последовательность ДНК, кодирующую вирусный IRES, кДНК химерного белка рекомбиназы Cre и YFP (далее YFP-Cre) в 3'UTR локуса Foxp3 (рис. 4-1A). Место для knock-in было выбрано исходя из анализа последовательности 3'-UTR Foxp3 и определения предполагаемого участка терминации транскрипции. Соответственно, для интеграции был выбран участок с 3'-конца от предполагаемого терминатора. Для создания таргетирующей 3'UTR Foxp3 в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) конструкции на основе фрагмента ВАС клона, несущего 3'-концевую часть геномного локуса Foxp3, была создана генетическая конструкция, структура которой показана на рис. 4-1. Используемый нами вектор, помимо кассеты, направляющей синтез гена устойчивости к неомицину (для положительной селекции клонов ЭСК), на границе геномной части конструкции нес кассету, с которой синтезируется мРНК, а затем в ходе трансляции рецептор дифтерийного токсина. Таким образом, комбинация позитивной и негативной селекции путем культивирования ЭСК в присутствии неомицина и дифтерийного токсина должна существенно повысить шансы получить клоны ЭСК линии R4 (линия мышей 129) (после электропорации соответствующей линейризованной конструкцией и отбора выживших в процессе двойной селекции клонов ЭСК), содержащих интересующий нас модифицированный аллель Foxp3 и не несущих нежелательных вставок части вектора, необходимой для размножения плазмиды в клетках бактерий. Следует заметить, что клетки мыши в норме нечувствительны к дифтерийному токсину, а введение рецептора дифтерийного токсина придает им чувствительность к нему.

Произошедшие из одиночных клеток клоны таргетированных по Foxp3 мышинных ЭСК выращивали до монослоя в 24-луночных планшетах. Геномную ДНК клонов анализировали с помощью рестрикции, электрофореза и гибридизации по Саузерну со специфическими зондами, комплементарными фланкирующим таргетированные фрагменты участки генома. В результате, нами были получены клоны ЭСК, несущие модифицированные аллели локуса Foxp3. Модифицированные ЭСК подсаживали в бластоцисты доноров C57/BL6, которые затем вводили псевдобеременным самкам Balb/c. Химерное потомство определяли по окрасу шкурки, животных с преобладающим рыжим окрасом использовали для дальнейшего анализа и скрещивания (линия стволовых клеток

происходит от линии мышей 129, для которых характерен рыжеватый (агути) окрас; доноры бластоцистов – черные самки линии C57/BL6, а реципиенты бластоцистов – белые самки Balb/c). Таким образом, степень химеризма легко определить визуальным путем по окрасу потомства.

Химерных самцов, содержащих целевой аллель *Foxp3*^{YFP-Cre}, скрещивали с самками мышей, экспрессирующих трансген рекомбиназы *FLPe*, для удаления кассеты *Neo^f* и для подтверждения передачи по зародышевой линии целевого аллеля (рис. 4-1Б). *Neo^f*-негативное потомство скрещивали с мышами C57/BL6, и получающихся в результате мышей *Foxp3*^{YFP-Cre} анализировали на экспрессию белка YFP-Cre и *Foxp3* (рис. 4-1В). В дальнейшем, мышей новой линии многократно (не менее 10 раз) скрещивали с мышами линии C57/BL6 (The Jackson laboratory), для их перевода на генетический фон C57/BL6. Это необходимо для того, чтобы мышей новой линии можно было сравнивать с мышами других линий на этом генетическом фоне, а также пересаживать путем адоптивного переноса Т-клетки новой линии в реципиентов C57/BL6.

Исходно необходимо было убедиться, что экспрессия слитого белка YFP-Cre происходит только в клетках Трег с фенотипом CD4+*Foxp3*+. Чтобы исследовать специфичность Cre-опосредованной рекомбинации у мышей *Foxp3*^{YFP-Cre}, мы ввели путем дополнительного скрещивания репортерный аллель, который позволяет детектировать активность Cre и следить за Cre-зависимой рекомбинацией *ROSA26YFP* (R26Y). Этот аллель позволяет обнаруживать Cre-опосредованную рекомбинацию на уровне отдельных клеток посредством проточно-цитометрического анализа по флуоресценции YFP, индуцированной Cre-опосредованным вырезанием «флуксированной» транскрипционной стоп-кассеты, предшествующей кодирующей YFP последовательности, интегрированной в повсеместно экспрессируемый локус *ROSA26* (активен во всех клетках организма, начиная с самых ранних этапов эмбриогенеза). Поскольку количество репортера YFP было заметно выше, чем слитого белка YFP-Cre, 100% эффективную Cre-опосредованную рекомбинацию в клетках Трег мышей *Foxp3*^{YFP-Cre} было несложно детектировать в популяциях CD4+*Foxp3*+. Кроме того, у отдельных мышей *Foxp3*^{YFP-Cre} мы выявили незначительный процент (2-10%) клеток костномозгового происхождения, в которых также происходила рекомбинация R26Y. Такие клетки включали незрелые и зрелые В-клетки, Т-клетки, миелоидные клетки и клетки-предшественники костного мозга и в них отсутствовала детектируемая экспрессия YFP-Cre и *Foxp3* (данные не показаны).

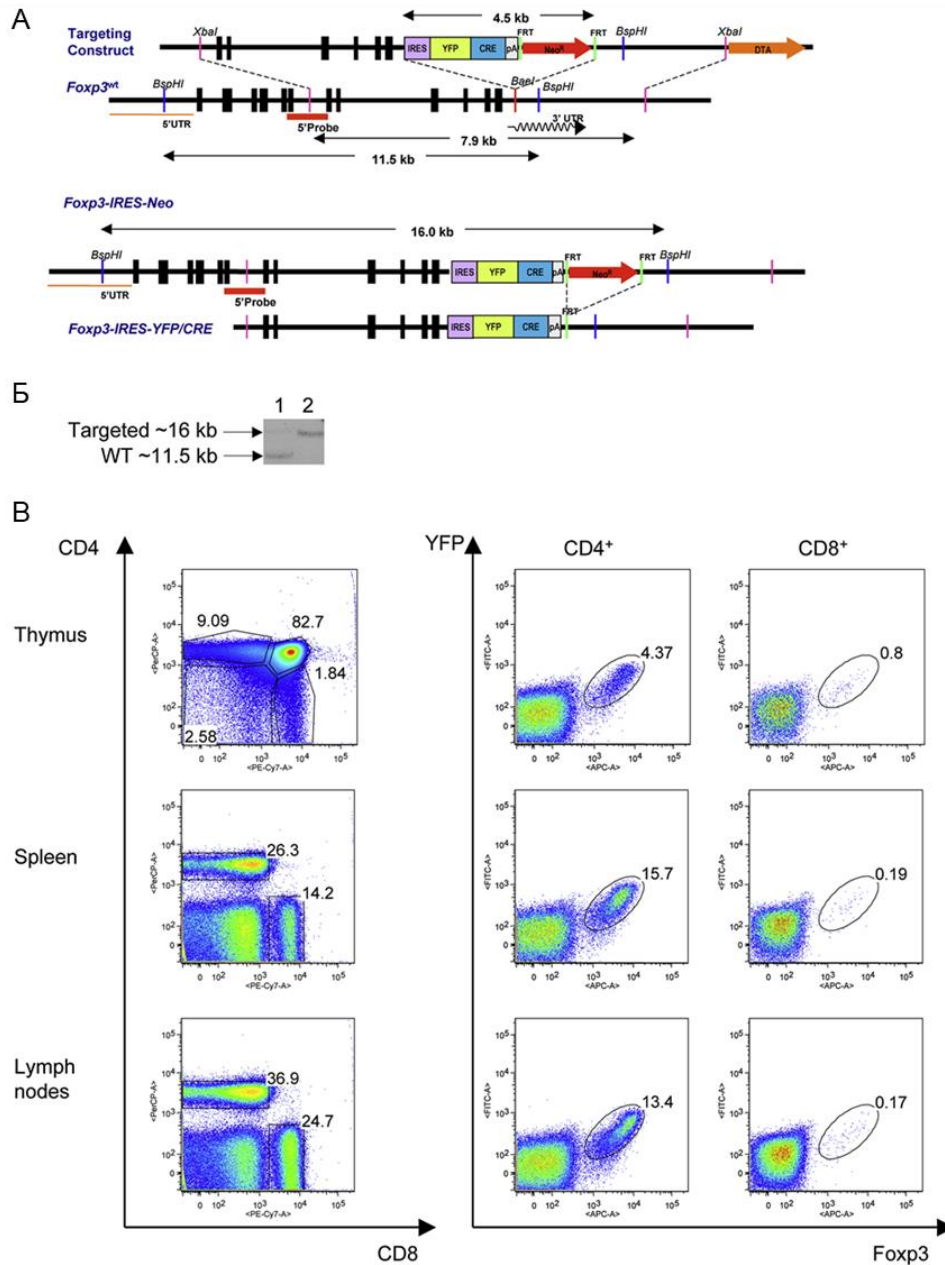


Рисунок 4-1. Создание и характеристика мышей, несущих мутантный аллель *Foxp3^{YFP-Cre}*. (А) Схема 3'-концевой части локуса *foxp3*, строение вектора для таргетирования и расположение зондов для анализа результатов таргетирования; (Б) Результаты блоттинга по Саузеру (скан рентгеновской пленки) фрагментов геномной ДНК, содержащей локус *Foxp3* дикого типа и таргетированный локус. Геномную ДНК расщепляли рестриктазой *Bgl*III, полученную смесь фрагментов разделяли в 0,8% агарозе, затем переносили на мембрану HybondN+ и гибридизовали с зондом к 5'-концу фрагмента, содержащим фосфор ³²P; (В) Анализ популяций CD4 и CD8 Т-клеток из лимфоидных органов мышей *Foxp3^{YFP-Cre}*, а также пропорций клеток, синтезирующих YFP и Foxp3 методом проточной цитометрии. Клетки, окрашенные антителами к поверхностным маркерам, дополнительно фиксировали и пермеабелизовали для окрашивания моноклональными антителами к ядерному белку Foxp3. Приведены результаты одного из нескольких экспериментов, цифры на графиках распределения плотности событий соответствуют пропорции соответствующих популяций.

Вероятно, это происходит из-за стохастической рекомбинации, возникающей в результате базальной транскрипции $Foxp3^{YFP-Cre}$, что согласуется с новыми данными о повсеместной транскрипции генов, включая «молчащие» гены и некодирующие последовательности в дополнение к активно транскрибируемым генам, участвующим в процессах онтогенеза (337). Однако такая нецелевая «off-target» рекомбинация у мышей $Foxp3^{YFP-Cre}$, незначительна, учитывая, что любое событие рекомбинации, затрагивающее лишь один аллель R26Y, приводит к индукции синтеза YFP, в то время как, для удаления интересующего нас «флуксированного» гена в гомозиготной конфигурации требуется делеция обоих аллелей.

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

4.1.2.1 Введение (обоснование актуальности создания новой линии мышей)

Несмотря на то, что создание мышей линии $Foxp3^{YFP-Cre}$ позволяет добиться эффективного выключения генов в $Foxp3^+$ Т-клетках, данная генетическая модель также имеет существенные ограничения. Дело в том, что активация промотора $Foxp3$ вскоре (через 3 дня у мышей) после рождения приводит к тому, что сопутствующая синтезу $Foxp3$ продукция рекомбиназы вызовет практически немедленный 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 образованию спонтанного воспаления и лимфолиферации, которая может негативно повлиять на поддержание количества и функции Трег. Хроническое воспаление, вызванное нокаутом в раннем постнатальном периоде жизни, может существенно исказить и нарушать интерпретацию результатов и препятствовать выяснению функции отдельных молекул во взрослых животных. Для решения этой проблемы необходимо оптимизировать трансгенную линию так, чтобы появилась возможность индуцировать Cre/loxP опосредованный нокаут генов интереса в Трег взрослых мышей. Мы предложили использовать химерный белок (и соответствующую генетическую конструкцию), состоящий из уже представленного выше полипептида, содержащего сразу три компонента: флуоресцентный белок EGFP, рекомбиназу Cre и фрагмент рецептора эстрогена, который должен удерживать данную химеру в цитоплазме, препятствуя рекомбинации в отсутствие лиганда. При условии, что такая химерная конструкция будет экспрессироваться в составе локуса $Foxp3$ только в Трег, можно путем введения мышам индуктора – тамоксифена, добиться перемещения рекомбиназы в ядро клетки, что должно приводить к Cre-зависимой рекомбинации во «взрослых» Трег.

4.1.2.2 Создание и анализ линии мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* (определение специфичности синтеза химеры *eGFP-Cre-ERT2*)

Использование схожей с ранее представленной стратегией таргетирования 3'UTR локуса *Foxp3* позволило создать мышей для индуцибельной рекомбинации Cre/loxP, несущих кассету, содержащую внутренний сайт посадки рибосом (IRES), за которым следовала последовательность ДНК, кодирующая «тройной» белок слияния: усиленный зеленый флуоресцентный белок (eGFP), Cre рекомбиназа и мутированный лиганд-связывающий домен рецептора эстрогена человека (ERT2). Данная кассета была встроена в 3'-нетранслируемую область гена *Foxp3*.

Мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* скрещивали с мышами, которые экспрессировали репортерный аллель Cre-рекомбинации повсеместно экспрессированного локуса *ROSA26*, содержащего фланкированную сайтами loxP STOP-кассету, за которой следовала последовательность ДНК, кодирующая желтый флуоресцентный белок (YFP) (R26Y) (рис. 4-2). У мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* x R26Y слитый белок GFP-CreERT2 локализован в цитозоле и, следовательно, YFP не экспрессируется. Обработка тамоксифеном позволяет осуществлять ядерную транслокацию слитого белка, удаление флюксированной STOP-кассеты и конститутивную и наследуемую экспрессию YFP в клетках, которые экспрессировали *Foxp3* во время введения тамоксифена. Важно, что, в отличие от непрерывного, индуцибельное мечение экспрессирующих *Foxp3* клеток YFP позволяет избежать постоянного включения в популяцию меченых клеток тех, которые временно активируют *Foxp3*, и позволяет оценить содержание истинных клеток Treg.

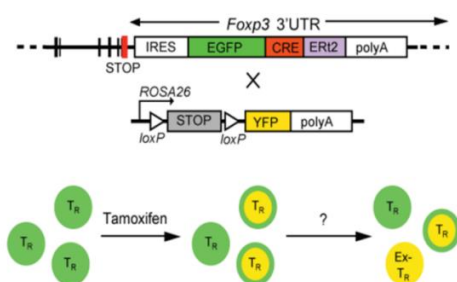


Рисунок 4-2. Мыши для индуцируемого мечения и отслеживания судьбы *Foxp3⁺* T-клеток *in vivo*. Представлена схема скрещивания knock-in аллеля *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* с репортерными мышами R26Y. Введение полученным животным *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* x R26Y тамоксифена вызывает появление популяции T-клеток CD4⁺ с характерной продукцией GFP и YFP.

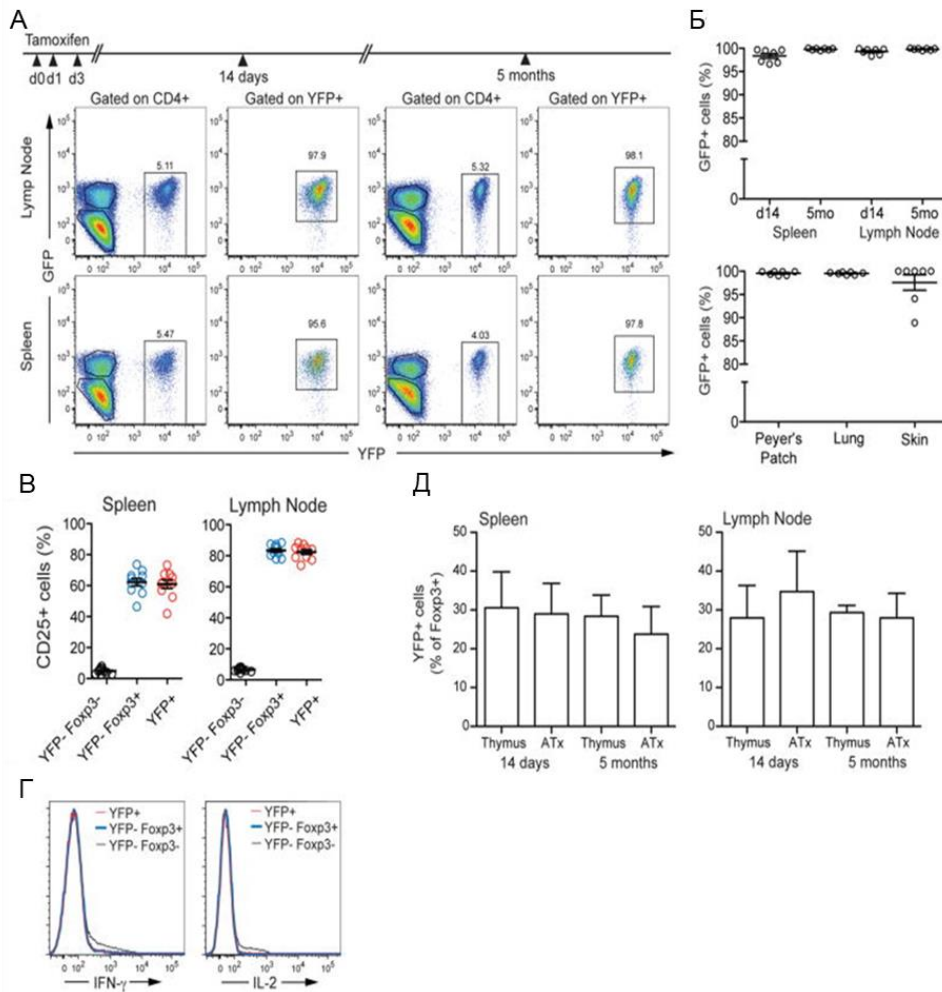


Рисунок 4-3. Индуцибельное мечение клеток $Foxp3^+$ выявляет стабильность подгруппы клеток Трег в физиологических условиях. (А) Репрезентативный проточно-цитометрический анализ демонстрирует стабильность экспрессии $Foxp3$ через 14 дней и 5 месяцев после индуцированного тамоксифеном мечения. Показаны субпопуляции YFP^+ , $YFP-GFP^+$ и $YFP-GFP^-$ Т-хелперов и доля клеток GFP^+ среди помеченных YFP клеток. Числа представляют проценты клеток в указанных областях (гейтах). (Б) Процент клеток YFP^+ , экспрессирующих GFP , в указанных органах, проанализированных как в (А), через 5 месяцев после введения тамоксифена (внизу). Каждая точка представляет отдельную мышь. (В) Проточно-цитометрический анализ экспрессии $CD25$ в субпопуляции клеток $CD4^+$ через 5 месяцев после начальной обработки тамоксифеном. Экспрессия $CD25$ в указанной субпопуляции показана для отдельных мышей. (Г) Спленоциты мышей $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} \times R26Y$ были выделены через 5 месяцев после введения тамоксифена, стимулированы РМА и иономицином *in vitro*, продукция $IFN\gamma$ и $IL-2$ была оценена с помощью проточной цитометрии. 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 $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} \times R26Y$ через 14 дней и 5 месяцев после лечения тамоксифеном. АТх: тимэктомия у взрослых. Данные представляют результаты трех независимых экспериментов ($n \geq 3$ на группу). Мыши в момент маркирования (обработки тамоксифеном) были в возрасте 6-8 недель.

У мышей $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} \times R26Y$ было нормальное количество двойных и одиночных положительных тимоцитов $CD4$ и $CD8$, и Т-клеток $CD4^+$ и $CD8^+$ во вторичных

лимфоидных органах (рис. 4-3 и 4-4). Экспрессия мутантного гена *Foxp3* и связанного с ним репортера eGFP были практически неотличимы (по уровню и пропорции синтезирующих белок клеток) от экспрессии белка *Foxp3* у контрольных мышей дикого типа. eGFP можно было детектировать только в клетках, синтезирующих *Foxp3* (рис. 4-3 и 4-5). Продукция YFP не происходила в клетках eGFP⁺ в отсутствие тамоксифена, а при его введении детектировалась только в клетках, синтезирующих *Foxp3* (4-5).

Обработка тамоксифеном дала три основные популяции CD4⁺ Т-клеток: eGFP⁻YFP⁺*Foxp3*⁻ или "не-Трег" -клетки, eGFP⁺ YFP⁻ клетки *Foxp3*⁺ Трег, в которых не произошло мечение, и меченые клетки eGFP⁺YFP⁺*Foxp3*⁺ (рис. 4-3 и 4-5). Мы также наблюдали небольшую популяцию клеток eGFP⁻YFP⁺ (<5% клеток YFP⁺), которые, возможно, временно экспрессировали *Foxp3* при воздействии тамоксифена. 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, протестированных до настоящего времени (рис. 4-6).

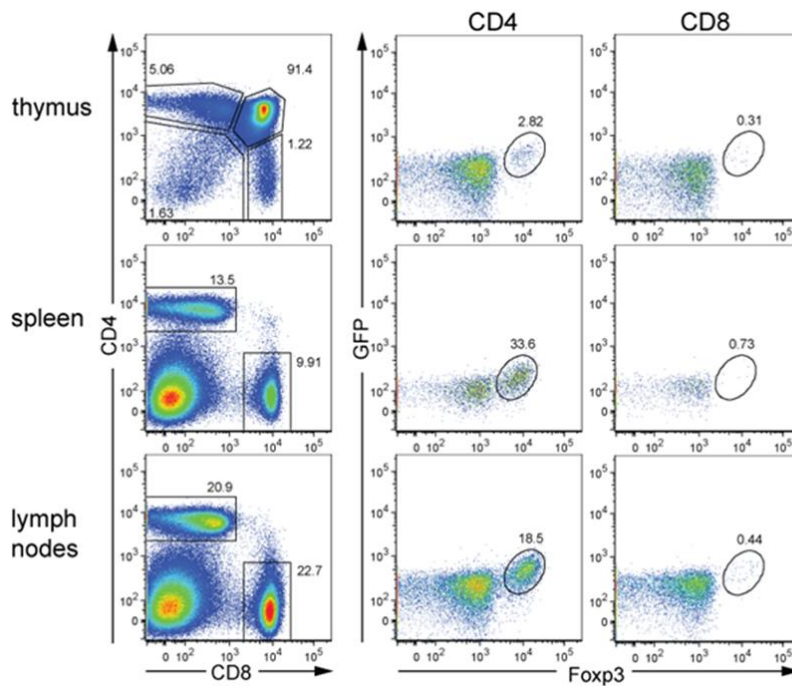


Рисунок 4-4. Нормальное созревание тимусных и периферических популяций Т-клеток у животных генотипа *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} x R26Y*. Показаны результаты проточной цитометрии суспензий тимоцитов, спленоцитов и лимфоцитов мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} x R26Y*, окрашенных на соответствующие маркеры (CD4, CD8 и *Foxp3*). Видно, что пропорции клеток соответствующих популяций соответствуют нормальным значениям для мышей дикого типа.

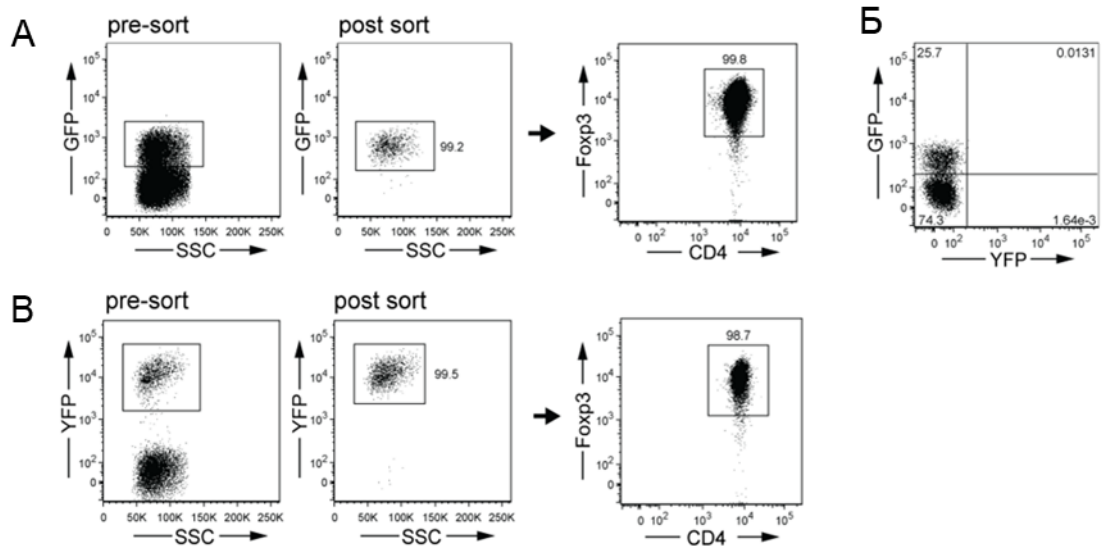


Рисунок 4-5. Продукция YFP и GFP в мышах *Foxp3^{zeGFP-Cre-ERT2} x R26Y*. (А) Синтез GFP совпадает с продукцией Foxp3 в клетках мышей *Foxp3zeGFP-Cre-ERT2xR26Y*. Клетки, содержащие GFP (GFP+), очищали с помощью проточного цитометра, совмещенного с сортером, до чистоты >99%, затем внутриклеточно окрашивали на Foxp3; (Б) Анализ синтеза YFP и GFP в спленocyтaх мышей *Foxp3zeGFP-Cre-ERT2xR26Y* до обработки тамоксифеном с помощью проточной цитометрии подтверждает отсутствие заметных количеств YFP до введения тамоксифена; (В) Индуцируемая тамоксифеном продукция YFP совпадает с синтезом Foxp3 в клетках. YFP+ клетки, полученные в ходе обработки тамоксифеном, были отсортированы до чистоты >99%, окрашены внутриклеточно на Foxp3, затем синтез Foxp3 и GFP в них был проанализирован.

4.1.3 Выяснение роли IL-10, секретируемого Трег, в защите от системного и локального аутоиммунитета

4.1.3.1 Абляция IL-10 в клетках Трег не нарушает их развития и не приводит к системному аутоиммунитету

Чтобы исследовать роль эффекторных молекул, в частности IL-10, в супрессии, опосредованной клетками Трег, в рамках данной работы были созданы мыши Foxp3^{YFP-Cre}, способные к специфической для клеток Трег инактивации представляющих интерес генов. IL-10 играет важную роль в поддержании иммунного гомеостаза ЖКТ. На момент, когда было начато данное исследование, было известно, что мыши с полным нокаутом IL-10, а также животные, у которых продукция этого цитокина выключена в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, 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, которую легко детектировать. Симптомы спонтанного воспалительного заболевания толстого кишечника у мышей с полным или ограниченным Т-клетками

нокаутом IL-10 напоминают симптомы патологий человека, собранных под названием IBD (inflammatory bowel disease), к которым относится также болезнь Крона. Тот факт, что адаптивный перенос Т-клеток с дефицитом IL-10 не защищал мышей с индуцированным декстран сульфатом колитом от заболевания, дополнительно подчеркивает значимость продукции IL-10 Т-клетками для поддержания иммунного равновесия в кишечнике, органе, где происходит непосредственный контакт иммунной системы с сонмом комменсальных

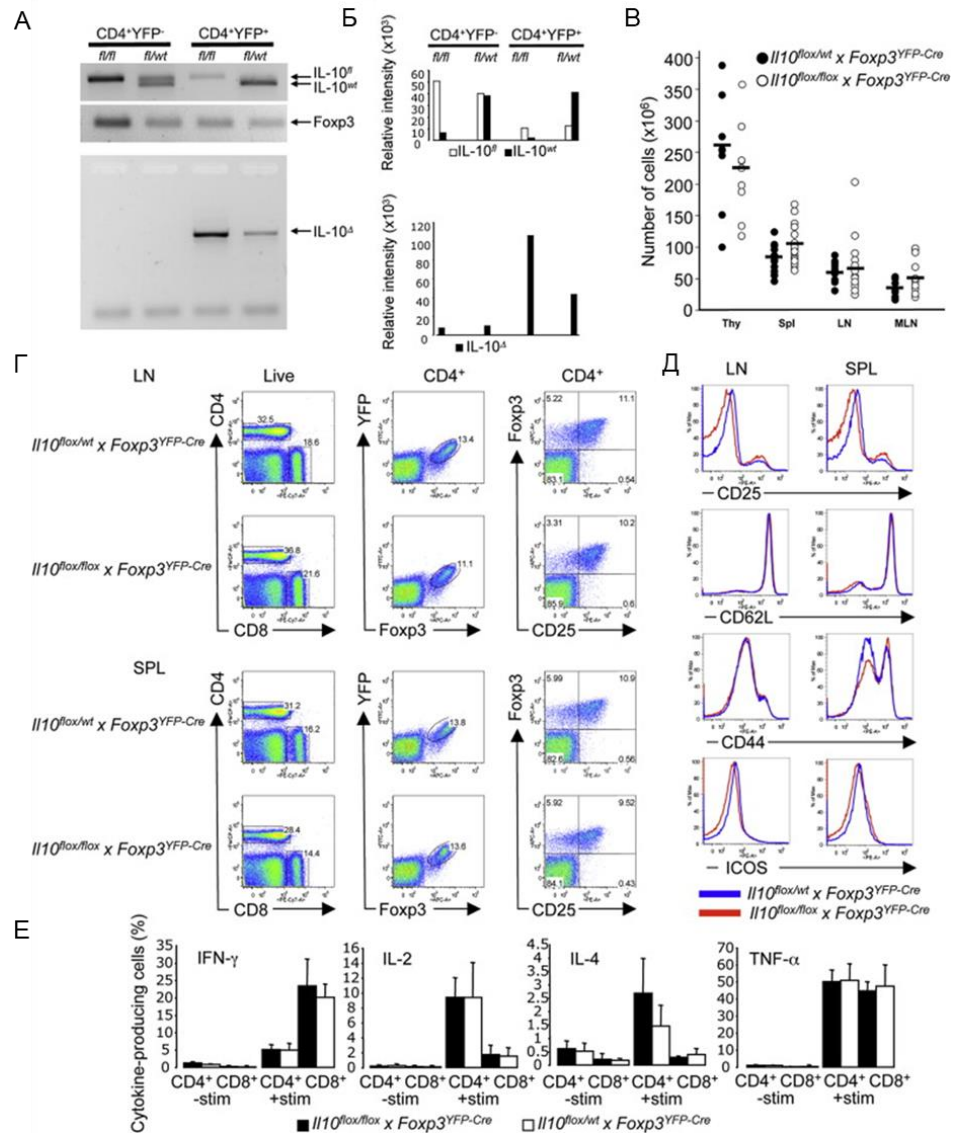


Рисунок 4-6. Отсутствие системного аутоиммунитета и нормальное развитие Трег у мышей с дефицитом IL-10 в Трег. (А) Удаление гена *Il10* у мышей *Il10^{fl/fl} × Fcγ3^{YFP-Cre}* ограничено подмножеством клеток Fcγ3⁺ Трег. ПЦР-анализ подгрупп YFP-Cre⁺ и YFP-Cre-CD4⁺ на наличие аллелей *Il10* дикого типа (Il10^{WT}), без делеции (Il10^{fl/fl}) или с делецией (Il10^Δ). Геномную ДНК выделяли из указанных популяций очищенных Т-клеток CD4 мышей *Il10^{fl/fl} × Fcγ3^{YFP-Cre}* (fl/fl) и *Il10^{WT/fl} × Fcγ3^{YFP-Cre}* (fl/wt) (показаны результаты одного репрезентативного эксперимента). (Б) Гистограммы показывают относительную интенсивность указанных продуктов ПЦР, нормализованную по интенсивности полосы Fcγ3, используемой в качестве контрольного продукта ПЦР. Представлены результаты одного из двух повторяющихся экспериментов. (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 представляет количество мононуклеарных клеток в тимусе (Thy), селезенке (Spl), лимфатических узлах (LN) и дренирующей брыжеечной лимфатической узлах (MLN) в отдельных животных $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (открытые символы) и $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (закрашенные символы). Количество клеток LN представляет объединенные лимфатические узлы, исключая MLN. (Г) Проточно-цитометрический анализ подмножеств Т-клеток селезенки и лимфатических узлов у мышей $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$. Двенадцать мышей были использованы в трех независимых экспериментах. (Д) Проточно-цитометрический анализ экспрессии маркеров активации Т-клетками селезенки и лимфатических узлов мышей $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ 5-8 недель. Клетки окрашивали на CD4, CD8, CD25, CD62L и CD44. Двенадцать мышей были использованы в трех независимых экспериментах. (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 $Il10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и после 5-часовой активации окрашены на CD4, CD8, IL-2, IL-4, IFN γ , и TNF α . Данные представлены в виде среднего процента (\pm стандартная ошибка) цитокин-положительных клеток в популяциях CD4⁺ или CD8⁺ у отдельных мышей. Нестимулированные образцы клеток, культивируемые в отсутствие антител, показаны в качестве контроля. Восемь животных на группу были использованы в двух отдельных экспериментах.

микроорганизмов. Неконтролируемый ответ на антигены комменсальных микроорганизмов должен приводить к развитию воспаления кишечника и постепенному нарушению его барьерных функций. В то же время, было показано, что уровень транскрипции гена, кодирующего IL-10, и способность выделять этот цитокин у очищенных CD4⁺CD25⁺ Трег гораздо выше, чем у обычных Т-клеток (338). Это позволяет предположить, что именно продукция IL-10 Трег с фенотипом CD4⁺Foxp3⁺ может отвечать за поддержание иммунного баланса в кишечнике, защищая мышей от развития спонтанного колита.

Для создания мышей, у которых дефицит IL-10 был ограничен только клетками Трег, мы скрестили мышей $Il10^{flox/flox}$, содержащих сайты loxP, фланкирующие первый экзон гена *Il10* (созданы в лаборатории профессора Вернера Мюллера), 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 обнаруживался 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. 4-6 А и Б). Мы оценили степень делеции аллеля $Il10^{flox}$ в, как минимум 90%, в

клетках YFP+, продукт рекомбинации не удалось выявить в клетках YFP- (рис. 4-6). Чтобы проверить специфичность делеции аллеля *Il10^{flox}* на уровне белка, стимулировали спленциты от мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* и контрольных мышей *Il10^{flox/WT} × Foxp3^{YFP-Cre}* *in vitro*, и окрашивали их внутриклеточно антителами к Foxp3 и IL-10. Пропорция и число продуцирующих IL-10 клеток было значительно меньше в популяции, позитивной по Foxp3, но не в Foxp3-негативных CD4+ Т-клетках (данные не показаны).

Самцы мышей *Il10^{fl/fl} × Foxp3^{YFP-Cre}* и самки *Il10^{fl/fl} × Foxp3^{YFP-Cre}* рождались с менделевской частотой и не имели спленомегалии, лимфаденопатии или других явных признаков аутоиммунной патологии в возрасте до 8 недель (рис. 4-6). Проточно-цитометрический анализ мышей-мутантов выявил численно неизменные подмножества Т-клеток и периферических клеток CD8+ и CD4+ тимуса, включая популяции Foxp3+ Т-клеток (рис. 4-6Г). Дальнейшее изучение экспрессии маркеров активации Т-клеток на поверхности CD4+ Т-клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов мутантных и контрольных мышей, не выявило заметных различий (рис. 4-6 Д). Секреция характерных для Т-клеток цитокинов IL-2, IL-4, IFN-γ и TNF-α CD4+ Т-клетками была неотличима у 6-8-недельных мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* и контрольных животных (рис. 4-6 Е). Эти результаты свидетельствуют о, в значительной степени, интактной супрессорной способности клеток Трег этих мышей; известно, что полный дефицит клеток Трег из-за потери функции или мутаций в белке Foxp3, либо из-за абляции Трег, приводит к значительному увеличению продукции цитокинов Т-клетками и лимфопролиферации. В ходе нашей работы по характеристике молодых животных не было обнаружено признаков аутоиммунной патологии тканей при гистологическом исследовании различных органов мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}*. Единственным отличием были признаки воспаления толстой кишки у части животных, которые были старше 8 недель (см. ниже). Вышеперечисленные результаты показывают, что экспрессия IL-10 клетками Трег не является существенной для их глобальной роли сдерживании системного аутоиммунитета на ранних этапах постнатального периода.

4.1.3.2 У мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* развивается спонтанный колит

Было показано, что у мышей с полным нокаутом (*Il10^{-/-}*) или абляцией гена *Il10* в Т-клетках (*Il10^{flox/flox} × 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 немного меньшего процента мышей *Il10^{fl/fl} × CD4-Cre* примерно через 6 месяцев после рождения документировано выпадение прямой кишки и геморрой,

свидетельствующие о тяжелом колите, который по симптомам схож с воспалительным заболеванием кишечника пациентов с болезнью Крона или IBD (327). Чтобы выяснить, приводит ли специфический дефицит Трег по IL-10 к спонтанному колиту, в течение продолжительного времени наблюдали большие группы мышей $IL10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольных мышей $IL10^{flx/WT} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ для выявления

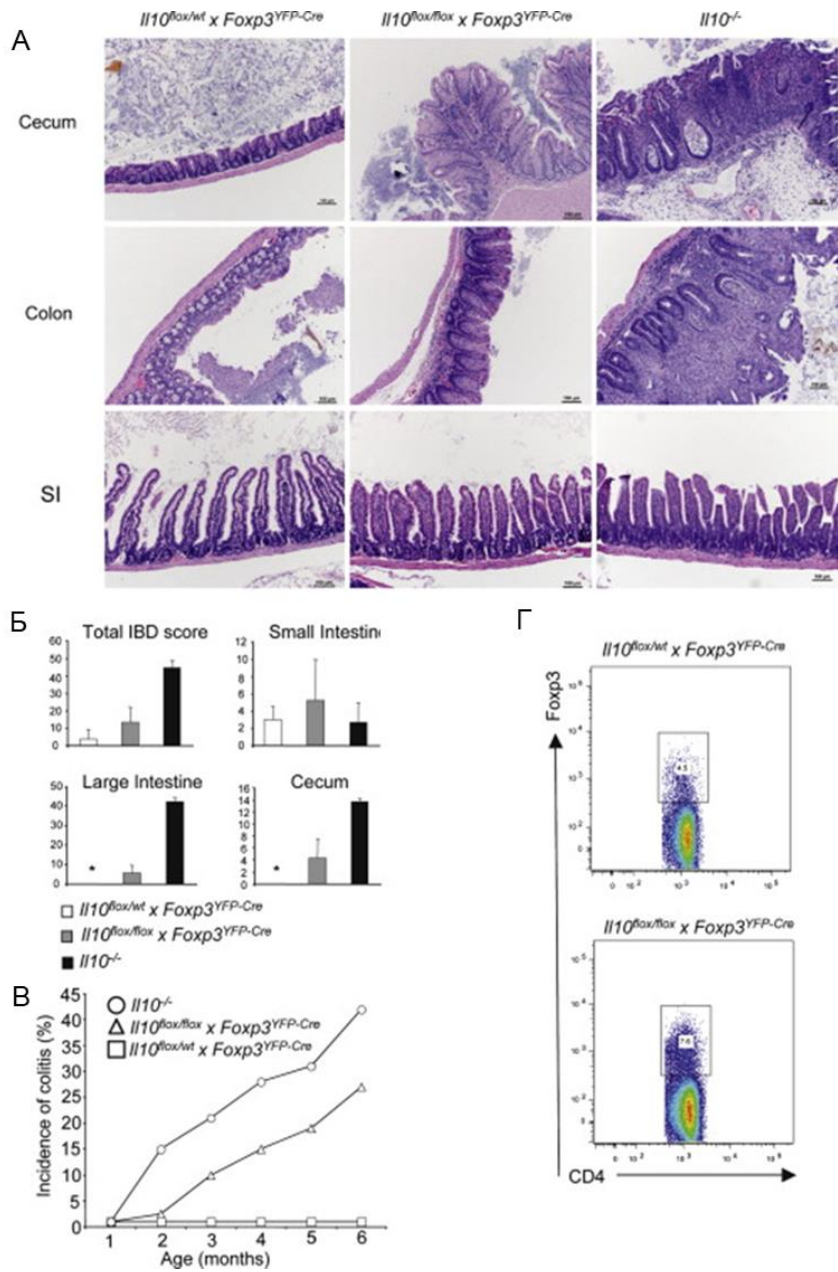


Рисунок 4-7. Зависимый от возраста спонтанный колит у мышей $IL10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$. (А) Типичные фиксированные формалином и окрашенные гематоксилином и эозином срезы слепой кишки (верхний ряд), толстой кишки (средний ряд) и тонкого кишечника (нижний ряд) 3-месячных мышей с полным нокаутом IL-10 и мышей с дефицитом IL-10 исключительно в Трег. Контрольные срезы гетерозиготных мышей $IL10^{WT/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ показаны слева демонстрируют соответствие норме (левый столбец). В слепой и

толстой кишке мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ видны умеренные проявления воспалительного заболевания кишечника, характеризующегося легкой гиперплазией слизистой оболочки и воспалением в слизистой и подслизистой оболочке. Для сравнения приведены тяжелые повреждения, характеризующимися выраженным утолщением слизистой оболочки, гиперплазией, потерей желез, абсцессами крипты, отеком подслизистого слоя и трансмуральным воспалением у мышей с полным нокаутом $Il10^{-/-}$. У всех животных отдел тонкого кишечника визуально находится в пределах нормы. 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 $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ 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 $Il10^{-/-}$. Животных ежедневно проверяли на наличие клинических признаков колита, включая выпадение прямой кишки и диарею. Колит был дополнительно подтвержден при макроскопическом исследовании толстой кишки и селективной гистопатологии тканей. 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 указанного генотипа, объединены и окрашены на CD4, CD8, ТКР β и Foxp3. Показаны гейты для клеток CD4⁺ CD8⁻ ТКР β ⁺. Представлены данные одного из двух повторяющихся независимых экспериментов.

клинических признаков колита, а именно, выпадения прямой кишки и жидкого стула. В качестве положительного контроля в этих экспериментах 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. При дальнейшем осмотре пораженных животных обнаружили диффузное утолщение толстой кишки и значительное увеличение размеров брыжеечных лимфатических узлов и селезенки. Слепая гистологическая оценка срезов желудка, тонкой и толстой кишки мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ показала, что, хотя дефицит IL-10 в клетках Трег не влиял на желудок и тонкую кишку, у этих мышей толстая, а особенно слепая кишка, подвергалась значительной мононуклеарной инфильтрации эпителиальной ткани, а также деградации ткани (рис. 4-7А и 4-7Б). Воспаление толстой кишки, наблюдаемое у мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, было гистологически сходным с наблюдаемым у мышей $Il10^{-/-}$, хотя в последней группе воспаление было более выраженным и затрагивало всю длину ободочной кишки (рис. 4-7 А и Б).

В соответствии с микроскопическими наблюдениями, симптомы заболевания проявлялись позже, а процент животных с симптомами заболевания был несколько ниже у мышей генотипа $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, чем у мышей $Il10^{-/-}$ (рис. 4-7 Б). Представляется маловероятным, что наблюдаемые различия были обусловлены разницей в микрофлоре кишечника мышей с разными генотипами, поскольку они содержались в одинаковых

условиях и контактировали друг с другом, а образцы кала из каждой экспериментальной группы дали положительный результат на *H. hepaticus*, *H. rodentum* и *H. trogonum* по данным анализа ПЦР, тогда как *H. bilis* и *H. typhlonus* не были обнаружены (данные не показаны). Колит, наблюдаемый у мышей $И10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, не был вызван недостатком Трег в толстой кишке, поскольку анализ популяции Т-клеток толстой кишки, включающих интраэпителиальные лимфоциты (IEL) и лимфоциты собственной пластинки (LPL-lamina propria lymphocytes), показал увеличенный размер подмножества Foxp3+Трег с неизменной экспрессией Foxp3 в пересчете на каждую клетку в мышях $И10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, по сравнению с контрольными мышами $И10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (рисунок 4-7 Г).

Таким образом, дефицитные по IL-10 Трег присутствуют в ткани толстой кишки, но не способны сдерживать воспаление в ответ на микрофлору кишечника. Также возможно, что неспособность Foxp3-экспрессирующих клеток продуцировать IL-10 в кишечнике может предотвратить секрецию IL-10 Т-клетками, в которых нет Foxp3. Чтобы изучить эту возможность, мы выделили LPL из мышей $И10^{flox/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольных мышей $И10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и оценили их способность продуцировать IL-10 при стимуляции *in vitro*. IL-10, выделяемый клетками с фенотипом Foxp3-, было несложно детектировать, в то время как Foxp3+ LPL IL-10 не выделяли. Умеренное, менее чем в два раза, уменьшение доли клеток, продуцирующих IL-10, может быть результатом воспалительной среды и

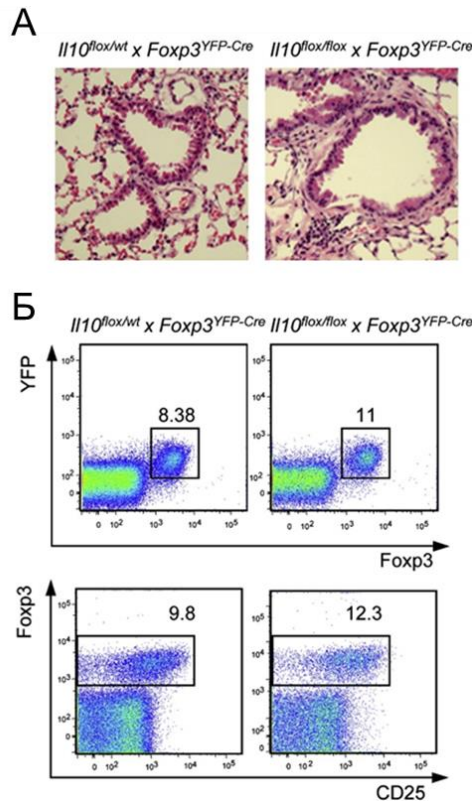


Рисунок 4-8. Незначительное перибронхиальное воспаление и нормальный размер популяции Foxp3 + Трег-клеток в легких мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (А) Гистологические срезы легких мышей с Трег-специфическим нокаутом гена IL-10. Фиксированные формалином срезы легких приблизительно 3-месячных мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольного помета $Il10^{WT/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ окрашивали гематоксилином и эозином. Исходное увеличение 10X. (Б) Проточно-цитометрический анализ Foxp3+ Трег в легочной ткани мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольного помета $Il10^{WT/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$. Легочную резидентную популяцию мононуклеарных клеток выделяли из перфузированных PBS легких. Клетки, выделенные 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.

общего увеличения инфильтрации Т-клеток в ткани (данные не показаны). Совокупность этих данных указывает на то, что IL-10, продуцируемый клетками Трег, играет важную роль в сдерживании местного воспаления в толстой кишке.

4.1.3.3 Повышенная гиперреактивность легких у мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$

Хотя гистологическое исследование множества органов и тканей (сердца, скелетных мышц, желудка, поджелудочной железы, тонкой кишки, щитовидной железы и мозга), выделенных из мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, не выявило заметной патологии, был обнаружен периваскулит и умеренная мононуклеарная инфильтрация вокруг крупных дыхательных путей в легких мышей $Il10^{fllox/fllox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, но не контрольных

гетерозиготных мышей (рис. 4-8 А). Проточно-цитометрический анализ популяций Т-клеток, выделенных из перфузированных легких, показал сохранность субпопуляции Foxp3+ Т-клеток у животных с генотипом $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, пропорция которых соизмерима с аналогичной популяцией мышей $Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (рис. 4-8 Б). Важно, что приблизительно 12% Foxp3+ Т-клеток в легких синтезируют IL-10, согласно анализу мышей-репортеров IL-10 (339).

Эти наблюдения показали, что IL-10, продуцируемый клетками Трег, вероятно участвует в сдерживании воспаления легких – ткани, которая находится в постоянном контакте с патогенами и антигенами, взвешенными в воздухе. Тем не менее, в предыдущих исследованиях с использованием мышей с полным нокаутом IL-10 в экспериментальной модели астмы этот цитокин участвовал в усилении патологии легких. В этих экспериментах у мышей $Il10^{-/-}$, сенсibilизированных овальбумином (OVA), наблюдалась сниженная гиперреактивность дыхательных путей, несмотря на инфильтрацию лимфоцитов легких и эозинофилию, сопоставимые с таковыми, наблюдаемыми у мышей дикого типа при интраназальном введении OVA (340). Таким образом, несмотря на отсутствие выраженной спонтанной иммунной патологии в легких мышей с дефицитом IL-10 в Трег, данные гистологического исследования, с учетом литературных данных позволяют предположить, что секреция IL-10 легочными Трег может играть роль в развитии индуцированного антигеном воспаления легких, например, в модели индуцированной иммунизацией куриным овальбумином (OVA) гиперреактивности легких.

Таблица 2. Морфометрический анализ антиген-индуцированного воспаления в легких мышей линии $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$

Счет патологии легких	$Il10^{WT/flox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$		$Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$	
	PBS/PBS	OVA/OVA	PBS/PBS	OVA/OVA
Общее число воспалительных клеток в легких (0–4+)	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.3	0.05 ± 0.05	3.7 ± 0.3

Счет патологии легких	<i>Il10^{WT/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}</i>		<i>Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}</i>	
	PBS/PBS	OVA/OVA	PBS/PBS	OVA/OVA
Эозинофилы (число эозинофилов/единицу площади ткани легкого)	0.1 ± 0.1	15.9 ± 0.1	0.25 ± 0.19	23.4 ± 2.4
Закупорка дыхательных путей слизью (в процентах от диаметра просвета) (0–4+)	0.1 ± 0.06	2.4 ± 0.1	0.05 ± 0.05	3.7 ± 0.2
Бокаловидные клетки (процент от эпителиальных клеток дыхательных путей)	0.1 ± 0.06	24.0 ± 4.2	0.05 ± 0.05	38.7 ± 5.3
Отек дыхательных путей (0–4+)	0.1 ± 0.06	1.4 ± 0.2	0.05 ± 0.05	2.4 ± 0.3

Десять срезов на мышь были оценены по шкале 0–4+. Данные представлены в виде среднего балла (± стандартная ошибка). Восемь-десять мышей на группу были проанализированы в двух независимых экспериментах. Значения *p* между средними значениями у мышей, обработанных OVA *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* и *Il10^{WT/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}*, были в интервале 0,0001 и 0,0156.

С целью получения прямого ответа на вопрос о роли продуцируемого легочными Трег IL-10 в контроле воспаления, с помощью OVA индуцировали воспаление легких у мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* и контрольных животных *Il10^{WT/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* из тех же пометов. Чтобы лучше объяснить возможное обострение гиперреактивности легких из-за дефицита IL-10 в клетках Трег, использовали ранее описанный оптимизированный режим иммунизации OVA для минимизации индуцированного воспаления легких у контрольной группы мышей дикого типа (332, 333). Условия иммунизации, сбора образцов тканей и клеток, получения данных были с успехом апробированы на линии мышей с нокаутом по одной из форм фосфолипазы A2 (sPLA(2)-X), которая участвует в легких в синтезе эйкозаноидов из арахидоновой кислоты (334).

В используемой модели иммунизации и сенситизации сначала проводят интраперитонеальную иммунизацию OVA, который соосажен с гидроксидом алюминия (alum), а затем проводят интраназальную сенситизацию раствором OVA. Через двадцать четыре часа после последнего интраназального введения OVA мы обнаружили усиленное воспаление, проявляющееся примерно в 2,7-кратном увеличении количества лейкоцитов в бронхоальвеолярных смывах (broncho-alveolar lavage, BAL), полученных при промывке фосфатным буфером получавших OVA $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ мышей, по сравнению с контрольными животными $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ (Таблица 2). Кроме того, гистологическое исследование в сочетании с морфометрией легочной ткани у мышей-мутантов показало заметно повышенное количество слизи, увеличение бокаловидных клеток и отек, а также увеличение массы клеточных инфильтратов, связанных с увеличением количества эозинофилов вокруг основных дыхательных путей (рис. 4-9 Б и таблица 2). В соответствии с этими результатами, количественный ПЦР-анализ в реальном времени мРНК легочной ткани, выделенной из получавших OVA животных $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, не выявил заметных изменений в относительном содержании мРНК IL-4, но показал увеличение количества транскриптов IL-5, IL-13 и IFN- γ , по сравнению с контрольными мышами, сенсibilizированными OVA (данные не приведены). Эти результаты также подтверждают результаты иммуноферментного анализа (ELISA) соответствующих цитокинов в экстрактах ткани легкого OVA-иммунизированных и сенсibilizированных $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ мышей.

Для дальнейшей оценки функциональных последствий воспаления легких, наблюдаемых с помощью гистологических методов и анализа содержания клеток BAL, измерили газодинамическое сопротивление легких с помощью инвазивной плетисмографии. В соответствии с протоколом сенсibilizации 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 $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, обработанных физиологическим раствором, не наблюдалось заметного увеличения гиперреактивности дыхательных путей

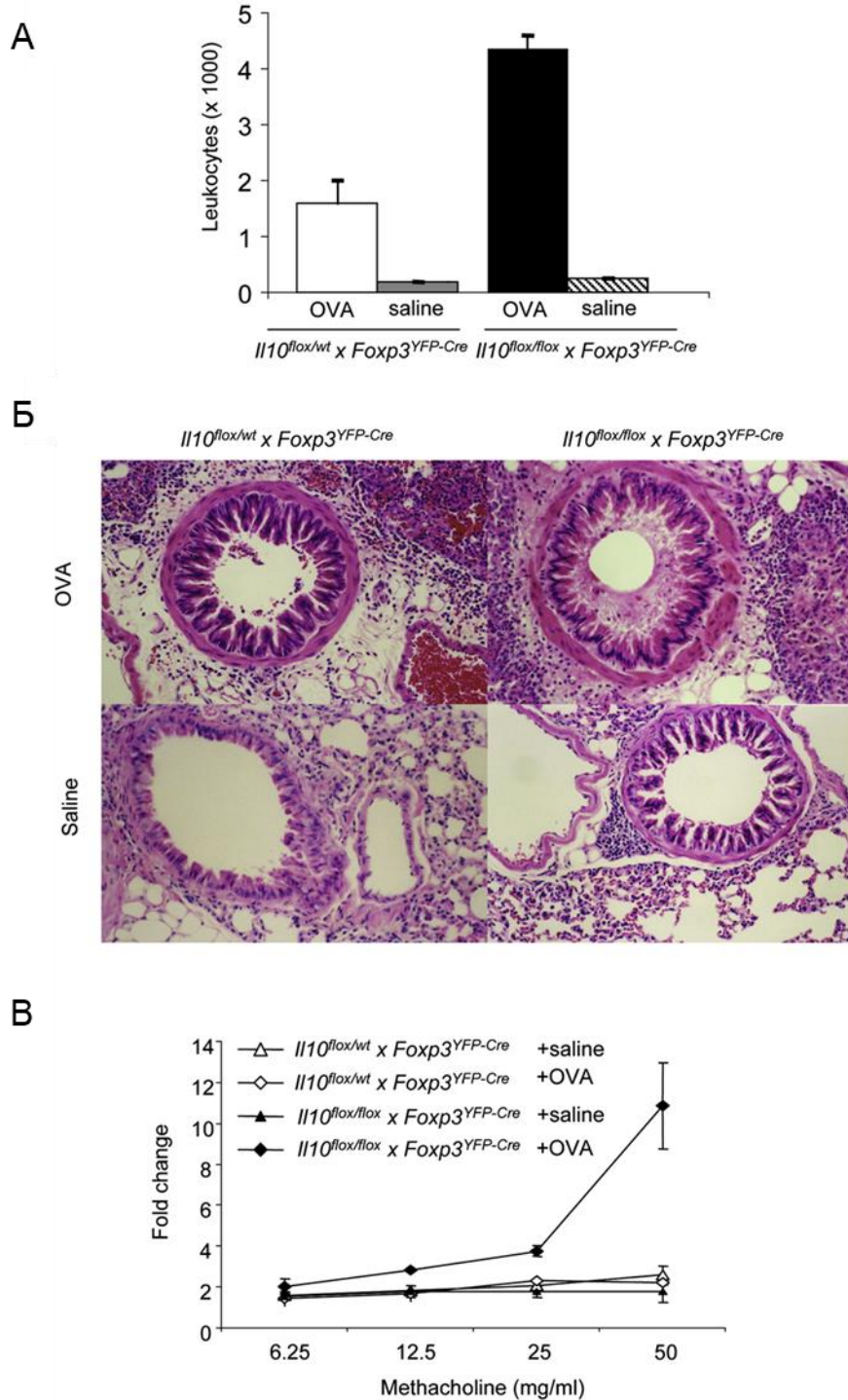


Рисунок 4.9. Увеличение аллергического воспаления легких и гиперреактивности у мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}* (А) Увеличенное количество лейкоцитов в жидкости BAL у мышей *Il10^{WT/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}*, иммунизированных OVA, индуцированных при стимуляции OVA или физиологическим раствором (контроль). Клеточный состав жидкости BAL исследовали, как описано в экспериментальных процедурах. Данные представляют среднее число лейкоцитов BAL ± стандартная ошибка (n=8 на группу в каждом из трех независимых экспериментов). (Б) Гистопатология легких мышей *Il10^{flox/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}*, сенситизированных OVA, и контрольных мышей *Il10^{WT/flox} × Foxp3^{YFP-Cre}*. Мышам, праймированным OVA или физиологическим раствором (контроль), повторно интраназально вводили OVA или физиологический раствора. Представлено пять мышей на группу, было проведено три независимых эксперимента. Исходное увеличение 40X. (В)

Увеличенное газодинамическое сопротивление легких мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, иммунизированных OVA. Индуцированную метахолином резистентность легких измеряли с помощью инвазивной плетисмографии мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольного помета $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, получавших OVA при иммунизации и сенситизации (n=4–5 на группу). Данные представлены как среднее n-кратное изменение значений RL (\pm стандартная ошибка) по сравнению с мышами, не получавшими метахолин. Представлены данные трех независимых экспериментов.

при вдыхании аэрозоли метахолина. Однако мы обнаружили значительное увеличение гиперреактивности дыхательных путей в ответ на вдыхаемый метахолин у $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, получавших OVA, но не у мышей с этим же генотипом, получавших физиологический раствор (рис. 4-9 В). 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+ 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). Вместе взятые, наши данные показывают, что секреция IL-10 клетками Трег, помимо роли в сдерживании воспаления в толстой кишке в ответ на комменсальные микроорганизмы, способствует клеточному Трег-зависимому подавлению иммунологической реактивности в дыхательных путях.

4.1.3.4 Повышенная гиперчувствительность кожи у мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$

Поскольку мы обнаружили, что продукция IL-10 клетками Трег играет существенную важную для контроля воспаления роль в легких и толстой кишке, мы решили исследовать, не влияет ли на развитие индуцированного воспаления дефицит IL-10 в Трег в ещё одной барьерной ткани, а именно, в коже. Первоначальное исследование срезов кожи у мышей $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ не выявило заметного накопления мононуклеаров или утолщения кожи, типичного для ранее описанных мышей с нокаутом по Foxp3, в которых не развиваются Трег, и мышей $Foxp3^{DTR}$, подвергнутых абляции клеток Трег путем введения дифтерийного токсина (26, 35). Для дальнейшего изучения вопроса животных $Il10^{lox/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ и контрольных мышей $Il10^{WT/lox} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ сенсibilizировали, нанося в область бритой кожи живота динитрофторбензол (DNFB). Реакцию гиперчувствительности вызывали, нанося DNFB на одно ухо; другое ухо обрабатывали растворителем. Последующую реакцию гиперчувствительности кожи оценивали по толщине уха,

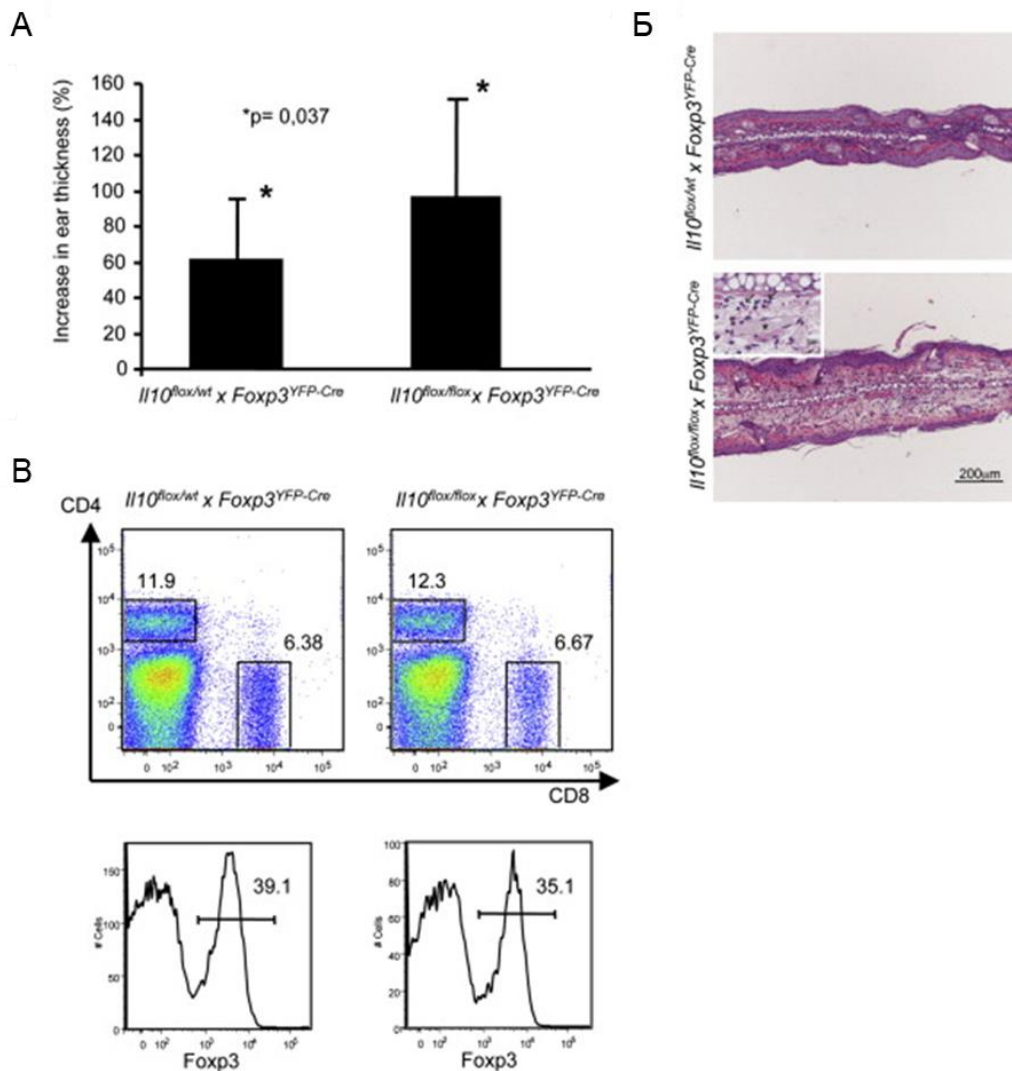


Рисунок 4-10. Повышенная контактная гиперчувствительность кожи у мышей $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$. (А) Увеличение толщины уха у мышей с нокаутом IL-10 в Трег по сравнению с контролем; (Б) Фотография срезов ушей, окрашенных гематоксилином/эозином, после обработки DNFB; (В) Процентное содержание Трег в коже ушей контрольных и нокаутных мышей. На нижних гистограммах приведен процент от CD4 Т-клеток.

измеренной до и после нанесения DNFB. Было выявлено значительное увеличение толщины уха и усиление воспаления у мышей $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$, по сравнению с контрольными животными (рис. 4-10 А и Б). Повышенная гиперчувствительность кожи у мышей $Il10^{flx/flx} \times Foxp3^{YFP-Cre}$ может быть вызвана дефицитом миграции Трег, т. е. их неспособностью мигрировать и оставаться в коже, или сниженной способностью Трег к иммуносупрессии. Для выяснения причины исследовали подмножества CD4+ Т-клеток, выделенных из ушей мутантных мышей. Как и при аналогичных анализах ткани легких и толстой кишки мы обнаружили примерно одинаковые пропорции FoxP3+ CD4+ Т-клеток в коже мутантных и контрольных мышей (рис. 4-10 В). Следует отметить, что экспрессия маркера активации Т-клеток CD69 на не-Трег-клетках была выше у мутантных мышей, чем

у контрольных мышей (данные не представлены). Таким образом, клетки Трег, лишенные продукции IL-10, не столь эффективны в борьбе с воспалением в коже, как их аналоги, способные синтезировать IL-10. 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, который развивается в случае полного отсутствия Трег или выключения их супрессорной функции.

4.1.4. Использование мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}* для выяснения стабильности Трег у взрослых мышей

4.1.4.1. *Экспрессия Foxp3 стабильна в Трег в нормальных условиях в течение длительного периода (всей жизни мыши)*

Непрерывное замещение дифференцированных клеток в некоторых тканях, таких как кишечный эпителий, достигается путем их генерации *de novo* из пула клеток-предшественников (341), тогда как другие ткани с пониженной регенеративной и пролиферативной способностью, такие как центральная нервная система, в значительной степени зависят от клеточного долголетия для поддержания работоспособности. Репликация и самообновление дифференцированных клеток, как показано для панкреатических β -клеток, представляет собой еще один потенциальный механизм, лежащий в основе поддержания ткани (342). Последняя стратегия ставит вопрос о стабильности и пластичности дифференцированного состояния, что особенно важно для пролиферирующих клеточных популяций иммунной системы. Трег, определяемые транскрипционной программой фактора Foxp3, представляют собой особый тип клеток-супрессоров, поддержание которых необходимо в течение всей жизни для предотвращения спонтанного фатального аутоиммунитета (22, 24-26, 35). Нестабильность клеточной судьбы Трег, то есть их способность к дальнейшей дифференцировке в различные типы эффекторных Т-клеток, остается спорной. Многие Трег несут на поверхности ТКР с повышенной аффинностью к пептидным комплексам с МНС (48, 50, 52, 55), а абляция кондиционного аллеля Foxp3 в зрелых Трег-клетках приводит к образованию «бывших» или экс-Трег, способных вызывать воспалительные поражения тканей (28). Таким образом, стабильность экспрессии Foxp3 в базальных и воспалительных условиях является важной детерминантой иммунного гомеостаза и имеет непосредственное отношение к вопросу о том, представляют ли клетки Трег отдельную стабильную клеточную линию или преходящее метастабильное состояние активации. Генетическое маркирование и

отслеживание судьбы клеток предоставляет способ для оценки как стабильности линии, так и идентификации механизмов поддержания гомеостаза ткани *in vivo*.

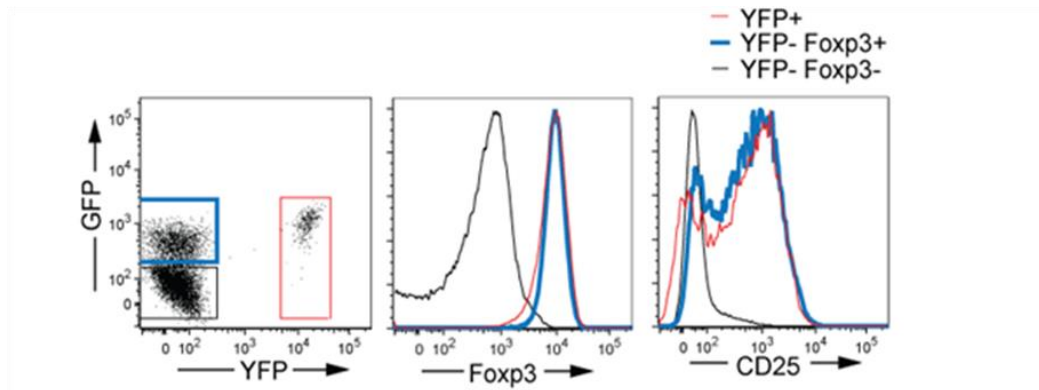


Рисунок 4-11. Индуцируемое мечение Foxp3^+ клеток в мышах $\text{Foxp3}^{\text{eGFP-Cre-ERT2}}\chi\text{R26Y}$. Введение животным тамоксифена (перорально) приводит к образованию трех популяций CD4^+ Т-клеток, различающихся по наличию YFP и GFP. Приведены результаты анализа методом проточной цитометрии уровней CD25 и Foxp3 в популяциях YFP+, YFP-GFP+ и YFP-GFP- клеток. Представлены результаты одного из трех репрезентативных экспериментов, в каждом было по 2 и больше мышей на группу. Введение тамоксифена проводили животным в возрасте 6-8 недель.

Чтобы оценить долговременную стабильность клеток Foxp3^+ Трег в базальных условиях, мышей $\text{Foxp3}^{\text{eGFP-Cre-ERT2}}\chi\text{R26Y}$ обрабатывали тамоксифеном и спустя 2 недели или 5–8 месяцев анализировали содержание Foxp3 в YFP+ CD4^+ Т-клетках (рис. 4-11). Подавляющее большинство YFP+ CD4^+ Т-клеток оставалось eGFP-положительными в лимфатических узлах, селезенке, бляшках Пейера, коже и легких до 5 месяцев после введения тамоксифена (рис. 4-3 А, Б). Этот результат подтвержден внутриклеточным окрашиванием на Foxp3 выделенных с помощью FACS-сортировки клеток YFP+ (рис. 4-5). Кроме того, количество характерных молекул Трег на поверхности клеток, было соизмеримо между клетками YFP+ и YFP+GFP+ (рис. 4-3, рис. 4-12, 4-13), а продукция провоспалительных цитокинов, таких как IL-2 и IFN- γ , была сравнительно низкой в обеих подгруппах (рис. 4-3 Г).

Незначительная популяция клеток eGFP-YFP+, наблюдаемая через 14 дней после мечения, не увеличивалась и, фактически, со временем уменьшалась (рис. 4-3 В). Таким образом, мы не наблюдали заметного «превращения» Трег-клеток и их потомства в

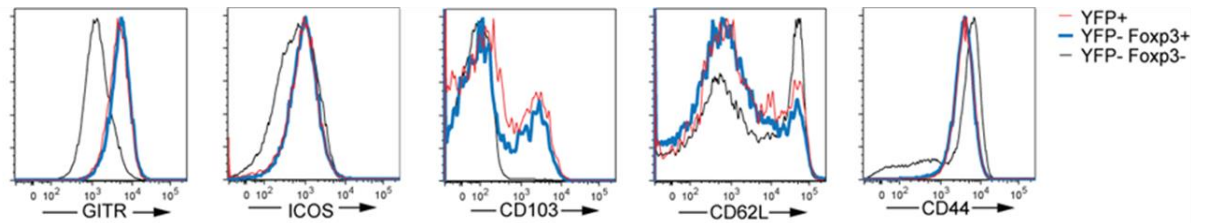


Рисунок 4-12. Меченые YFP Трег фенотипически схожи с немечеными Foxp3⁺ Трег. Оценивали экспрессию маркеров GITR, ICOS, CD103, CD62L и CD44 в популяциях YFP⁺, YFP-GFP⁺ и YFP-GFP⁻ Т-клетках (красный, синий и черный цвет гистограмм, соответственно).

фолликулярные Т-хелперные (TFH) или эффекторные Т-клетки, или де-дифференцировки Трег в наивные Т-клетки в физиологических условиях.

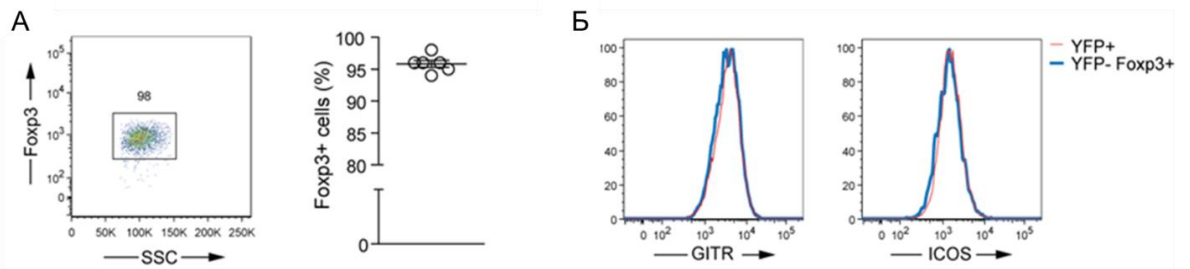


Рисунок 4-13. Сохранение высокого уровня Foxp3 и фенотипа характерного для Трег в клетках меченых YFP. (А) YFP⁺ Т-клетки из селезенки и лимфатических узлов мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2};R26Y* окрашивали на Foxp3 внутриклеточно через 5 месяцев после индукции тамоксифеном; (Б) Уровень маркеров ICOS и GITR в YFP⁺GFP⁺ и YFP-GFP⁺ Трег. Показаны результаты одного из трех воспроизводимых экспериментов ($n \geq 3$ мышей в группе). В момент введения тамоксифена животным было 6-8 недель.

Удивительно, что у зутимированных мышей, доля клеток YFP⁺ Трег среди всех клеток Foxp3⁺ через 5–8 месяцев после мечения была сравнима с долей, наблюдаемой через 14 дней, несмотря на постоянный, хотя и снижающийся с возрастом выход новых Трег из тимуса на периферию (рис. 4-3 Д), Кроме того, тимэктомия не оказала влияния на долю клеток YFP⁺ Трег среди клеток Foxp3⁺ в возрастных мышах (рис. 4-3 Д), что позволяет предположить, что пул периферических Трег-клеток, который характеризуется высокой долей клеток, находящихся в клеточном цикле (рис. 4-14), является не только очень стабильным у взрослых мышей, но и в значительной степени самоподдерживающимся с относительно небольшим вкладом недавних тимусных «эмигрантов».

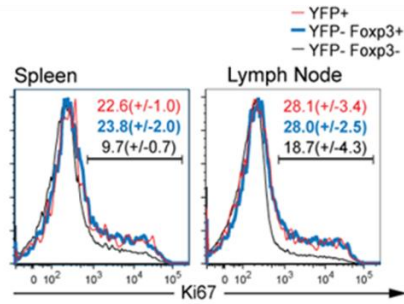


Рисунок 4-14. Профили пролиферации меченых YFP и немеченых GFP+ клеток мышей

$Foxp3^{zeGFP-Cre-ERT2}xR26Y$. YFP+ и YFP-GFP+ Трег похожи по темпу пролиферации, определенному по окрашиванию на внутриклеточный маркер Ki67 CD4+ Т-клеток из селезенки и лимфатических узлов мышей $Foxp3^{zeGFP-Cre-ERT2}xR26Y$ через 5 месяцев после обработки тамоксифеном.

4.1.4.2 Блокирование IL-2 путем хронического введения моноклональных антител негативно влияет на поддержание уровня (снижает уровень) Foxp3 в популяции Трег

Какие условия могут способствовать утрате Foxp3 в Трег в физиологических условиях? Может ли Foxp3 быть утрачен путем деплетирования такого ключевого для Трег внешнего фактора как IL-2? Или для этого нужны инфекция и воспаление? Иначе говоря, неожиданная стабильность натуральных Трег подтолкнула к поиску условий, которые позволят в нашей экспериментальной системе маркирования Трег детектировать потерю Foxp3 Трег. Индукция Foxp3 и гомеостаз клеток Трег зависят от передачи сигналов через

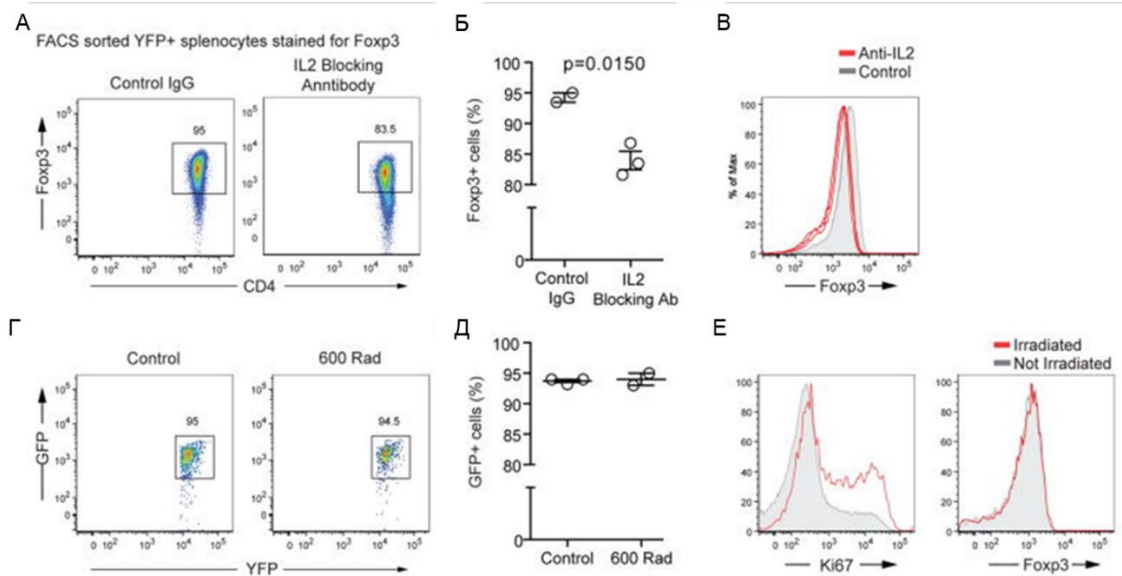


Рисунок 4-15. Депривация IL-2 приводит к небольшому, но заметному снижению уровня Foxp3 в Трег. (А – В) Мышам $Foxp3^{zeGFP-Cre-ERT2}xR26Y$, обработанным тамоксифеном, инъецировали блокирующее антитело IL2 или контрольное IgG, уровень Foxp3 в FACS-отсортированных клетках YFP+ оценивали через 9 дней после начала введения блокирующих антител. (А) Внутриклеточное окрашивание на Foxp3 YFP+ клеток селезенки. Числа представляют проценты клеток в указанных гейтах. (Б) Процент клеток YFP+, экспрессирующих Foxp3. Каждый символ представляет отдельную мышь. (В) Относительная экспрессия Foxp3 в клетках YFP+

из селезенки мышей, обработанных антителом, блокирующим IL2. Данные одного из трех независимых экспериментов ($n \geq 2$ на группу). Мыши были в возрасте 6-8 недель на момент введения антител. (Г – Е) Трег поддерживают стабильный уровень Foxp3 в условиях лимфопении. Лимфопению индуцировали у мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y*, обработанных тамоксифеном, нелетальной дозой облучения (600 рад), анализ проводили через 14 дней после облучения; (Г) Репрезентативный проточно-цитометрический анализ количества Foxp3 в клетках, выделенных из селезенки контрольных и облученных мышей через 14 дней после облучения. Числа представляют проценты клеток в указанных гейтах. (Д) Процент клеток GFP + среди клеток YFP+ в селезенке через 14 дней после облучения. Каждый символ представляет отдельную мышь; (Е) Репрезентативный анализ продукции Foxp3 и Ki67 YFP+ спленоцитами на 14-й день после облучения. Аналогичные данные были получены для клеток, выделенных из лимфатических узлов облученных мышей. Данные получены по результатам 2 и более независимых экспериментов, в каждом из которых было ≥ 2 мыши на группу. Мыши были в возрасте 8–12 недель во время облучения.

рецептор интерлейкина-2 (IL-2) (88, 90, 343-346), а опосредованная антителами блокада IL-2 или IL-2R, согласно существующим данным, вызывает сокращение популяции Трег (344). Таким образом, мы стремились исследовать связь депривации IL-2 зрелых клеток Трег со смертью или потерей экспрессии Foxp3 и сопутствующим приобретением продукции эффекторных цитокинов. Мышам *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y*, 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. 4-15, А – В). Более того, небольшая часть клеток YFP+ была полностью лишена Foxp3. Однако мы не наблюдали де-репрессии генов провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-17, IL-2 и TNF α) клетками YFP+, YFP-GFP+ Трег

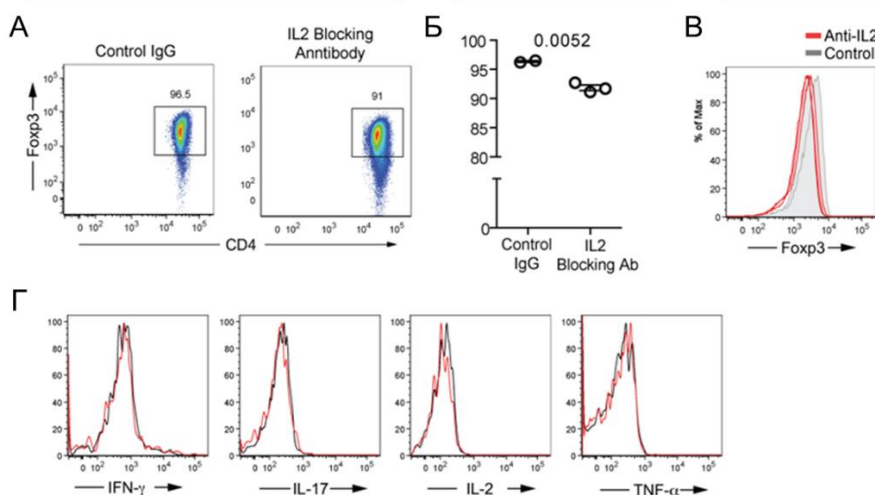


Рисунок 4-17. Депривация IL-2 приводит к небольшому, но достоверному снижению синтеза Foxp3 в Трег (продолжение). (А-В) Обработанным тамоксифеном мышам *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} x R26Y* вводили блокирующие антитела к IL-2 или контрольные IgG, уровень Foxp3 в отсортированных по YFP клетках определяли 9 дней

спустя с помощью внутриклеточного окрашивания антителами и проточной цитометрии. (А) Внутриклеточное окрашивание Foxp3 в YFP+ клетках из лимфатических узлов. Числа – процент клеток в соответствующих гейтах; (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 TNFα. Приведены репрезентативные данные одного из трех независимых экспериментов (n≥2 в группе). На момент введения антител возраст мышей составлял 6-8 недель.

с пониженным уровнем Foxp3 или клетками eGFP-YFP+, которые утратили Foxp3 (рис. 4-17). Эти результаты показывают, что после депривации IL-2 основная масса клеток Трег поддерживала экспрессию Foxp3, хотя и на умеренно сниженном уровне, но достаточную для предотвращения приобретения фенотипа эффекторных клеток. Тем не менее, возможно, что лишение IL-2 в условиях острой фазы инфекции может привести к потере Foxp3 в некоторых клетках Трег (347).

4.1.4.3 Уровень Foxp3 стабилен в условиях лимфопении, вызванной нелетальным облучением

Лимфопения может также способствовать потере экспрессии Foxp3 в активно делящихся клетках Трег. В ранее опубликованных исследованиях по адоптивного переносу Трег использовали очищенные клетки, однако, возможность быстрой экспансии небольшого количества загрязняющих не-Трег клеток и стресс, связанный с переносом клеток, сильно затрудняют однозначную интерпретацию этих результатов. Чтобы обойти данные проблемы, мы использовали сублетальное облучение для оценки стабильности экспрессии Foxp3 в лимфопенических условиях. Мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y*, обработанных тамоксифеном, облучали (600 рад), и долю клеток eGFP+ и Foxp3+ среди T-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+ (4-15, Г –Е). Согласно одному из предположений, модификация 3'UTR гена *foxp3* в мышах *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y* потенциально может привести к увеличению стабильности мРНК Foxp3 или белка. Однако распад мРНК Foxp3 в присутствии актиномицина D в клетках Трег у мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y* был более выраженным,

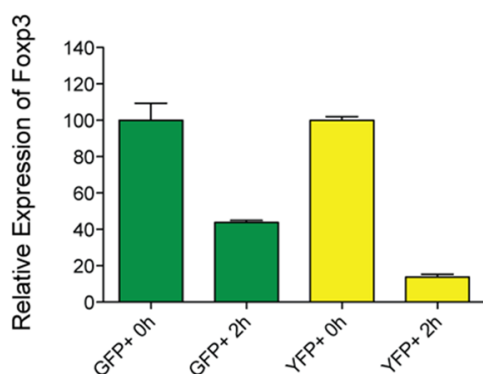


Рисунок 4-18. Стабильность мРНК Foxp3 в клетках мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}хR26Y*. Относительное содержание мРНК Foxp3 в клетках GFP+ и YFP+, выделенных из мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}хR26Y* или *Foxp3^{GFP}* и обработанных актиномицином D в течение 2 часов. Представлены данные одного из двух воспроизводимых экспериментов.

чем в клетках Трег от ранее описанных мышей *Foxp3^{GFP}*, у которых последовательность GFP была встроена в 5'-конец кодирующей последовательности гена Foxp3, оставляя 3'UTR нетронутым (рис. 4-18) (22). Чтобы сравнить стабильность экспрессии белка Foxp3 в клетках Трег у мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}хR26Y* с таковой у мышей Foxp3GFP *in vivo*, клетки CD4+ GFP + из каждой линии мышей дважды очищали с помощью FACS и совместно с Ly5.1+ CD4+ Т-клетками переносили мышам с дефицитом ТКРβ. 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. 4-18), что также поддерживает гипотезу о стабильности клеточной линии Трег и указывает на то, что модификация 3'UTR у мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}хR26Y* не может объяснить это явление.

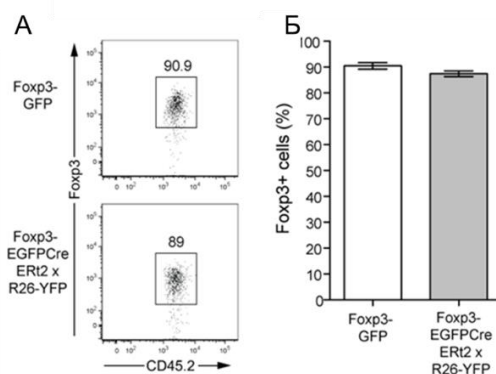


Рис. 4-18. Уровень Foxp3 поддерживается на стабильно высоком уровне при трансплантации Трег клеток мышам с лимфопенией. (А) Клетки GFP+ выделяли из мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}хR26Y* или *Foxp3^{GFP}* и вводили мышам с лимфопенией, показан процент и уровень синтеза Foxp3 в клетках после трансплантации; (Б) Процент Foxp3+ клеток среди конгенных клеток CD45.2 после трансплантации. Столбцы ошибок –

стандартное отклонение от средних значений. Представлены результаты одного из 2 воспроизводимых опытов с тремя мышами.

4.1.4.4 Инфекция *Listeria monocytogenes* или введение моноклональных антител к CD40 (ответ Th1) не влияют на синтез Foxp3 и стабильность популяции Трег

Предыдущие исследования показали, что во время инфекции воздействие на клетки Трег провоспалительными цитокинами приводит к потере экспрессии Foxp3 и превращению клеток Трег в эффекторные Т-клетки, что можно интерпретировать как создание условий, способствующих поляризации эффекторных Т-клеток в нужном направлении (348). Чтобы исследовать судьбу клеток Foxp3+ Трег во время инфекции, мышей *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}xR26Y* обрабатывали тамоксифеном, затем инфицировали сублетальной дозой *Listeria monocytogenes* и анализировали стабильность клеток Трег в момент максимального иммунного ответа. После заражения мы наблюдали значительное увеличение количества белка, отвечающего за развитие Т-хелперов 1 типа, фактора транскрипции T-bet, синтез которого сопровождается увеличением на мембране рецептора хемокинов CXCR3 в клетках Foxp3-, Foxp3 + и YFP + CD4+ (рис. 4-19 А, Б и рис. 4-20 А) и продукцию IFN γ эффекторными CD4+ Т-клетками в ответ на пептид листериолизина О (LLO) (рис. 4-19 В и рис. 4-20 Б). Тем не менее, все клетки YFP+ Трег сохраняли

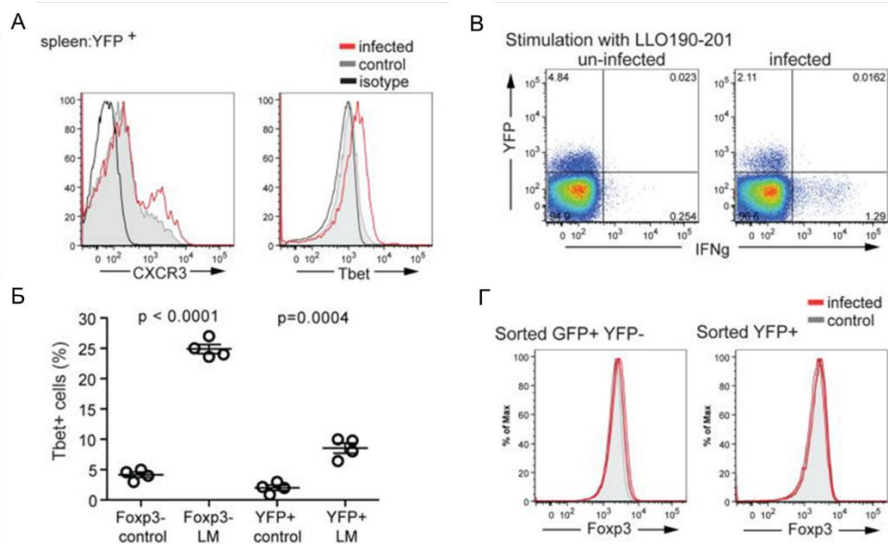


Рисунок 4-19. Воспаление Th1-типа не вызывает потери Foxp3. Обработанные тамоксифеном мыши *Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2} x R26Y* были инфицированы внутривенно 5×10^3 KOE *Listeria monocytogenes*, анализ проводили через 9 дней. (А) Активация T-bet и CXCR3 в спленоцитах YFP+ CD4+ у инфицированных мышей; (Б) Процент положительных по T-bet клеток среди спленоцитов Foxp3- и YFP +, как определено в (А). Каждый символ представляет отдельную мышь; (В) Антиген-специфическая продукция IFN γ в спленоцитах, повторно стимулированных пептидом LLO190-201. Показаны CD4+ Т-клетки; числа представляют проценты клеток в соответствующих квадрантах; (Г) Экспрессия Foxp3 в отсортированных

клетках YFP-GFP + high или YFP + low из инфицированных *L. monocytogenes* или контрольных мышей через 9 дней после заражения. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов с ≥ 2 мышами на группу в каждом. Мыши были в возрасте 6-8 недель на момент заражения.

экспрессию Foxp3 (рис. 4-19 Г), в том числе и клетки с повышенной экспрессией T-bet. Стабильность Foxp3 также наблюдалась в клетках T-bet+ Foxp3+, генерируемых при индукции сильного воспалительного ответа Th1 с доминированием IFN γ при опосредованном антителами перекрестном связывании CD40 (рис. 4-21) (200). Перекрестное связывание CD40 после индуцированного тамоксифеном мечения приводило к заметному увеличению T-bet и CXCR3 в Foxp3+ Трег и Foxp3-клетках (рис. 4-21).

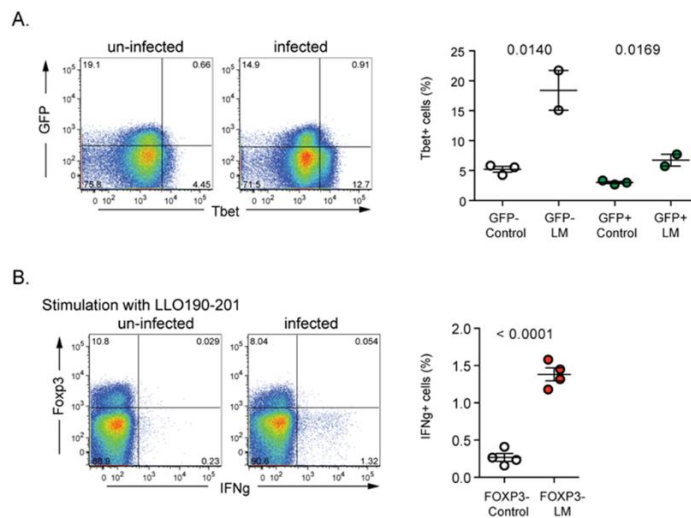


Рисунок 4-20. Инфекция *L. monocytogenes* приводит к увеличению уровня T-bet в Foxp3⁺ и Foxp3⁻ Т-клетках, а также антиген-специфической продукции IFN-g клетками Foxp3⁻; (А) Репрезентативный анализ уровня Tbet в неинфицированных и инфицированных *L. monocytogenes* на день 9 с момента заражения; (Б) Продукция 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 γ и IL-2 (рис. S12). Кроме того, клетки Трег сохраняли экспрессию Foxp3 через 14 дней и до 5 месяцев после кросс-сшивания CD40 (рис. 4-21).

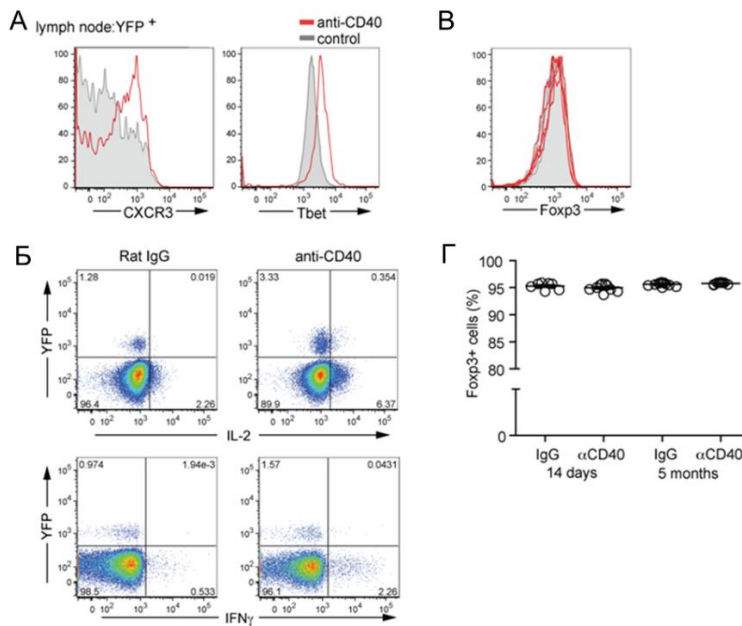


Рисунок 4-21. При воспалении по типу Th1 уровень Foxp3 в Трег стабилен. Обработанным тамоксифеном мышам $Foxp3^{eGFP-Cre-ERT2}$ XR26Y вводили агонистические антитела к CD40 или контрольные антитела, затем анализировали уровень Foxp3 через 14 дней или 5 месяцев после инъекции. (А) Кросс-шивка CD40 антителами индуцирует синтез T-bet в YFP⁺CD40⁺ 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) (по 3 мыши в каждой группе); (В) Процент синтезирующих Foxp3 клеток среди YFP⁺ клеток через 14 дней или 5 месяцев после введения антител к CD40 или контрольных IgG. Каждый символ – отдельная мышь. Представлены репрезентативные данные одного из 3 независимых экспериментов ($n \geq 2$ мыши в группе). Животным на момент начала эксперимента было 6-8 недель.

Таким образом, клетки Трег поддерживают наследуемую экспрессию Foxp3 даже после сильного увеличения количества фактора транскрипции Th1 T-bet в ходе Th1-зависимого ответа на бактериальную инфекцию и вызванного антителом CD40 воспалительного ответа Th1. Недавно было показано, что индукция T-bet и CXCR3 в клетках Трег способствует их способности сдерживать воспаление Th1 (200).

4.1.4.5 Популяция Трег стабильна в условиях аутоиммунного воспаления у мышей со спонтанным диабетом 1 типа

Для оценки стабильности клеток Foxp3⁺ в условиях аутоиммунного воспаления высокоочищенные панкреатические островковые антиген-специфичные GFP⁺ Трег-клетки от NOD. $Foxp3^{sfp}$.BDC2.5 ТКР-трансгенных мышей (322) были перенесены в преддиабетических реципиентов (иммунокомпетентных) NOD.Thy1.1 в возрасте 12 недель, в момент, когда панкреатическая инфильтрация уже хорошо выражена. Четыре недели спустя донорские клетки были обогащены в воспаленной поджелудочной железе, но

сохранили экспрессию Foxp3 и, в отличие от реципиентных эффекторных клеток, не экспрессировали детектируемых количеств IL-17 или IFN γ (рис. 4-22, А – В). В параллельных экспериментах стабильность Трег-клеток оценивали в ТКР-трансгенной модели К/ВхN, в которой реактивность на распространенный аутоантиген приводит к IL-17- и зависимой от кишечной микробиоты продукции артритогенных аутоантител (349). Клетки GFP+ Трег высокой степени очистки от мышей К/ВхN.Foxp3^{gfp} были перенесены 20-дневным реципиентам К/ВхN, т.е. в начале очень сильного воспалительного процесса, и снова оставались почти исключительно Foxp3+, не могли продуцировать IL-17. в лимфоидных органах или тканях, например кишечнике (рис. 4-22, Г – Е). Таким образом, клетки Трег сохраняют стабильную экспрессию Foxp3 и не обнаруживают признаков продукции эффекторных цитокинов в условиях аутоиммунного воспаления.

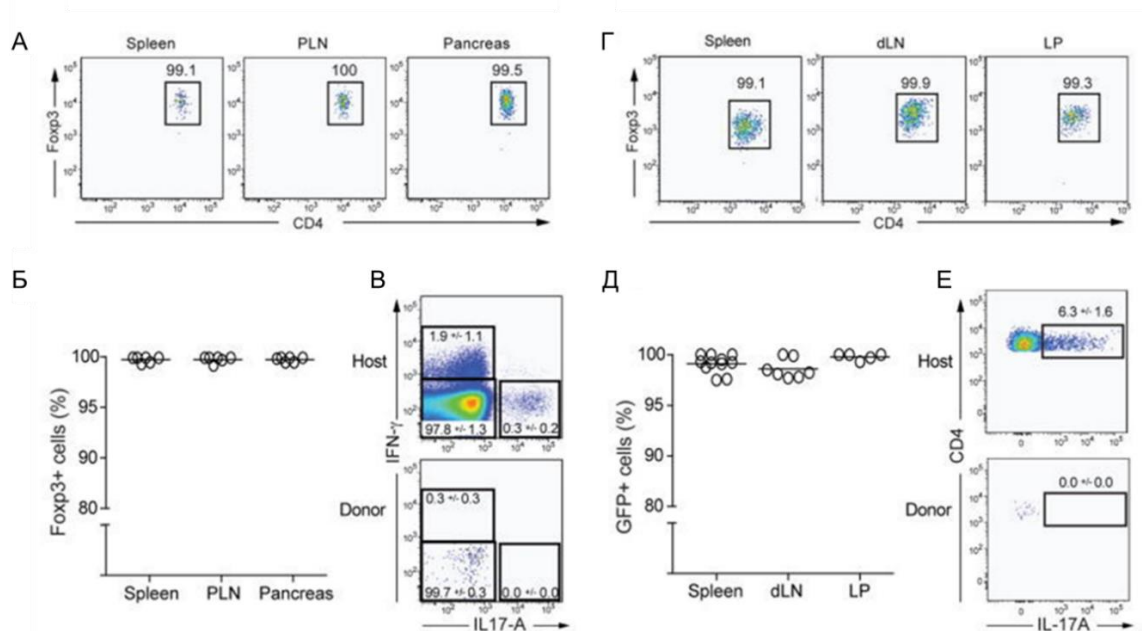


Рисунок 4-22. Уровень Foxp3 стабилен в клетках Трег при аутоиммунном воспалении. (А – В) Высокоочищенные GFP+ клетки мышей BDC2.5.Foxp3^{GFP} были перенесены в 12-недельных пре-диабетических реципиентов NOD.Thy1.1; селезенка, панкреатические лимфатические узлы (PLN) или инфильтраты поджелудочной железы 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 γ + 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^{gfp} были перенесены в соответствующих по возрасту мышей К/ВхN.CD45.2; (Г) Селезенка, дренирующий сустав лимфатический узел и собственная пластинка тонкой кишки lamina propria (LP) были собраны у реципиентов с артритом 35-дневного возраста; CD45.1+CD4+ клетки донора были проанализированных на экспрессию Foxp3-GFP. (Д) Обобщенные данные по отдельным мышам в двух независимых экспериментах. (Е) Экспрессия IL-17a клетками-хозяевами и донорами CD4+ из

собственной пластинки (цифры представляют процент клеток в гейтах \pm SD; $n=3$ на группу). Приведены репрезентативные данные одного из двух независимых экспериментов.

4.1.4.6 Популяция Трег отличается удивительной стабильностью в большинстве условий (в норме, при инфекции и при аутоиммунной патологии (Заключение))

В отличие от наших результатов в исследовании группы под руководством Bluestone сообщали о заметной потере экспрессии Foxp3 в меченных YFP клетках Foxp3 + Трег у трансгенных мышей R26Y x Foxp3-Cre ВАС и приобретении эффекторной функции клетками YFP + Foxp3-T (220). Кроме того, после переноса в лимфопенические реципиенты было обнаружено, что клетки Foxp3+ Трег теряют экспрессию Foxp3 и дифференцируются в клетки TFH в бляшках Пейера (350). Кажущаяся нестабильной экспрессия Foxp3, наблюдаемая в этих и других исследованиях (см. Обзор (220)), может быть вызвана клеточным стрессом, присутствием нескольких загрязняющих Foxp3+ клетки популяций эффекторных клеток или клеток, которые подверглись временной активации Foxp3, либо недавно образовавшимися клетками Foxp3+, которые не успели стабилизировать экспрессию гена Foxp3 на высоком уровне, сохранив способность к делению и дифференцировке в эффекторные Т-клетки в лимфопенических или воспалительных условиях. В соответствии с более поздним представлением, потеря экспрессии Foxp3 незначительной популяцией клеток YFP+ наблюдалась при индукции Foxp3 в периферических клетках YFP-GFP-CD4+ Т в лимфопенических условиях. Клетки YFP+ GFP+ Трег поддерживали экспрессию Foxp3 в этих экспериментах. Кроме того, временная экспрессия Foxp3 в момент ROR γ -зависимой дифференцировки клеток Th17 была визуализирована посредством активации аллеля R26Y рекомбиназой Cre, конститутивно экспрессируемой под контролем эндогенного локуса Foxp3 (144). Наконец, различия в регуляции экспрессии трансгена ВАС Foxp3 и эндогенного локуса Foxp3, кодирующего Cre, также могут влиять на несоответствующие результаты мечения YFP клеток Трег в разных экспериментальных моделях.

Было продемонстрировано, что линия клеток Трег является удивительно стабильной в физиологических условиях и при индукции лимфопении и воспаления. Стабильная экспрессия Foxp3 в коммитированных клетках Трег, вероятно, облегчается положительной ауторегуляторной петлей (80). Наши результаты также показывают, что непрерывное самообновление установленной популяции клеток Трег в сочетании с наследуемым поддержанием экспрессии Foxp3 служит основным механизмом гомеостаза этой линии клеток у взрослых мышей.

4.2 Фактор транскрипции Foxp1 регулирует связывание Foxp3 с хроматином и координирует функцию Трег

4.2.1 Введение. Родственный Foxp3 белок Foxp1, вероятно, играет важную роль в поддержании фенотипа и функции Трег

Foxp3 является членом семейства консервативных факторов транскрипции Foxp (Foxp1–4), которые регулируют дифференцировку разных типов клеток. Все белки Foxp содержат домен цинкового пальца и на (N) -конце несут мотив лейциновой молнии к консервативный ДНК-связывающий домен forkhead. Факторы транскрипции Foxp способны к гомо- и гетеродимеризации, которая, как полагают, усиливает их связывание с относительно низкоаффинным консенсусным мотивом (146, 147, 351).

Другой член семейства Foxp, Foxp1, играет важную роль в системе приобретенного иммунитета, способствуя раннему развитию В-клеток, противодействует дифференцировке фолликулярных хелперных Т-клеток (ТФН-клеток) и сохраняет наивные Т-клетки в неактивированное состояние (блокируя их спонтанную активацию). Foxp1 в больших количествах присутствует в ядрах наивных Т-клеток, причем его количество значительно снижается при их активации (352-355). Foxp1 образует гомодимеры и может также гетеродимеризоваться с Foxp3, который образует крупные белковые комплексы в клетках Трег (356, 357). Эти наблюдения побудили нас выяснить, совпадают ли сайты связывания Foxp3 с теми, которые занимает Foxp1 в наивных Т-клетках, и происходит ли вытеснение Foxp1 во время дифференцировки клеток Трег и его замена на Foxp3. Этот сценарий предполагает, что Foxp1 играет избыточную роль в клетках Трег. Возможно также, что Foxp1 в клетках Трег посредством кооперативного связывания с сайтами, занятыми совместно с Foxp3, участвует в Foxp3-опосредованной регуляции экспрессии генов.

4.2.2 Большинство участков связывания Foxp1 и Foxp3 с хроматином Трег совпадают

Чтобы определить, совпадают ли сайты связывания Foxp3 и Foxp1 в хроматине разных типов Т-клеток, мы использовали результаты ChIP-seq анализа образцов хроматина, выделенного из Трег и наивных Т-клеток Т_{наив}. Анализ результатов ChIP-seq Foxp1 и Foxp3 позволил идентифицировать 3071 и 7147 сайтов, с которыми определенно связаны Foxp1 и Foxp3 в клетках Трег, соответственно (PDR-скорректированный $p < 0.01$, рис. 4-23а). 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. 4-23 а). В наивных клетках Tnaiv мы определили 1088 пиков, достоверного связывания Foxp1 (скорректированы с учетом ложного обнаружения (FDR) $p < 0,01$, рис. 4-23 b), более 95% этих пиков связывания Foxp1 удается обнаружить в хроматине Treg при использовании ослабленного порога сигнала (рис. 4-23 b). В то время как более половины сайтов, связанных с Foxp3, находятся в интронных и межгенных областях, в этих регионах было менее 30% сайтов, связанных с Foxp1. Скорее, связывание Foxp1 происходит преимущественно с промоторами генов в клетках Treg (рис. 4-23 c). Удивительное совпадение пиков связывания Foxp3 и Foxp1 заслуживает особого внимания, поскольку крайне маловероятно, чтобы два несвязанных профиля ChIP-seq столь сильно коррелировали друг с другом (358). Высота пиков сигнала ChIP для Foxp3 пиков общих для Foxp1 и Foxp3 в клетках Treg немного выше, чем высота пиков ChIP, с которыми связан только Foxp3, тогда как для Foxp1 наблюдалось обратное (Рис. 4-23 d, e).

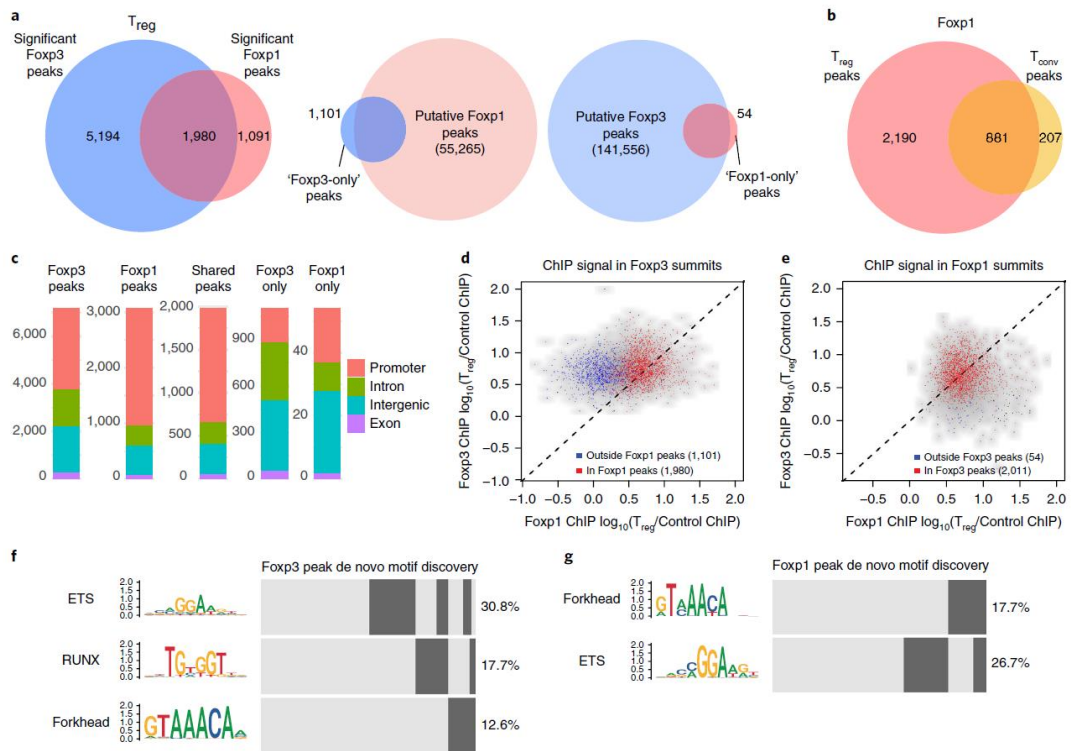


Рисунок 4-23. Большинство сайтов связывания Foxp1 и Foxp3 совпадают. а, Диаграмма Венна сайтов связывания Foxp1 и Foxp3 с хроматином Treg (FDR-скорректированный $p < 0,01$) (слева). Диаграммы Венна значимых пиков Foxp1 и Foxp3, не перекрывающихся с предполагаемыми пиками другого транскрипционного фактора при сниженном пороговом значении ($p < 0,1$, см. Методы) (в центре и справа). б, Диаграмма Венна сайтов связывания Foxp1 в клетках Treg и Tconv (FDR-скорректированный $p < 0,01$). с, 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). е, 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. См. раздел Методы для подробного объяснения определения значимых и предсказанных пиков.

Для идентификации мотивов, которые преимущественно встречаются в местах связывания и Foxp1, и Foxp3 мы провели процедуру поиска мотивов *de novo*, используя алгоритм HOMER (359). 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 (150). 12,6% пиков Foxp3 и 17,7% пиков Foxp1 содержали канонический мотив forkhead (Рис. 4-23 f, g). Причем в большинстве пиков, которые содержали мотив forkhead, он присутствовал единожды. При учете всех отдельных случаев появления мотива forkhead рядом с вершиной пика связывания с использованием ослабленного порога совпадения мотивов мы обнаружили 1 625 пиков Foxp3 из 7 174 с, по крайней мере, однократным присутствием мотива forkhead. Однако только 102 пика связывания Foxp3 (1.4% от общего числа) содержали два или большее число мотивов forkhead, что не превышает ожидаемого значения, если предположить, что распределение мотивов между пиками носит случайный характер (см. раздел методы). Из этих 102 пиков, 57 содержали два мотива связывания forkhead на расстоянии 20 пар оснований (п.о.) или больше. Маловероятно, что оба домена forkhead в гомодимере Foxp3 одновременно связаны с близко расположенными мотивами связывания forkhead в ДНК (360). Эти гомодимеры, возможно, способствуют формированию контактов между сильно удаленными участками хроматина, сближая два разных сайта связывания с ДНК, что требует одного forkhead домена на каждый сайт связывания/регуляторный элемент. Кроме того, также возможно, что каждый мономер в составе димера связывает ДНК только в течение определенного времени (361). Пики связывания Foxp1 и Foxp3 содержат мотивы связывания белков семейства Ets (26.7% и 30.8%, соответственно) и 17.7% пиков Foxp3 содержат мотивы связывания Runx (рис.4-23 f, g). Факт, что лишь относительно небольшой процент пиков Foxp1 и Foxp3 содержат мотив связывания forkhead, согласуется с полученными ранее данными о том, что другие факторы транскрипции, участвующие в формировании комплексов с Foxp3, могут также участвовать в связывании с ДНК (80,162). Суммируя

представленные результаты, можно констатировать, что Foxp1 преимущественно связан с сайтами связывания Foxp3 в хроматине.

4.2.3 Трег-специфический нокаут Foxp1 у мышей с кондиционным аллелем гена *Foxp1*, скрещенных с мышами линии *Foxp3^{YFP-Cre}*

Мы предположили, что отсутствие Foxp1, и, как следствие, неспособность Foxp3 образовывать гетеродимеры с Foxp1, могло бы привести к снижению связывания Foxp3 с сайтами, которые 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 сниженному 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 «флуксированный» 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. Полученные животные с кондиционным аллелем Foxp1 нормально развивались и даже в виде гомозигот не проявляли заметных признаков спонтанных патологий, связанных с активацией иммунной системы. Данную линию животных с кондиционным аллелем Foxp1 скрестили с описанной выше линией *Foxp3^{YFP-Cre}* для получения мышей, у которых бы только в Трег отсутствовал белок Foxp1 (рис. 4-24). Гомозиготные по кондиционному аллелю Foxp1 животные по мере взросления проявляли признаки умеренной активации иммунной системы, выражающейся в увеличении числа активированных по фенотипу лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах.

4.2.4 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 (см. методы), выявил, что число сайтов со значительным связыванием Foxp3 снижено в Трег, нокаутных по Foxp1 (362). (рис. 4-25 а). Более того, сигнал Foxp3 ChIP был преимущественно снижен в Foxp1-дефицитных Трег во всех сайтах связывания Foxp3, а не только в сайтах, с которыми также связан Foxp1 (рис. 4-25 б). Этот результат указывает на то, что делеция Foxp1 в синтезирующих Foxp3 клетках может приводить к перераспределению Foxp3 в масштабах генома (рис.4-25 с).

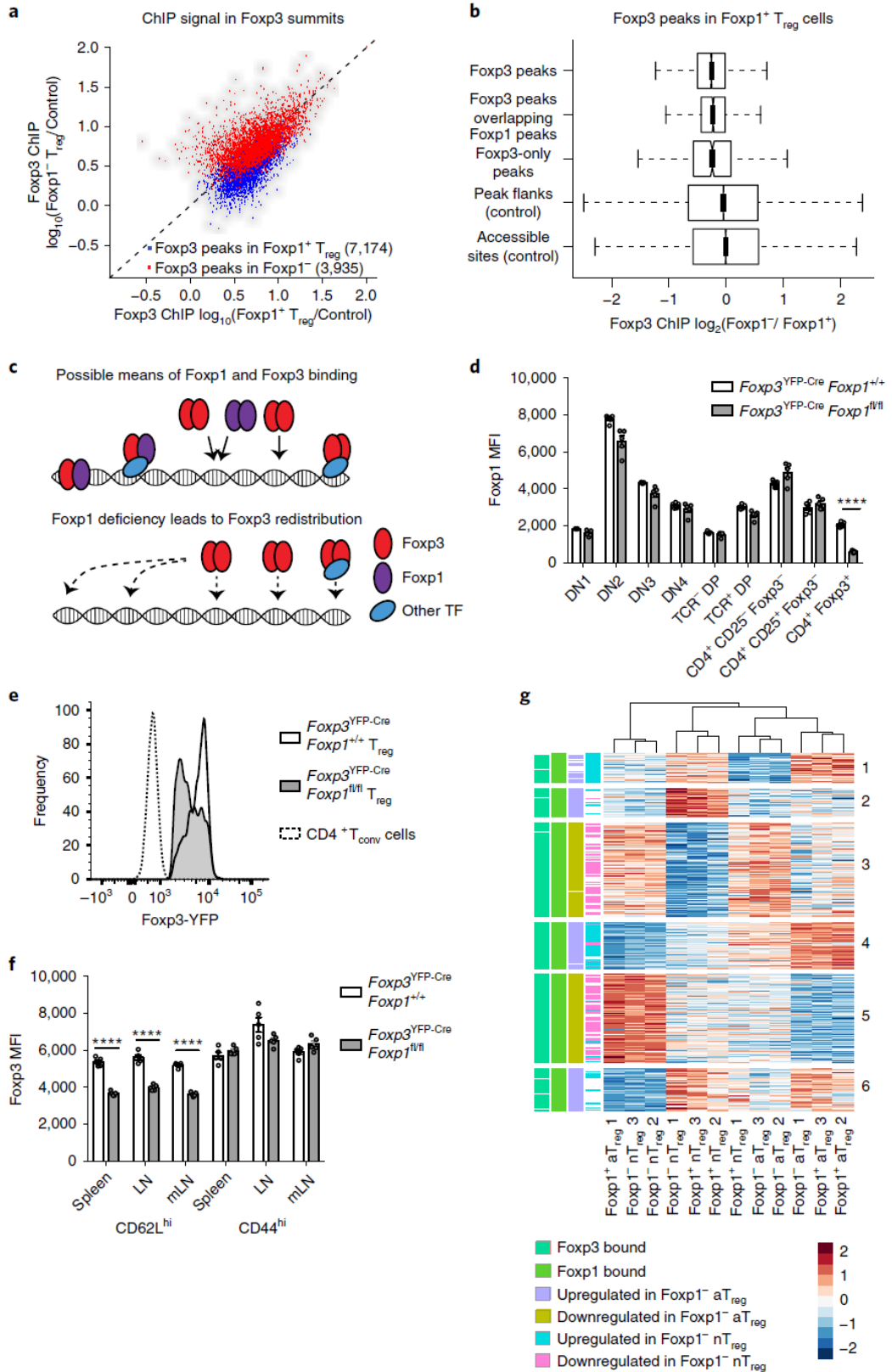


Рисунок 4-25. Связывание Foxp3 с ДНК снижается в отсутствие Foxp1. а, Диаграмма распределения сайтов связывания Foxp3 в клетках Foxp1⁺ и Foxp1⁻ Трег (FDR-скорректированный P<0,01). См. раздел Методы для подробного объяснения определения значимых пиков; б, Диаграмма разброса интенсивности связывания Foxp3 по данным ChIP в клетках Foxp1⁻ / Foxp1⁺ Трег для пиков, которые перекрываются с пиками связывания Foxp1 (n=1,980), для пиков 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 $\text{медиана} \pm 1,57 \times \text{IQR} / (\sqrt{\text{размера выборки}})$, 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 ($n=5$ биологически независимых мышей на группу, представляющих три независимых эксперимента, столбцы ошибок представляют s.e.m. центрированных по средним значениям, **** $p < 0,0001$, по непарному двустороннему критерию Стьюдента); e, Репрезентативная гистограмма уровня белка Foxp3 в наивных клетках Foxp1+ и Foxp1- Трег и в наивных клетках Tconv из объединенных дренирующих кожу лимфатических узлов (приведены результаты одного из трех независимых экспериментов). f, суммарный график MFI Foxp3 в клетках Foxp1+ и Foxp1- Трег 8-10 недельных мышей-самцов ($n=5$ биологически независимых мышей на группу, приведены результаты одного из трех независимых эксперимента, столбцы ошибок представляют полуцентрированную среднюю величину, **** $p < 0,0001$, использован непарный двусторонний критерий Стьюдента); g, Тепловая карта дифференциально экспрессированных (скорректированных с помощью FDR $P < 0,01$) генов, связанных с пиками Foxp1, разделенных на группы с использованием кластеризации k-средних. Тест статистической значимости дифференциально экспрессируемых генов подробно описан в разделе Методы и является двусторонним.

Синтез Foxp1 в процессе созревания Т-клеток впервые происходит на стадии двойных негативных тимоцитов стадии 2, мы показали, что уровень экспрессии Foxp1 повышен в предшественниках Трег (Рис. 4-25 d). Чтобы исключить возможность, что снижение связывания Foxp3 на геномном уровне может произойти из-за уменьшения количества Foxp3, мы определили содержание Foxp3 в Foxp1-дефицитных и нормальных CD62L^{hi} (неактивированных) Трег и активированных CD44^{hi} Трег с помощью окрашивания антителами и проточной цитометрии. Мы обнаружили небольшое снижение количества Foxp3 в Foxp1-дефицитных наивных Трег и константный уровень Foxp3 в активированных Трег, независимо от присутствия Foxp1 (Рис. 4-25 e, f). Уровень мРНК Foxp3 был также понижен в Foxp1-дефицитных Трег, что может указывать на то, что причиной снижения уровня белка Foxp3 может быть нарушенная транскрипция гена Foxp3 в отсутствие Foxp1. Следует отметить, что больший 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 больших пиков сильного связывания Foxp3 (3935 против 7174 в контроле). Эти данные согласуются с предложенной моделью «разбавления» Foxp3, объясняющей сниженное связывание Foxp3 в отсутствие Foxp1.

4.2.5 Foxp1-зависимая регуляция активности генов в Трег

Чтобы определить влияние потери Foxp1 на экспрессию генов в Трег, был проведен анализ RNA-seq YFP⁺ CD62L^{hi} наивных и CD44^{hi} активированных Трег. Поскольку быдо обнаружено, что у мышей *Foxp3^{YFP-Cre} Foxp1^{fl/fl}* есть признаки умеренной активации иммунной системы, был проведен RNA-seq анализ Трег, выделенных из здоровых гетерозиготных самок *Foxp3^{YFP-Cre/+} Foxp1^{fl/fl}* и *Foxp3^{YFP-Cre/+} Foxp1^{+/+}*. Вследствие случайной инактивации X-хромосомы такие животные будут содержать одновременно Foxp1-дефицитные и нормальные Трег с «обычным» количеством Foxp1. Была осуществлена кластеризация по методу k-средних генов, которые были связаны с Foxp1 в клетках Трег и дифференциально экспрессированы в Foxp1-дефицитных и Foxp1-достаточных Трег (приведенное по FDR $p < 0.01$), а также проведен анализ онтологии генов для шести идентифицированных кластеров (Рис. 4-25, г).

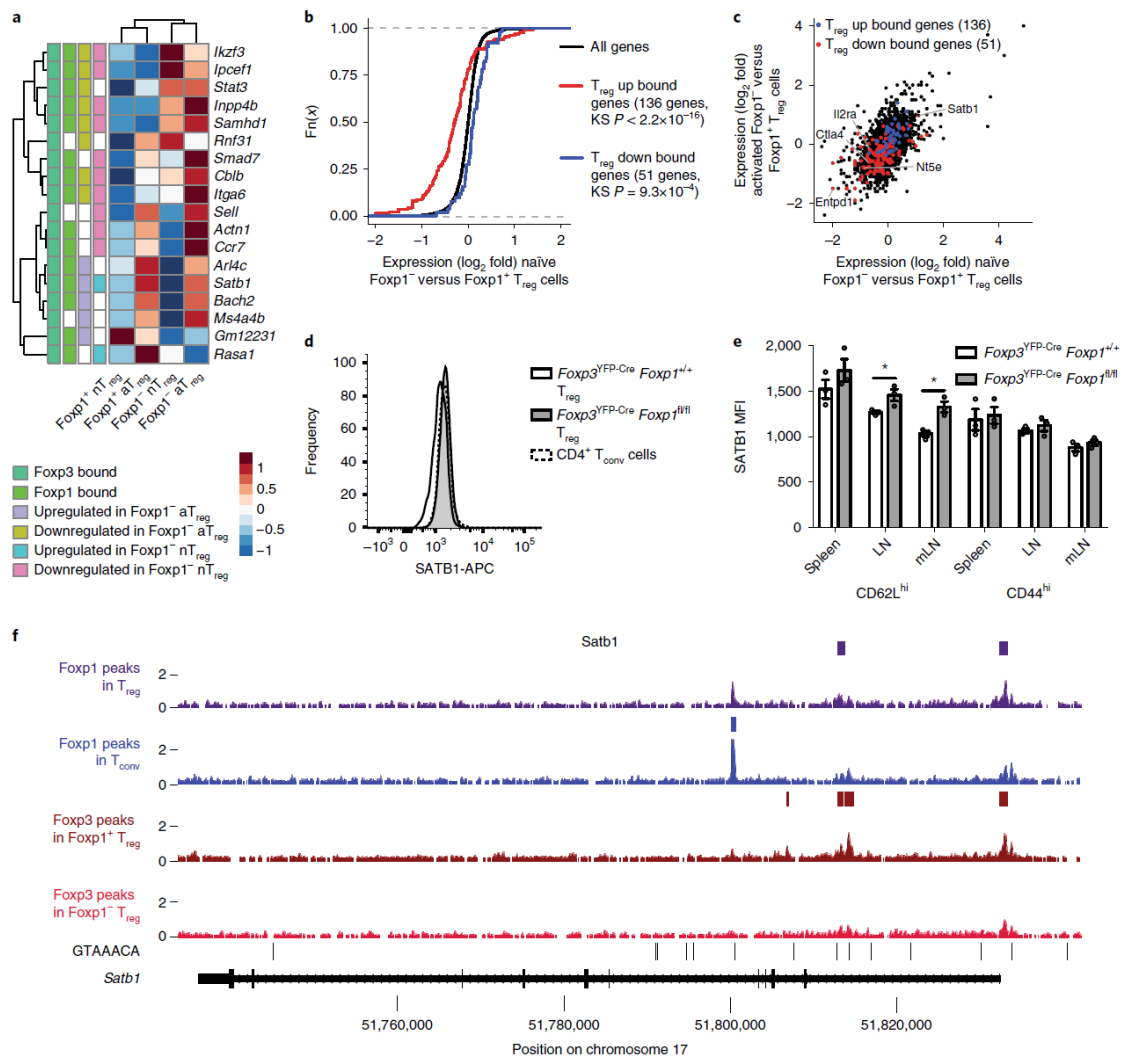


Рисунок 4-26. Foxp1-зависимая регуляция экспрессии генов в клетках Трег. а, «Тепловая» карта, сравнивающая экспрессию генов между Foxp1⁺ и Foxp1⁻ наивными и активированными клетками Трег из гетерозиготных самок мышей *Foxp3^{YFP-Cre/+} Foxp1^{+/+}* или *Foxp1^{fl/fl}* для подмножества генов, связанных с пиками

ChIP Foxp3, со значительно более высоким сигналом ChIP-seq Foxp3 в *Foxp1^{+/+}* клетках. b, График кумулятивного распределения, показывающий экспрессию сигнатурных генов Трег, связанных с пиками Foxp3 или Foxp1, в наивных клетках *Foxp1^{-/-}* или *Foxp1^{+/+}* Трег. Значения *p* рассчитаны с использованием двустороннего критерия Колмогорова–Смирнова (KS), сравнивающего сигнатурные гены Трег со всеми генами. c, График изменения кратности сигналов, показывающий изменения экспрессии сигнатурных генов Трег, связанных с пиками Foxp3 или Foxp1, в наивных и активированных клетках *Foxp1^{-/-}* или *Foxp1^{+/+}* Трег; d, Репрезентативная гистограмма уровня белка SATB1 в наивных клетках *Foxp1^{-/-}* или *Foxp1^{+/+}* Трег и в наивных клетках Tconv (приведены результаты одного из двух независимых репрезентативных экспериментов). e, Сводный график MFI SATB1 в *Foxp1^{-/-}* или *Foxp1^{+/+}* Трег клетках самцов мышей в возрасте от 8 до 10 недель (n=3 биологически независимых мыши на группу, представлены результаты одного из двух независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднее квадратичное отклонение, * *p*=0,048 (слева) и * *p*=0,012 (справа), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). f, Распределение сигнала ChIP-seq Foxp3 и Foxp1 в локусе *Satb1*. Три биологических повторения ChIP-seq для каждого генотипа, за исключением клеток *Foxp1⁺* Трег, для которых использовали две повторности.

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. Известно, что Foxp1 играет важную роль в этих тканях и участвует в процессах их развития (363-366). Соответственно, было обнаружено множество генов, связанных с развитием перечисленных органов, в частности, *Arntl*, *Cited2*, *Hdac4*, *Nr4a1*, *Chd7*, *Dnajb6*, *H3f3b* и *Spo11*, для которых характерна дифференциальная экспрессия в Foxp1-дефицитных Трег, и которые являются прямыми мишенями Foxp1. Связывание Foxp1 с локусами этих генов не было описано ранее, за исключением гена *Cited2*(367). Эти данные свидетельствуют, что Foxp1 может прямо регулировать экспрессию этих генов, влияя одновременно на процессы эмбрионального развития и функционирования Трег. Кластер 5 содержит гены, которые наиболее сильно экспрессированы в активированных Трег и снижены в Foxp1-дефицитных Трег, по сравнению с нормальными Foxp1-достаточными Трег. Этот кластер включает гены активации Т-клеток *Cd83*, *Ctla4*, *Ikzf3*, *Hivep3*, *Nfatc1*, *Nfkb2*, *Prdm1*, *Relb*, *Rora* и *Smad3*, и обогащен генами, участвующими в развитии иммунной системы, активации лейкоцитов, регуляции экспрессии генов и позитивной регуляции сигнальных путей апоптоза.

Гены, дифференциально экспрессированные в Foxp1-дефицитных и нормальных наивных и активированных Трег, которые сильнее связывают Foxp3 в нормальных по Foxp1 Трег, представлены *Itgab*, *Smad7* и *Satb* (рис. 4-26 а). Большинство этих генов также связывают Foxp1. Используя ранее опубликованный список характеристических для Трег генов, который состоит 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, которые содержат пики связывания Foxp1 или Foxp3 согласно ChIP-seq (рис. 4-26 b, c) (142). 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. 4-26 b). В Трег экспрессия геномного организатора Satb1 репрессирована в Foxp3-зависимой манере, и эта репрессия важна для их функции (205). Форсированная продукция Satb1 приводит к потере супрессорной функции и продукции эффекторных цитокинов (204). Foxp1-дефицитные Трег производят больше мРНК и собственно белка Satb1, чем нормальные Трег «дикого типа» (Рис. 4-26 c-e). Чтобы понять, регулирует ли Foxp1 экспрессию Satb1 в обычных Т-клетках, мы оценили количество Satb1 в обычных Т-клетках, дефицитных по Foxp1, из мышей *CD4-Cre Foxp1^{fl/fl}*, используя окрашивание антителами и цитофлуориметрию, и выяснили, что уровень SATB1 не меняется при нокауте Foxp1. Было обнаружено, что 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. 4-26 f). В совокупности, наши результаты свидетельствуют, что помимо «помощи» Foxp3, Foxp1 играет самостоятельную особую роль в репрессии гена Satb1 в Трег.

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

Выключение Foxp1 в Трег приводит к умеренному увеличению размера лимфатических узлов и селезенки (рис. 4-27 a), что заметно отличается от фенотипа мышей *CD4-Cre Foxp1^{fl/fl}* с нокаутом Foxp1 в CD4 и CD8 Т-клетках, для которых характерно снижение общего числа Т-клеток в селезенке и лимфатических узлах. Пропорция CD4+ Т-клеток с фенотипом Foxp3+ в лимфатических узлах была снижена примерно вдвое (рис. 4-27 b, c). Foxp1-дефицитные Трег сильнее активированы, о чем можно судить по уровню CD44 на поверхности клеток, также они проявляют более высокую пролиферативную активность, согласно уровню Ki-67, по сравнению с нормальными Трег (Рис. 4-27 d, e). Foxp1-дефицитные Трег продуцировали больше IFN-g при стимуляции *in vitro* форболовым эфиром РМА и иономицином, по сравнению с контрольными нормальными Трег (Рис. 4-27f). Эти признаки активации были схожи с таковыми у Foxp1-дефицитных CD4+ и CD8+ Т-клеток. Активация Foxp1-дефицитных CD4+ и CD8+ Т-клеток была связана с повышенной экспрессией рецептора IL-7 (IL7R), благодаря дерепрессии локуса *Il7ra* и

повышенной IL-7-зависимой пролиферации (354). Известно, что Foxp3 также регулирует экспрессию альфа цепи рецептора IL-7 (IL-7R α), поэтому интересно было исследовать,

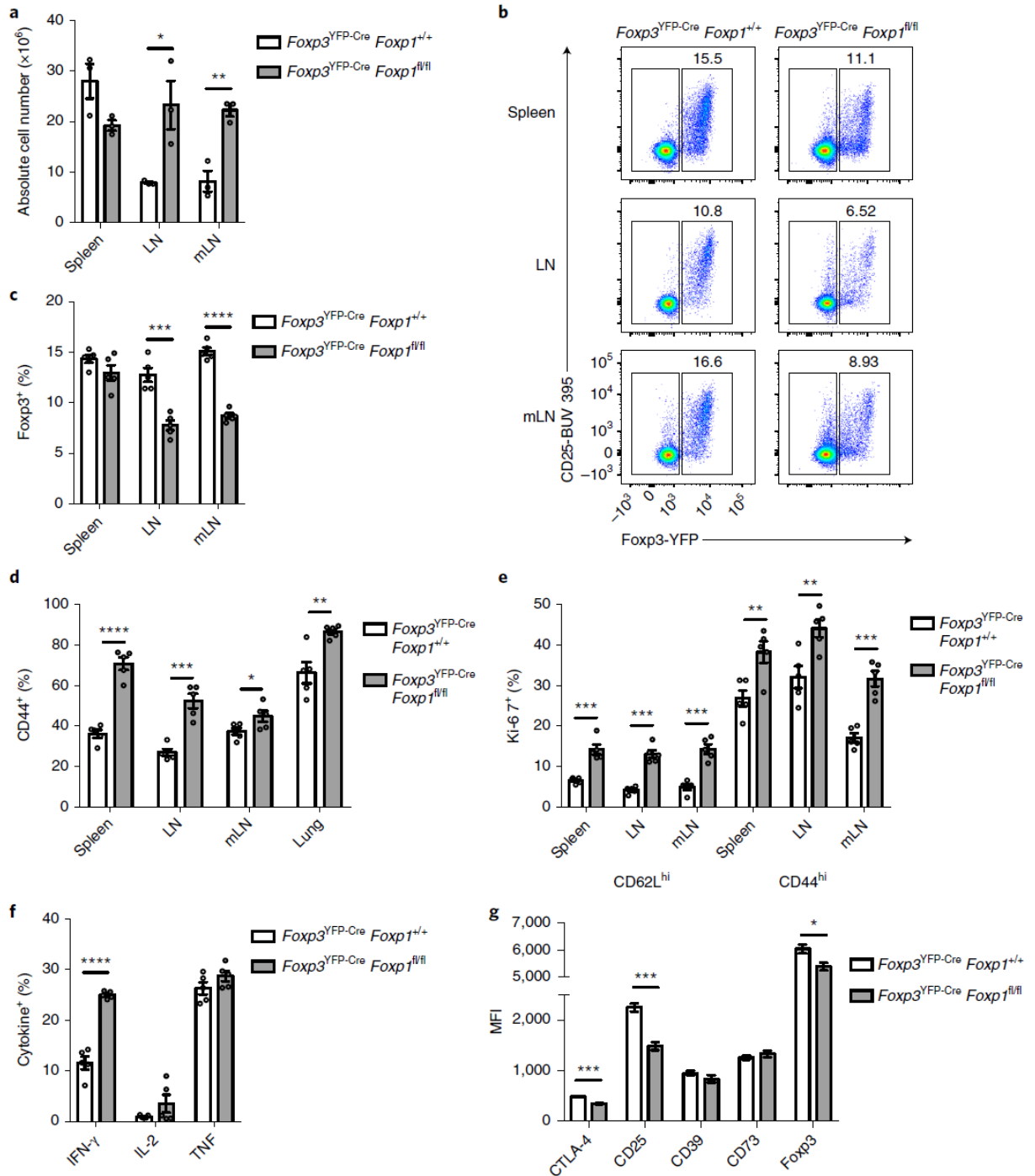


Рисунок 4-27. Дефицит Foxp1 вызывает активацию клеток Трег и продукцию эффекторных цитокинов. а, Число клеток селезенки, лимфоцитов из дренирующих кожу лимфатических узлов (LN) и брыжеечных лимфатических узлов (mLN) самцов мышей 10-недельного возраста (n=3 биологически независимых мыши на группу, представлены результаты одного из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют s.e.m. центрированных по средним значениям, * $p=0,032$, ** $p=0,0043$, использован непарный двусторонний критерий Стьюдента). б, Репрезентативные графики анализа методом проточной цитометрии суспензий CD4⁺ Т-клеток селезенки, лимфатических узлов, дренирующих кожу и брыжеечных

лимфатических узлов самцов мышей 10-недельного возраста, показывающие уровни белка Foxp3 и CD25 (показаны результаты одного из нескольких независимых экспериментов). с, Сводный график частоты Foxp3+ Т-клеток среди CD4+ Т-клеток в селезенке, лимфатических узлах и брыжеечных лимфатических узлах у мышей 10-недельного возраста (= 5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких экспериментов, столбцы ошибок представляют собой s.e.m. полуцентрированные по средним значениям *** $p=0,0003$, **** $p=0,0001$, использован непарный двусторонний критерий Стьюдента). d, Частота CD44^{hi} Трег-клеток среди Foxp3+ Трег-клеток в различных органах (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднее квадратичное значение, **** $p=0,0001$, *** $p=0,0002$, * $p=0,049$, ** $p=0,0054$, использован непарный двухсторонний критерий Стьюдента). e, частота клеток Ki-67+ Трег среди всех наивных CD62L^{hi} или активированных клеток Трег CD44^{hi} (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднее квадратичное значение, *** $p=0,0003$, *** $p=0,0001$, *** $p=0,0001$, ** $p=0,0087$, ** $p=0,009$, *** $p=0,0002$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). f, частота цитокин-продуцирующих Трег среди всех Трег селезенки через 3 часа стимуляции *in vitro* PMA и иономицином в присутствии брефелдина А (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют S.E.M., **** $p<0,0001$, использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента); g, Уровень белка (MFI) нескольких характерных для Трег белков в Трег-клетках селезенки самцов мышей (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднее квадратичное значение, *** $P=0,0001$, *** $P=0,0002$, * $P=0,036$ (слева направо), использован непарный двусторонний критерий Стьюдента).

приводит ли дефицит Foxp1 в Трег к увеличению уровня IL-7R на поверхности клеток и пролиферации в ответ на IL-7. Мы установили, что количество IL-7R α , а также пролиферация в ответ на IL-7, не зависят от присутствия 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.

4.2.7 Дефицит Foxp1 в Трег вызывает снижение способности 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. Трег из мышей генотипа *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}* содержат значительно меньшие количества CD25 и CTLA-4 (Рис. 4-27 g). Следует отметить, что индукция CD25 при стимуляции ТКР не менялась в Foxp1-дефицитных обычных Т-клетках по сравнению с контролем. Мы изучили

супрессорную функцию Foxp1-дефицитных Трег. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки сильнее активированы и быстрее пролиферируют в мышях с Foxp1-дефицитными Трег по сравнению с Трег из контрольных животных (рис. 4-28 а, b). Также было обнаружена повышенная продукция IFN- γ и IL-2, но не IL-4 или IL-17 CD4⁺ Т-клетками, и повышенная продукция IFN- γ CD8 Т-клетками (рис. 4-28 с, d). Был также проведен адоптивный перенос Foxp1-дефицитных и контрольных Трег с Т-клетками, выделенными из мышей *Foxp3^{DTR}* (Трег на поверхности несут рецептор дифтерийного токсина) в без-Т-клеточных реципиентов, после чего мышам вводили дифтерийный токсин, чтобы избавиться от Трег из мышей-доноров *Foxp3^{DTR}*.

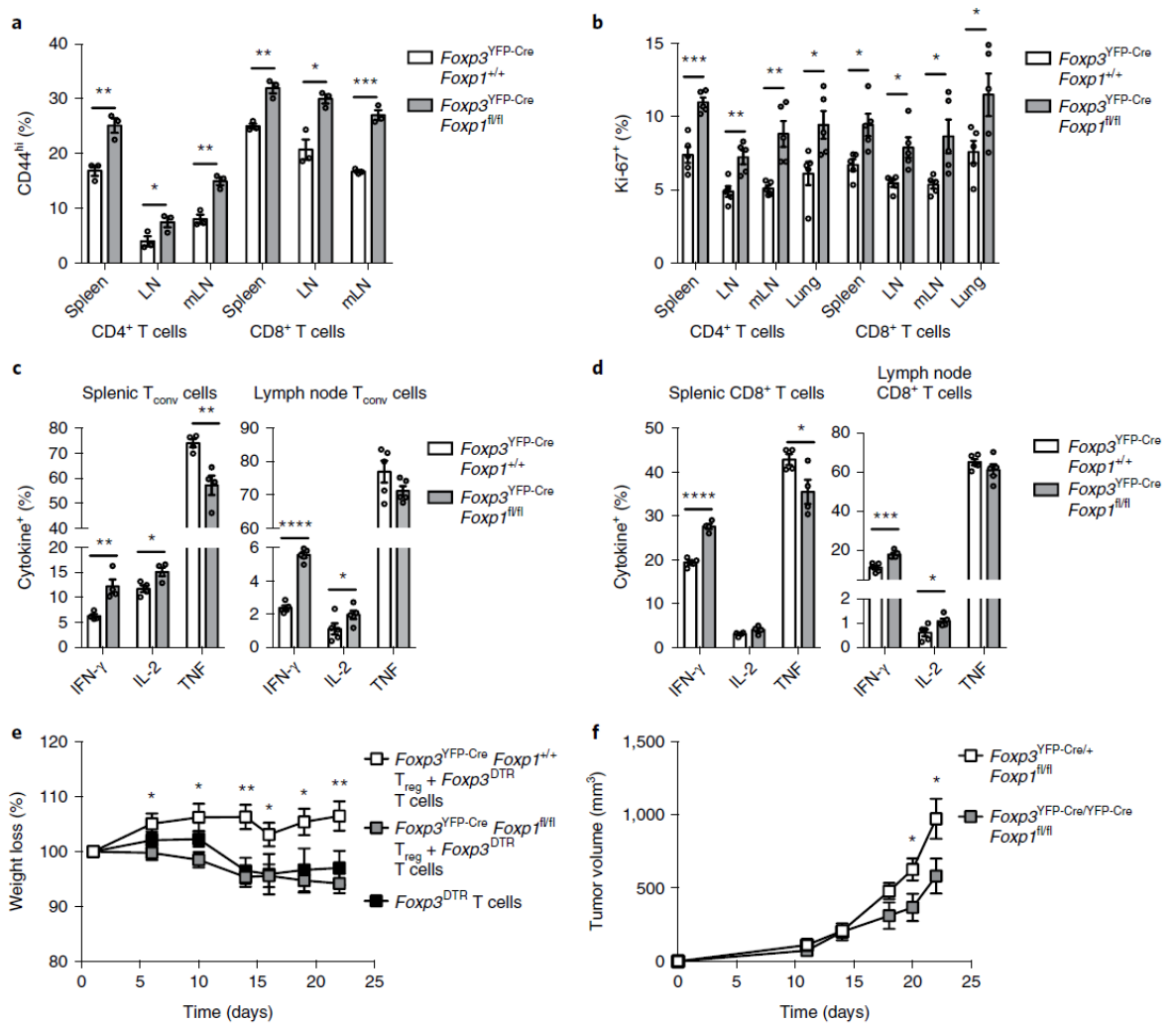


Рисунок 4-28. Дефицит Foxp1 вызывает функциональные нарушения клеток Трег. а, Частота клеток CD44^{hi} среди CD4⁺ Tconv клеток селезенки или лимфатических узлов или CD8⁺ Т-клеток (n=3 биологически независимых мыши на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких экспериментов, столбцы ошибок представляют среднееквадратичное значение, ** p=0,0069, * = 0,05, ** p=0,0033, ** p=0,0029, * p=0,01, *** p=0,0004 (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). б, Частота Ki-67⁺ Т-клеток среди CD4⁺ Tconv-клеток или CD8⁺ Т-клеток (n=5 биологически независимых

мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из нескольких экспериментов, столбцы ошибок представляют среднеквадратичное значение стандартного отклонения, *** $p=0,0005$, ** $p=0,004$, ** $p=0,003$, * $p=0,028$, * $p=0,012$, * $p=0,01$, * $p=0,02$, * $p=0,04$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). с, Частота цитокин-продуцирующих Т-клеток среди всех Tconv клеток селезенки и лимфатических узлов после 3-часовой стимуляции *in vitro* РМА и иономицином с добавлением брэфелдина А (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из трех экспериментов, столбцы ошибок представляют s.e.m., ** $p=0,00066$, * $p=0,022$, ** $p=0,0072$, **** $p=0,0001$, * $p=0,077$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). d, Частота цитокин-продуцирующих Т-клеток среди всех CD8+ Т-клеток селезенки и лимфатических узлов после 3-часовой стимуляции *in vitro* РМА и иономицином в присутствии брэфелдина А (n=5 биологически независимых мышей на группу, показаны результаты одного репрезентативного из трех экспериментов, столбцы ошибок представляют среднеквадратичное значение, **** $p=0,0001$, * $p=0,094$, *** $p=0,0009$, * $p=0,024$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). e, Изменение веса мышей-реципиентов с дефицитом Т-клеток, которым адоптивно перенесли Т-клетки Foxp1+ или Foxp1- и Т-клетки Foxp3^{DTR} (n=5 биологически независимых мышей на группу, представлен один из двух независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют собой среднеквадратичные значения, * $p=0,05$, * $p=0,026$, ** $p=0,0046$, * $p=0,036$, * $p=0,011$, ** $p=0,0051$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). f, Объем опухоли (мм³), образованной клетками рака молочной железы E0771 в молочных железах самок мышей (n=4 биологически независимых мыши на группу с двумя опухолями в каждой, представляющих два независимых эксперимента, столбцы ошибок представляют собой среднеквадратичные значения, * $p=0,049$, * $p=0,049$ (слева направо), использован непарный двусторонний t-критерий Стьюдента).

Мыши, получившие Foxp1-дефицитные Трег вместе с клетками Foxp3^{DTR}, теряли вес почти также, как и мыши, получившие только Т-клетки Foxp3^{DTR}. В то же время, мыши, получившие нормальные Трег, не теряли вес (рис. 4-28 e). Обычные Т-клетки и CD8+ Т-клетки из мышей, которым в которых ввели Foxp1-дефицитные Трег продуцировали больше IFN- γ , IL-2 и TNF при стимуляции РМА и иономицином по сравнению с клетками из контрольных мышей-реципиентов. Также было установлено, что количество Foxp1-дефицитных Трег у мышей-реципиентов было ниже, чем у контрольных животных, получивших нормальные Трег, на день 22 после трансплантации клеток, хотя они и сохраняли способность синтезировать Foxp3 (данные не показаны). В отдельном эксперименте было обнаружено 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. 4-28 f). В совокупности, эти результаты говорят о том, что Foxp1 нужен для поддержания супрессорной функции Трег *in vivo*.

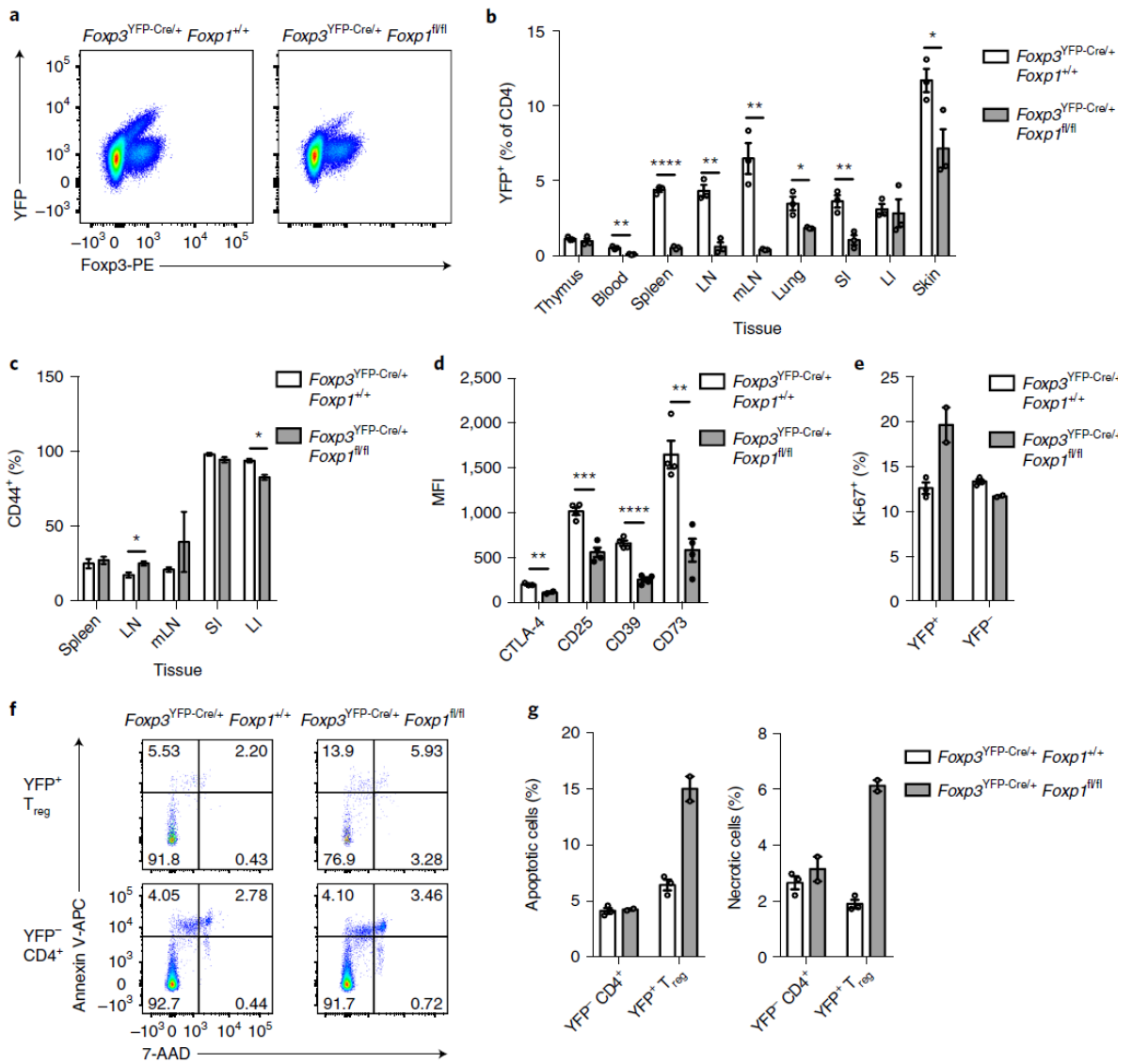


Рисунок 4-29. Внутриклеточные дефекты, вызванные дефицитом Foxp1 в клетках Трег. а, Репрезентативные графики проточной цитометрии, полученные на CD4⁺ Т-клетках селезенки 10-недельных гетерозиготных самок мышей *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}* или *Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}*, демонстрирующие окрашивание 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 и периферических тканях (n=3 биологически независимых мыши на группу, представлены результаты одного из трех независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднеквадратичные значения, * * p=0,003, ****p =0,0001, ** p=0,0016, **p=0,0043, * p=0,023, ** p =0,008, * p=0,039 (слева направо), использован непарный двусторонний t-тест Стьюдента). SI - тонкая кишка; LI, толстая кишка. в, Частота клеток CD44^{hi} среди клеток YFP⁺ Трег в лимфоидных тканях гетерозиготных самок мышей 10-недельного возраста (n=3 биологически независимых мыши на группу, представлен один из нескольких независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднеквадратичное значение, * p=0,045, * p=0,038 (слева направо), использован непарный двусторонний критерий Стьюдента). д, Количество нескольких характерных для Трег белков по MFI сигнала после окрашивания моноклональными антителами YFP⁺ Трег из в селезеночных гетерозиготных самок мышей (n=4 биологически независимых мыши на группу, представлены результаты одного из двух независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют полуцентрированное среднее значение, **

$p=0,0086$, * ** $p=0,0005$, **** $p=0,0001$, ** $p=0,0018$ (слева направо), использовали непарный двусторонний t -критерий Стьюдента). е, Частота клеток Ki-67+ среди YFP+ и YFP- Трег из гетерозиготных самок ($n=3$ биологически независимых мыши в контрольной группе и $n=2$ в экспериментальной группе, представляющих один из двух независимых экспериментов, столбцы ошибок обозначают s.e.m. центрированных по среднему значению); f, Типичные результаты анализа методом проточной цитометрии YFP+ Трег клеток или Т-клетках YFP- CD4+ из селезенки 10-недельных гетерозиготных самок мышей, демонстрирующие окрашивание 7-AAD и аннексином V (приведен один из двух независимых экспериментов); g, Сводный график анализа апоптотических клеток (аннексином V+7-AAD-) и некротических клеток (аннексином V + 7-AAD +) в популяциях YFP+ Трег и YFP- CD4+ Т-клеток ($n=3$ биологически независимых мышей в контрольной группе и $n=2$ в экспериментальной группе, представлен результат одного из двух независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют собой среднеквадратичное отклонение от среднего значения).

4.2.8 Негативные эффекты, связанные с отсутствием Foxp1 в Трег, являются внутриклеточными (снижены уровни маркеров Трег (CTLA-4, CD25, CD39, CD73), повышено число пролиферирующих клеток с фенотипом Ki-67+, повышен процент спонтанного апоптоза клеток)

Чтобы определить, являются ли эффекты от дефицита Foxp1 внутриклеточными или внешними для Трег, мы проанализировали гетерозиготных самок $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$. Вследствие случайной инактивации X-хромосомы примерно половина Трег у этих животных, согласно ожиданиям, должна синтезировать YFP. И, действительно, у $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{+/+}$ гетерозиготных самок 40% Трег были YFP+, что указывает на незначительный негативный эффект синтеза белка YFP-Cre на Трег в конкурентных условиях (Рис. 4-29 а). Анализ мышей $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$ показал, что Foxp1-дефицитные YFP+Foxp3+ тимоциты не испытывали в процессе созревания проблем при сравнении с нормальными тимоцитами Foxp3+YFP+. Однако, проанализировав Трег на периферии, мы обнаружили, что Foxp1-дефицитные Трег сильно проигрывают в конкуренции нормальным контрольным Трег (Рис. 4-29 а, b). Чтобы понять механизм, обуславливающий снижение численности Foxp1-дефицитных Трег в конкурентных условиях, мы исследовали активацию, пролиферацию и апоптоз YFP+ Foxp1-дефицитных Трег у этих мозаичных животных. Как было показано ранее, нокаут по Foxp1 приводит к внутриклеточному дефекту, состоящему в спонтанной активации обычных CD4+ и CD8+ Т-клеток (355). В отличие от не-Трег, Foxp1-дефицитные и Foxp1-нормальные Трег у гетерозиготных мышей были активированы в равной степени (Рис. 4-29 с). Мы определили экспрессию ключевых молекул, связанных с супрессорной функцией Трег в самках $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$, и обнаружили сниженный уровень CTLA-4 и CD25 в Foxp1-дефицитных Трег (Рис. 4-29 d). Тем не менее, в отличие от сравнимого уровня CD39 и CD73 в Foxp1-достаточных и Foxp1-дефицитных Трег у самцов $Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}$ и

контрольных животных из того же помета, уровень этих супрессорных молекул был заметно ниже в Foxp1-дефицитных Трег по сравнению с Foxp1-достаточными Трег из

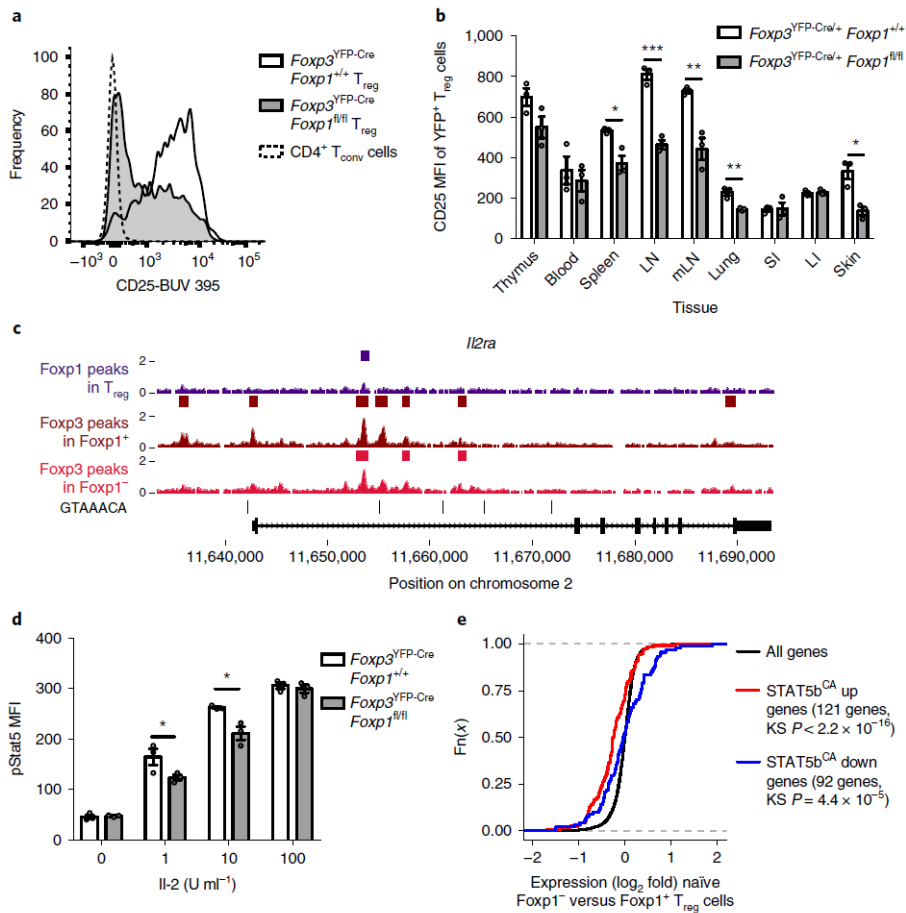


Рисунок 4-30. Передача сигнала от IL-2 нарушена в Foxp1-дефицитных Трег клетках за счет внутриклеточных дефектов. а, Репрезентативные гистограммы уровня белка CD25 на наивных клетках Foxp1⁺ и Foxp1⁻ Трег и на наивных клетках T_{conv} (представлены результаты одного из нескольких независимых экспериментов). б, Суммарный график MFI CD25 в клетках YFP⁺ Трег от гетерозиготных самок (n=3 биологически независимых мыши на группу, представлен результат одного из трех независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднееквадратичное отклонение от среднего значения, * $p=0,094$, *** $p=0,015$, ** $p=0,0005$, ** $p=0,0065$, * $p=0,011$ (слева направо), непарный двусторонний t-критерий Стьюдента). SI, тонкая кишка; LI, толстая кишка. с, Распределение пиков Foxp3 и Foxp1 ChIP-seq в локусе *Il2ra* (показаны усредненные значения трех независимых биологических образцов, для Foxp1⁺ Трег показано среднее значение от двух независимых биологических образцов). d, Чувствительность к IL-2 клеток Трег, отсортированных по Foxp1⁺ или Foxp1⁻, оцениваемая по MFI pSTAT5 (n=3 биологически независимых мыши на группу, показан результат одного из трех независимых экспериментов, столбцы ошибок представляют среднееквадратичные отклонения от средних величин, * $p=0,05$, * $p=0,019$ (слева направо), использован непарный двусторонний критерий Стьюдента). е, Кумулятивный график распределения, показывающий экспрессию генов STAT5b^{CA} в наивных Foxp1⁻ / Foxp1⁺ Трег клетках. Значения p рассчитывали с использованием двустороннего теста Колмогорова–Смирнова (KS), сравнивающего гены STAT5b^{CA} со всеми генами.

мозаичных мышей (Рис. 4-29 d). Эти результаты указывают на то, что вышеописанный фенотип активированных Трег у животных $Foxp3^{YFP-Cre}Foxp1^{fl/fl}$ 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 из гетерозиготных самок $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$ пролиферировали быстрее, чем Foxp1-достаточные Трег (Рис. 4-29 e). Наконец, было проведено сравнение уровней спонтанного апоптоза YFP+ Foxp1-дефицитных и контрольных, нормальных по Foxp1, Трег из гетерозиготных самок $Foxp3^{YFP-Cre/+}Foxp1^{fl/fl}$, используя окрашивание аннексином V. Процент аннексин V-позитивных, но 7-амино-активномицин D (7-AAD)-негативных YFP+ Трег был повышен в отсутствие Foxp1, в то время как частота апоптотических клеток в субпопуляциях YFP- Трег были соизмеримы (Рис. 4-29 f, g). Таким образом, можно констатировать, что дефицит Трег по Foxp1 вызывает как внеклеточные, так и внутриклеточные дефекты.

4.2.9 Передача сигнала от IL-2 нарушена в Foxp1-дефицитных Трег

Сигнал от IL-2 критически важен для поддержания супрессорной роли Трег и для их конкурентоспособности, причем обе функции нарушены в контексте дефицита Foxp1. На это указывает тот факт, что главной функциональной проблемой при потере Foxp1 является нарушение регуляции синтеза CD25 (368). 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, что эффект внутриклеточный (рис. 4-30 a, b). Также обнаружилось, что Foxp1 и Foxp3 узнают один сайт связывания в локусе *Il2ra*. Хотя Foxp3 остается связанным с этим сайтом в отсутствие Foxp1, связывание Foxp3 с несколькими другими сайтами в локусе *Il2ra* сильно снижено или утрачено в Foxp1-дефицитных Трег (рис. 4-30 c). 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. 4-30 d). Было обнаружено, что в присутствии низких доз IL-2 фосфорилирование STAT5 существенно снижено в Foxp1-дефицитных Трег, но эта разница исчезает по мере увеличения дозы цитокина (рис. 4-30 d). Зависящая от IL-2 рецептор-зависимая активация транскрипции фактора транскрипции STAT5 играет важнейшую роль в супрессорной функции Трег (368). Сигнальные пути STAT5 и ТКР контролируют мало перекрывающиеся наборы генов и аспектов супрессорной активности Трег (368,369). В ходе анализа уровня экспрессии генов, зависимых от активации STAT5, в

базе данных RNA-seq, было найдено, что гены, экспрессия которых возрастает под действием STAT5, сильнее всего экспрессированы в Foxp1-достаточных Трег. В то же время, наиболее сильно репрессированные при активации STAT5 гены сильнее всего экспрессированы в Foxp1-дефицитных Трег (рис. 4-30 е). Эти результаты демонстрируют, что сигнальный путь от IL-2 существенно нарушен в Foxp1-дефицитных Трег. В заключение, мы проверили могут ли насыщающие концентрации IL-2 восстановить основные характеристики фенотипа и функции Трег, нарушенные вследствие потери Foxp1 (368). Оказалось, что 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 существенной уникальной функцией в Трег, обеспечивая Foxp3-зависимую регуляцию экспрессии нескольких характеристических генов Трег, которая может быть частично восстановлена, в случае отсутствия Foxp1, путем обеспечения мощного сигнала от IL-2.

4.2.10 Foxp1 в комплексах с Foxp3 регулирует активность генов, необходимых для поддержания фенотипа и функции Трег

Подводя итог этой части диссертации следует подчеркнуть, что только за счет создания новой генетической мышинной модели, позволяющей выключать фактор транскрипции Foxp1 исключительно в зрелых Трег, удалось получить однозначные ответы о важном вкладе этой молекулы в поддержание фенотипа и функций Трег. В частности, было установлено, что Foxp1 и Foxp3 связывают общие сайты в хроматине, и это связывание необходимо для координированной регуляции генов, определяющих супрессорные свойства (CTLA-4, CD39, CD73) и выживание (IL-2Ra) Трег *in vivo*.

4.3 Трег пациентов с ранним нелеченым ревматоидным артритом: связь количества и фенотипа с клиническими проявлениями и эффективностью терапии

4.3.1 Трег в патогенезе ревматоидного артрита (РА)

Ревматоидный артрит (РА) — это аутоиммунное заболевание, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовитом) и системными поражениями множества органов. Согласно современной концепции, патогенез РА основан на сложных взаимных эффектах генетических и приобретенных дефектов иммунной регуляции, приводящих к патологической активации иммунной системы в ответ на патогенные микроорганизмы или физиологические раздражители (370). Нарушение толерантности к Б-клеткам приводит к выработке широкого спектра аутореактивных антител различной специфичности (371). Эти

антитела, например, к ревматоидному фактору (RF) или IgM к анти-цитруллинированному и карбамоилированному белку, могут быть обнаружены в сыворотке до клинических проявлений РА. Кроме того, у пациентов с доклиническим РА могут наблюдаться повышенные уровни провоспалительных цитокинов, хемокинов и других иммунных медиаторов, что предполагает раннюю активацию адаптивного иммунитета (372).

Обычно иммунный баланс достигается путем индукции апоптоза незрелых аутореактивных тимоцитов во время негативного отбора, активации индуцированной гибели зрелых Т-клеток и подавления активации эффекторных Т-клеток в ответ на аутоантигены высокоспециализированной популяцией Т-хелперов – регуляторными Т-клетками (Трег) (373). Соответственно, Трег контролируют/модулируют важные клеточные функции, такие как пролиферация антиген-стимулированных Т-клеток и продукция цитокинов, а также созревание и представление антигена дендритными клетками. Человеческие Трег имеют фенотип CD4+Foxp3+ и обычно содержат много маркера CD25 (альфа-цепь рецептора IL-2) на поверхности клеток и мало CD127 (рецептор IL-7Ra) (375,376). Данные относительно фенотипов Трег и количества этих клеток в периферической крови пациентов с РА в ходе лечения противоречивы (374). В большинстве сообщений показано, что процент (%) циркулирующих Трег ощутимо снижается (377-380), в то время как другие демонстрируют повышенный (381,382) или аналогичный процент Трег (36, 383, 384) у пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. Предполагается, что количественный дефект CD4+ CD25+Foxp3+CD127- Трег характерен для раннего РА и может быть связан с риском развития РА у бессимптомных пациентов с повышенным титром антител к цитруллинированному виментину (385,386).

Общепринятым стандартом в фармакотерапии РА является терапия с помощью метотрексата (MT). Помимо противовоспалительного эффекта, связанного с ингибированием GARDH, фермента, активность которого необходима для активации и пролиферации Т-клеток, MT негативно влияет на активность ДНК-метилтрансфераз, которые ингибируют экспрессию гена Foxp3. Поэтому введение MT позитивно сказывается на поддержании численности и функционально активности Трег. Современная стратегия лечения MT (быстрое повышение дозы, комбинация с фолиевой кислотой), и особенно, подкожные инъекции MT, повышают эффективность терапии РА на любой стадии прогрессирования заболевания. Это также снижает требования к назначению целевых препаратов нового поколения. Несколько исследований подтвердили увеличение уровня Трег, а также отношения Трег/Th17 после лечения MT (385-387). Повышенная регуляция продукции

Foxp3, секреции IL-10 и TGF- β CD4+ Т-клетками была обнаружена в культуре клеток и экспериментах на животных после введения МТ (387-390). Следует отметить, что МТ способствовал увеличению синтеза Foxp3 в Трег из лимфоцитов периферической крови пациентов с РА, но не здоровых доноров (388, 390).

Чтобы прояснить роль Трег и их активности при РА и разработать новые методы ранней диагностики РА, мы изучили большую группу пациентов с ранним не-леченным РА и контрольную группу здоровых людей. Мы оценили количественные и фенотипические изменения субпопуляции Трег, чтобы найти потенциальные корреляции между выраженностью проявлений РА, уровнем аутореактивного Ig и фенотипическими изменениями в популяции Трег. Мы провели мониторинг пациентов с РА после лечения МТ, чтобы выявить возможную связь влияния МТ на численность и фенотип Трег с ответом на лечение МТ, что позволило сделать предположение о возможной роли Трег в качестве маркерных клеток в ходе лечения РА.

4.3.2 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 высокий, 20 (44,4%) умеренный, 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%), более высокий СОЭ – у 26 (57,8%) пациентов (см. Таблицу 3).

Таблица 3. Клинические и иммунологические показатели включенных в исследование пациентов (n=45).

Параметр	Значение
Пол, мужчины/женщины, n	6/39
Возраст, годы Ме [25-75 перцентиль]	52,0 [32,5-57,5]
Продолжительность болезни, месяцы/Ме [25-75 перцентиль]	5 [4-6]
Радиологическая стадия, n (%) I/II/III/IV	21(46,7)/24 (53,3)/0/0
DAS 28 Ме [25-75 перцентиль]	5,01 [4,18-5,8]
ESR, мм/ч Ме [25-75 перцентиль]	36,0 [18,0-54,0]
CRP, мг/л Ме [25-75 перцентиль]	12,1 [2,9-37,4]
IgM RF, МЕд/мл Ме [25-75 перцентиль]	94,5 [17,8-186,0]
% of RF IgM--позитивных, n (%)	34 (75,6)
Анти-ССР, Ед/мл Ме [25-75 перцентиль]	105,0 [42,5-230,6]
% позитивных по анти-ССР n (%)	40 (88,9)

Процент и абсолютное количество субпопуляций Трег в крови здоровых доноров имели следующие нормальные значения: % FoxP3+ CD25+ 3,7-9,8%, абс # FoxP3+CD25+ 0,03-0,11x10⁹; % CTLA-4/поверхность 0,13-4,9%, абс # - 0,00006-0,0018x10⁹; % CTLA4/общ - 36,3-89,8%, абс # - 0,00003-0,00108x10⁹; % FoxP3+CD127- 3,2-8,5%, абс # - 0,03-0,096x10⁹;

% CD25+CD127- 3,9-9,7%, абс # - 0,03-0,09x10⁹; % FoxP3+ICOS+ -7,0-27,5%, абс # - 0,002-0,019x10⁹; % FoxP3+CD40L+ 0,39-3,25%, абс # - 0,0001-0,0019x10⁹; % FoxP3+PD-L1+ -

Таблица 4. Характеристика популяций Трег пациентов с РА и здоровых доноров до лечения метотрексатом

T cell/Treg subpopulation	Пациенты с РА			Контроль Абсолютное значение, Ме [25-75 перцентиль]	p-value
	Уровень снижен, n (%)	Уровень повышен, n (%)	Абсолютное значение, Ме [25-75 перцентиль]		
% CD4+, n=45	7 (16,7)	1 (2,3)	45,0 (38,02-49,2)	46,2 (39,14-50,39)	ND
Abs# x10 ⁹ CD4+, n=45	8 (18,6)	1 (2,3)	0,82 (0,57-1,09)	0,79 (0,68-0,97)	ND
% FoxP3+ CD25+, n=37	4 (10,8)	1 (2,3)	5,57 (4,6-6,93)	6,92 (5,84-7,96)	0,028
Abs#x10 ⁹ , FoxP3+ CD25+, n=37	7 (18,9)	0	0,05 (0,03-0,06)	0,05 (0,04-0,07)	ND
% CTLA4+ surface, n=34	5 (14,7)	3 (8,8)	0,65 (0,22-1,67)	0,51 (0,34-1,2)	ND
Abs#x 10 ⁹ , CTLA4+ surface, n=34	6 (17,6)	2 (5,8)	0,0002 (0,0001-0,0008)	0,0003 (0,00014-0,0008)	ND
% CTLA4+ intracellular, n=34	3 (9,1)	0	62,9 (47,0-75,4)	60,29 (50,62-70,16)	ND
Abs#x10 ⁹ , CTLA4+ intracellular n=34	3 (9,1)	6 (18,2)	0,0005 (0,00008-0,002)	0,00021 (0,00008-0,00058)	ND
% FoxP3+ CD127-, n=29	2 (6,9)	3 (10,3)	5,96 (4,58-7,32)	6,015 (4,99-6,905)	ND
Abs#10 ⁹ , FoxP3+ CD127-, n=29	5 (17,2)	1 (3,4)	0,05 (0,04-0,064)	0,05 (0,04-0,06)	ND
% CD25+ CD127-, n=29	2 (6,9)	2 (6,9)	6,5 (5,11-7,91)	6,47 (5,17-7,58)	ND
Abs#10 ⁹ , CD25+ CD127-, n=29	3 (10,3)	1 (3,4)	0,056 (0,037-0,069)	0,054 (0,04-0,064)	ND
% FoxP3+ ICOS+, n=29	16 (65,5)	0	5,33 (2,14-11,3)	10,83 (9,27-13,7)	0,003
Abs#10 ⁹ , FoxP3+ ICOS+, n=29	16 (65,5)	0	0,002 (0,0013-0,0056)	0,0068 (0,0039-0,009)	0,001
% FoxP3+ CD40L+, n=29	14 (48,3)	1 (3,4)	0,38 (0,19-0,83)	1,51 (1,12-2,08)	0,00003
Abs#10 ⁹ , FoxP3+ CD40L+, n=29	14 (48,3)	1 (3,4)	0,0002 (0,0001-0,0005)	0,00087 (0,00047-0,0014)	0,00007
% FoxP3+ PD-L1+, n=29	11 (37,9)	0	0,61 (0,28-1,25)	1,94 (1,16-2,25)	0,0002
Abs#10 ⁹ , FoxP3+ PD-L1+, n=29	7 (24,1)	0	0,00023 (0,0001-0,00065)	0,001 (0,0006-0,0016)	0,0003

Примечание: приведены % клеток в популяции CD4 Т-лимфоцитов, ND – достоверная разница отсутствует, показаны значения $p < 0,05$.

0,47-3,43%, абс # - 0,00016-0,00334x10⁹. Типичные графики FACS показаны на рис. 4-31 (А и Б), другие технические детали, касающиеся анализа Трег, приведены в разделе «Материалы и методы». CD4+ Т-клетки идентифицировали с использованием окрашивания антителами к CD45 и CD4.

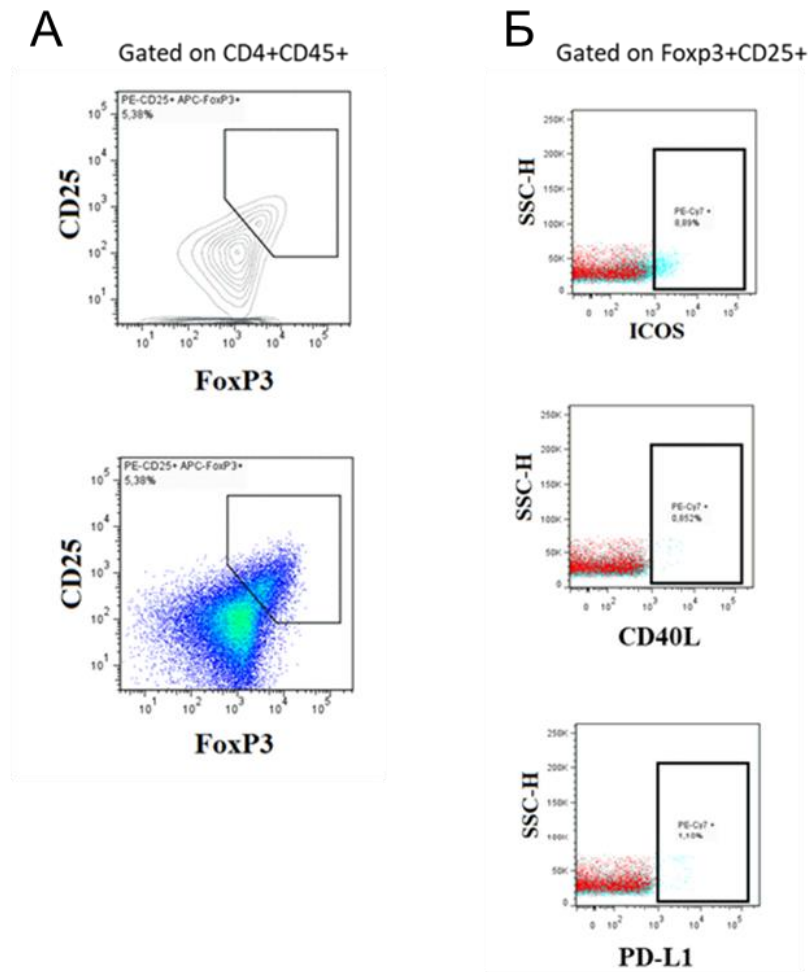


Рисунок 4-31. Анализ процентного содержания Трег в периферической крови пациентов с РА и здоровых доноров. Представлены данные проточно-цитометрического (FACS) анализа окрашенных флуоресцентными антителами клеток; (А) Пример идентификации Foxp3+CD25+ Трег. (Б) точечные графики показывают FACS анализ 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. Числа указывают долю клеток, которые демонстрируют специфическое окрашивание для конкретного маркера.

Популяцию CD4+CD45+ дополнительно анализировали с использованием окрашивания с флуоресцентными моноклональными антителами анти-Foxp3 и анти-CD127. Уровень маркеров активации Трег оценивали на поверхности Foxp3+CD25+ Т-клеток в большинстве экспериментов. Окрашивание CD127 использовали в качестве независимого способа проверки данных, полученных на основе внутриклеточного окрашивания анти-Foxp3. Из таблицы 4 видно, что как процентное, так и абсолютное количество Трег, рассчитанное на основе анализа Foxp3 или CD127, хорошо согласуются. Следует отметить, что были использованы два разных способа оценки количества CTLA4: внутриклеточное окрашивание для определения общего количества CTLA4 на клетку и

поверхностное окрашивание для оценки количества этой ко-стимулирующей молекулы, доступной для передачи сигналов, например, при связывании с лигандами на клетках-мишенях Трег, например дендритных клетках.

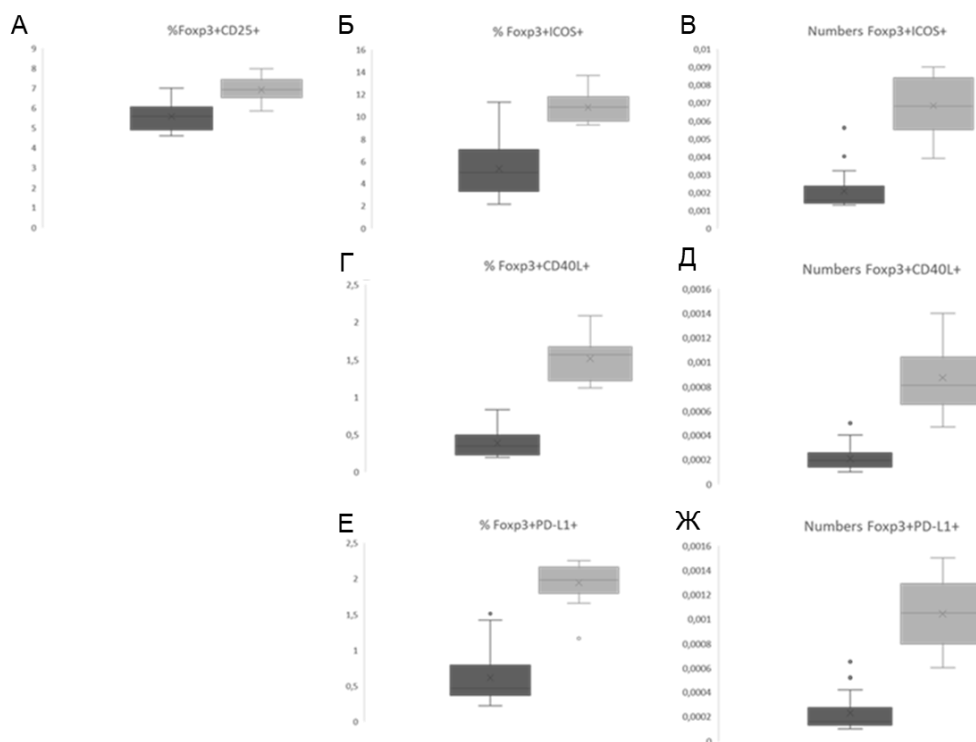


Рисунок 4-32. Снижение доли Foxp3+CD25+ Трег и снижение экспрессии маркеров активации Трег у пациентов с ранним РА. Доля или количество клеток в периферической крови пациентов с РА или здоровых доноров были оценены с помощью иммунофенотипирования с последующим анализом FACS, как показано на рис. 4-31. 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 $\times 10^9$ /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).

Количество пациентов с увеличенным или уменьшенным размером субпопуляций Трег по сравнению со здоровыми донорами представлено на рис. 4-32 и в таблице 4. Большинство пациентов, по нашим данным, 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+ клетки (% у 37,9% и abs # у 24,1%; рис. 4-32 Б и Ж). Нам 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. 4-32 А), а также меньший % и абс # Foxp3+ICOS+; Foxp3+ CD40L+ и Foxp3+PD-L1+, в сравнении со здоровой группой доноров ($p < 0,05$) (рис.4-32 и таблица 4). 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) (см. таблицу 3).

4.3.3 Тяжесть симптомов и высокий уровень аутоантител положительно коррелируют с низким уровнем активированных Трег

Чтобы выявить корреляцию между активностью РА, размером субпопуляций Трег и фенотипом, мы разделили ранних пациентов с РА на две группы в зависимости от

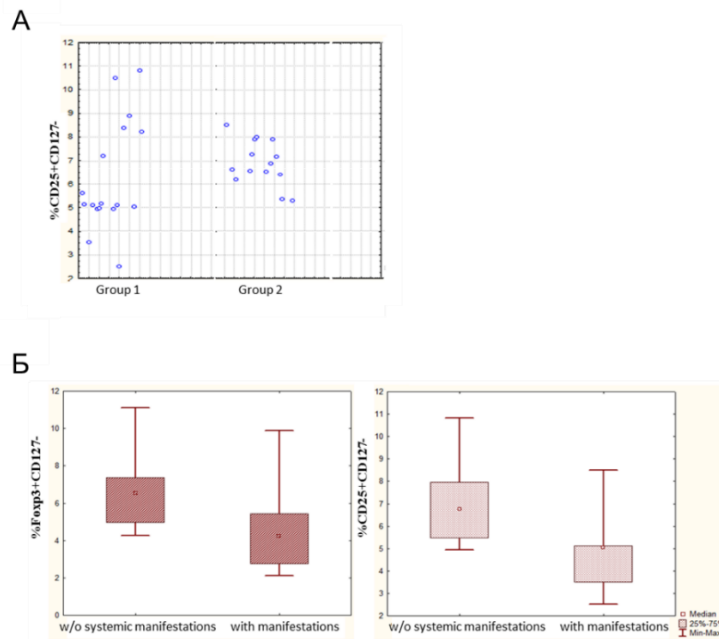


Рисунок 4-33. Корреляция между процентом Трег и активностью РА, (А) Доля CD25+CD127- Т-клеток у пациентов с различной активностью РА (Группа 1 – высокая активность РА/воспаление, Группа 2 – низкая/умеренная активность); (Б) Доля Foxp3+CD127- и CD25+CD127- Т-клеток в зависимости от наличия/отсутствия системных проявлений РА ($n = 7$; $p < 0,05$).

активности заболевания: в группу 1 входили пациенты с высоким уровнем воспаления: DAS 28 > 5,1 SDAI > 26, CDAI > 22; во 2 группу – с умеренными и низкими показателями. Пациенты 1-й группы имели более низкий % клеток CD25+CD127- по сравнению с пациентами из 2 группы (5,1 [4,9-5,6] и 6,9 [6,4-7,9], $p < 0,05$) (рис. 4-33 А и Б). Мы также оценили разницу в количестве Трег у пациентов с РА в зависимости от наличия системных проявлений. Меньший % клеток FoxP3+CD127- (4,23 [2,76-5,4] против 6,4 [4,9-7,3] соответственно;

$p < 0,05$) и CD25+CD127- клеток (5,05 [3,52-5,1] против 6,63 [5,6-7,9], соответственно; $p < 0,05$) были обнаружены у пациентов с РА ($n=7$) с системными проявлениями по сравнению с пациентами с РА без системных симптомов (рис. 4-33 Б).

Большинство пациентов с РА были позитивными по RF и АЦП (31 (68,9%), 8 (17,8%) пациентов были АЦП-позитивными и RF-негативными, а 4 (8,8%) были негативными сразу по двум показателям. Мы провели количественный анализ уровня Трег как функции от присутствия различных сывороточных Ig и обнаружили, что у пациентов, серонегативных по RF был высокий % CD25+CD127-, % и абс # Foxp3+CD40L+ и Foxp3+PD-L1+ Т-клеток по сравнению с серопозитивными (рис.4-34 А, Д). Нам не удалось обнаружить значительную разницу между АЦП-позитивными и негативными пациентами, возможно, из-за небольшого числа последних. Мы также обнаружили негативную корреляцию между RF и % Foxp3+PD-L1+ Трег ($r=-0,4$ $p=0,003$).

4.3.4 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.

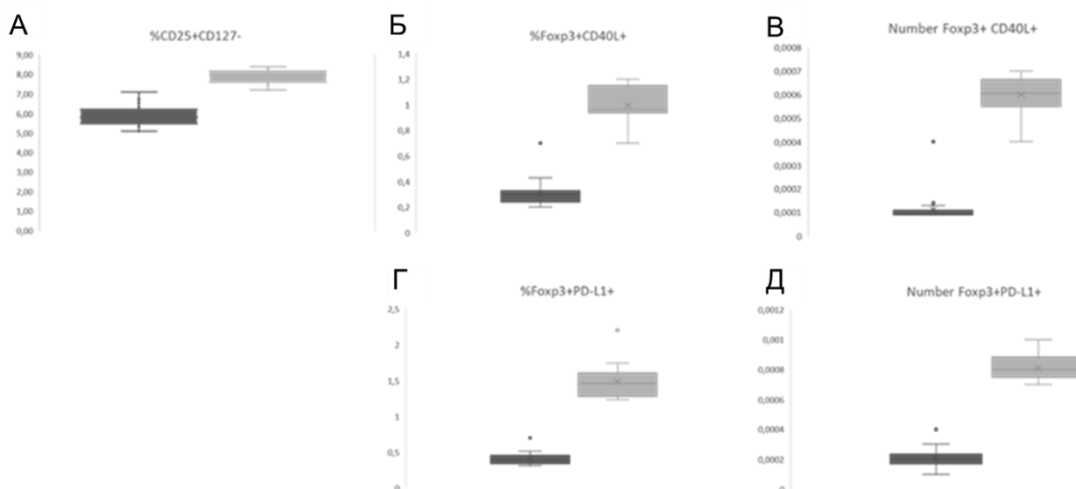


Рисунок 4-34. Снижение доли CD25+CD127- Трег и экспрессия CD40L и PD-L1 связаны с повышенным уровнем аутоантител у пациентов с РА. Соотношение Трег и способность экспрессировать маркеры

активации сравнивали в когортах 32 пациентов с высоким уровнем анти-RF IgM и 13 пациентов с низким/недетектируемым анти-RF IgM с использованием иммунофенотипирования и проточной цитометрии. Данные представлены в виде диаграмм разброса с усами. Темно-серый – высокий уровень IgM, светло-серый – низкий уровень IgM. $p=0,04$ (А); 0,02 (Б); 0,01 (В); 0,009 (Г); 0,007 (Д).

Мы обнаружили отрицательную корреляцию 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. 4-34. 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. 4-35); 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. 4-35 Б-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 (данные не показаны).

Число и фенотип Трег также оценивали в группах, сформированных в зависимости от ответа на МТ на 24-й неделе. У пациентов с ремиссией (согласно SDAI (25)) был повышенный % и абс # Foxp3 + PD-L1 + Т-клеток на 24-й неделе лечения, 25 [0,43-2,3]% и 0,0004 [0,0002-0,001] $\times 10^9$ /л) по сравнению с пациентами с умеренной активностью заболевания ($n=14$) (0,44 [0,2-0,69]% и 0,00016 [0,0001-0,0004] $\times 10^9$ /л, $p<0,05$).

4.3.5 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 начальные количества 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]%), $p<0,05$ (рис. 4-35). 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. 4-34). 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, чем пациенты с умеренной патологией (23,3 [17,1-30,7 мг/л, 5 [4-7] месяцев, $p = 0,052$).

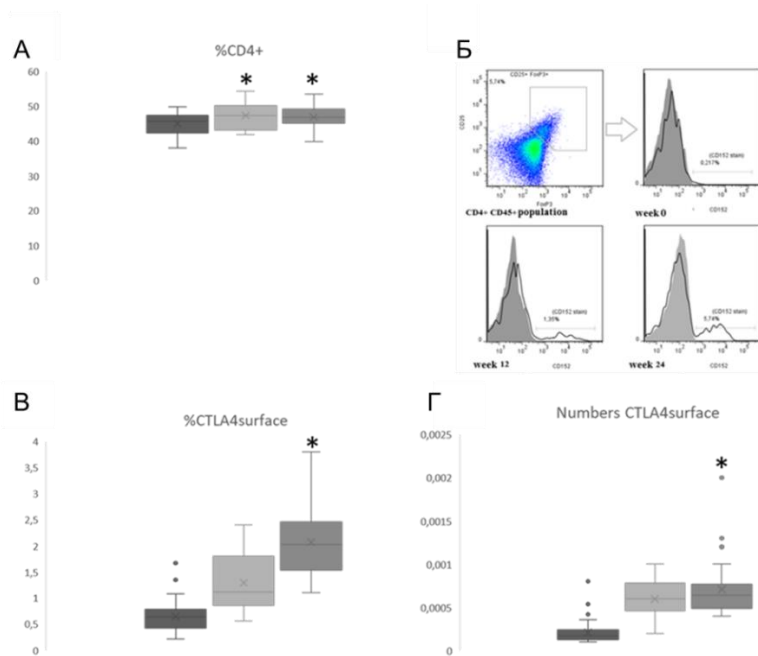


Рисунок 4-35. Ответ на лечение МТ положительно коррелирует с увеличением доли CD4 Т-клеток в крови и восстановлением поверхностной экспрессии CTLA4 в субпопуляции Трег крови у пациентов с ранним РА. (А) Увеличение доли CD4+ Т-клеток крови после 12 и 24 недель лечения МТ; (В, Г) Изменения в пропорции 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.

4.3.6 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 популяция 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, фенотипический анализ Трег периферической крови можно использовать в диагностических целях для выявления пациентов, которые будут отвечать на терапию метотрексатом. Этот результат представляет значительную практическую ценность, поскольку позволяет быстро определить пациентов, которым поможет терапия метотрексатом.

4.4 Мезенхимные стромальные клетки (МСК) из висцеральной жировой ткани проявляют иммуносупрессорные свойства в культуре с Т-клетками: роль ICAM-1

4.4.1 МСК могут угнетать активацию и деление активированных Т-клеток в культуре (введение)

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) были обнаружены как фибробластоподобные клетки из костного мозга(391). Эти клетки имеют мезенхимные поверхностные маркеры (CD105, CD90 и CD73) и не имеют гематопозитических поверхностных маркеров, таких как CD45 и CD133 (392). Доказано, что МСК являются плюрипотентными и, в определенных условиях, могут дифференцироваться в хондроциты, остециты, фибробласты и адипоциты (393). Исходно считали, что основной функцией МСК является замена мертвых клеток в тканях за счет миграции и дифференцировки в области повреждения МСК костномозгового происхождения (394). Однако плохое выживание трансплантированных МСК привело к пересмотру роли этих клеток в репарации и регенерации тканей. В настоящее время принято считать, что секреция паракринных факторов является основным механизмом опосредованного МСК восстановления тканей (395). Точно известно, что МСК поддерживают клетки, которые восстанавливают поврежденную ткань (396) путем секреции растворимых ангиогенных и нейротрофических факторов: эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста нервов (NGF), мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и др. (397).

В поврежденной ткани воспаление является обязательным условием продуктивной репарации. Цитокины и факторы, продуцируемые в воспаленной ткани, стимулируют миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток. МСК при развитии воспаления могут защитить клетки от чрезмерного повреждения, «контролируя» переход от воспаления к стадии восстановления, и предотвращая выработку внеклеточного матрикса, ответственного за фиброз. Было показано, что МСК обладают иммуномодулирующей активностью и способны регулировать функциональную активность лимфоцитов и других типов иммунных клеток в зависимости от микроокружения (398,399). Активированные

лимфоциты *in vitro* секретируют растворимые факторы, такие как IFN- γ и TNF- α , которые инициируют программу иммуносупрессии МСК, которая состоит в синтезе белковых факторов, в частности, индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) (400,401). Продукты их ферментативной активности (кинуренин и NO) подавляют функцию лимфоцитов и их пролиферацию. IDO метаболизирует незаменимую аминокислоту триптофан и превращает ее в кинуренин (402). Кинуренин и продукты его распада индуцируют апоптоз Т-клеток (403). С другой стороны, недостаток свободного триптофана приводит к остановке клеточного цикла в Т-клетках (404).

Существует значительное расхождение в реализации механизмов иммуносупрессии МСК разных видов млекопитающих. IDO является одной из ключевых молекул иммуносупрессии в человеческих МСК, тогда как у мышей ключевой фактор – это активность iNOS на фоне отсутствия изменений в активности IDO в ходе иммуносупрессии (405-408). Паракринные механизмы играют значительную роль в иммуносупрессорном потенциале МСК, но МСК обладают гораздо большей супрессирующей способностью при прямом контакте с клетками-мишенями (409). Например, костномозговые МСК, инкубированные с лимфоцитами в условиях прямого контакта между клетками, демонстрировали десятикратное увеличение иммуносупрессорной активности по сравнению с бесконтактными условиями (410). Механизмы контактной иммуносупрессии сложнее идентифицировать, поскольку наряду со вкладом молекул клеточной адгезии и костимуляторных молекул как на поверхности МСК, так и на поверхности стимулированных иммунных клеток, всегда следует учитывать вклад растворимых секретируемых факторов, которые могут действовать как в аутокринной, так и в паракринной манере (411). Список молекул-кандидатов, участвующих в контактных механизмах иммуносупрессии, ранее был сужен до пары лиганд-рецептор PD-1/PD-L1 (412), костимуляторного белка семейства В7 – В7-Н4 (V-set domain-containing T-cell activation inhibitor 1) (413), молекул межклеточной адгезии ICAM и VCAM (414).

Как уже упоминалось выше, МСК могут влиять на активацию иммунных клеток и регулировать ход воспалительного ответа (415). Использование этих механизмов можно рассматривать как альтернативное терапевтическое средство для лечения аутоиммунных заболеваний и хронического воспаления (416). Однако недавно было продемонстрировано, что МСК, помимо подавления иммунных клеток, могут стимулировать их при отсутствии воспаления, регулируя иммунологический статус в различных условиях (417). Механизмы и молекулы, запускающие этот переход, недостаточно изучены (418).

Мы оценили влияние МСК жировой ткани человека (мезенхимных клеток, полученные из жировой ткани человека (hASC), далее МСК) на активированные или покоящиеся Т-лимфоциты. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (ЛПК), содержащие значительную долю циркулирующих Т-клеток, использовали в качестве источника Т-клеток. Были созданы смешанные культуры МСК-ЛПК в условиях, позволяющих клеточные контакты или разобщающих клетки (так называемое культивирование в формате transwell). Установлено, что МСК негативно влияют на пролиферацию активированных лимфоцитов за счет подавления экспрессии поверхностной экспрессии альфа-субъединицы рецептора IL-2 (CD25). В случае подавления, опосредованного клеточными контактами, было зарегистрировано значительное повышение уровня мРНК ICAM-1 как в МСК, так и в Т-клетках, но в то же время в МСК происходило снижение количества белка ICAM-1 на поверхности Т-клеток (аналогичные эффекты наблюдали и в бесконтактных условиях). Кроме того, блокировка ICAM-1 на МСК и поверхности Т-клеток восстанавливала пролиферацию лимфоцитов и приводила к увеличению количества CD25 на мембране Т-клеток, но не влияла на экспрессию IDO. Это наблюдение поддерживает гипотезу, что ICAM-1 в условиях контактной супрессии независимо от индукции IDO. Инкубация МСК с покоящимися лимфоцитами увеличивает их выживание и сопровождается увеличением на поверхности МСК числа молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), а также уровня ICAM-1 как на МСК, так и на Т-клетках.

4.4.2 МСК супрессируют пролиферацию активированных лимфоцитов в смешанных культурах

Для определения иммуносупрессорного потенциала hASC *in vitro* была создана экспериментальная система для анализа подавления активации и пролиферации лимфоцитов на клеточном уровне. МСК и ЛПК были выделены из жировой ткани и венозной крови здоровых доноров, соответственно (n=6 для МСК и n=4 для ЛПК). МСК культивировали с активированными Т-клетками в составе ЛПК (доля Т-клеток в ЛПК как правило составляет 50-70%) (419). Для активации Т-клеток мы использовали либо фитогемагглютинин (РНА), либо антитела к компонентам Т-клеточного рецептора (моноклональные очищенные анти-CD3 и анти-CD28 антитела), предварительно сорбированные на поверхности культурального пластика. МСК инкубировали с активированными ЛПК или контрольными клетками в контактных и бесконтактных условиях. Мембраны transwell, проницаемые для растворимых факторов, но непроницаемые для клеток, использовали для разделения ЛПК и МСК. Используя такой

подход, мы обнаружили, что ингибирование пролиферации лимфоцитов сильнее всего проявляется через 48 часов совместного культивирования. Используя различные соотношения МСК к ЛПК, установили, что подавление, опосредованное МСК, зависит от числа клеток и наиболее сильный супрессорный эффект (оптимальный для подавления деления Т-клеток) наблюдается при соотношении МСК:ЛПК=1:25 в условиях контактов между клетками (рис. 4-36 А). Чтобы убедиться, что лимфоциты, собранные для анализа пролиферации, не загрязнены МСК, образцы ЛПК, извлеченные из смешанных культур, окрашивали антителами к поверхностному маркеру МСК CD73 (данные не показаны). Согласно результатам этого анализа только около 1% клеток содержали CD73 и были негативным по CD45. Используя очищенные путем FACS-сортировки окрашенных соответствующими флуоресцентно-мечеными антителами CD4 Т-клетки (рис. 4-36), мы подтвердили, что иммуносупрессорная активность МСК проявляется и в отношении очищенной популяции CD4 Т-клеток. Не-стимулированные ЛПК, содержащие покоящиеся (неактивированные) Т-клетки и ростовую среду, кондиционированную МСК, использовали в качестве отрицательного контроля. Стимулированные ЛПК, культивированные отдельно, использовали в качестве положительного контроля для определения уровня активации и пролиферации лимфоцитов.

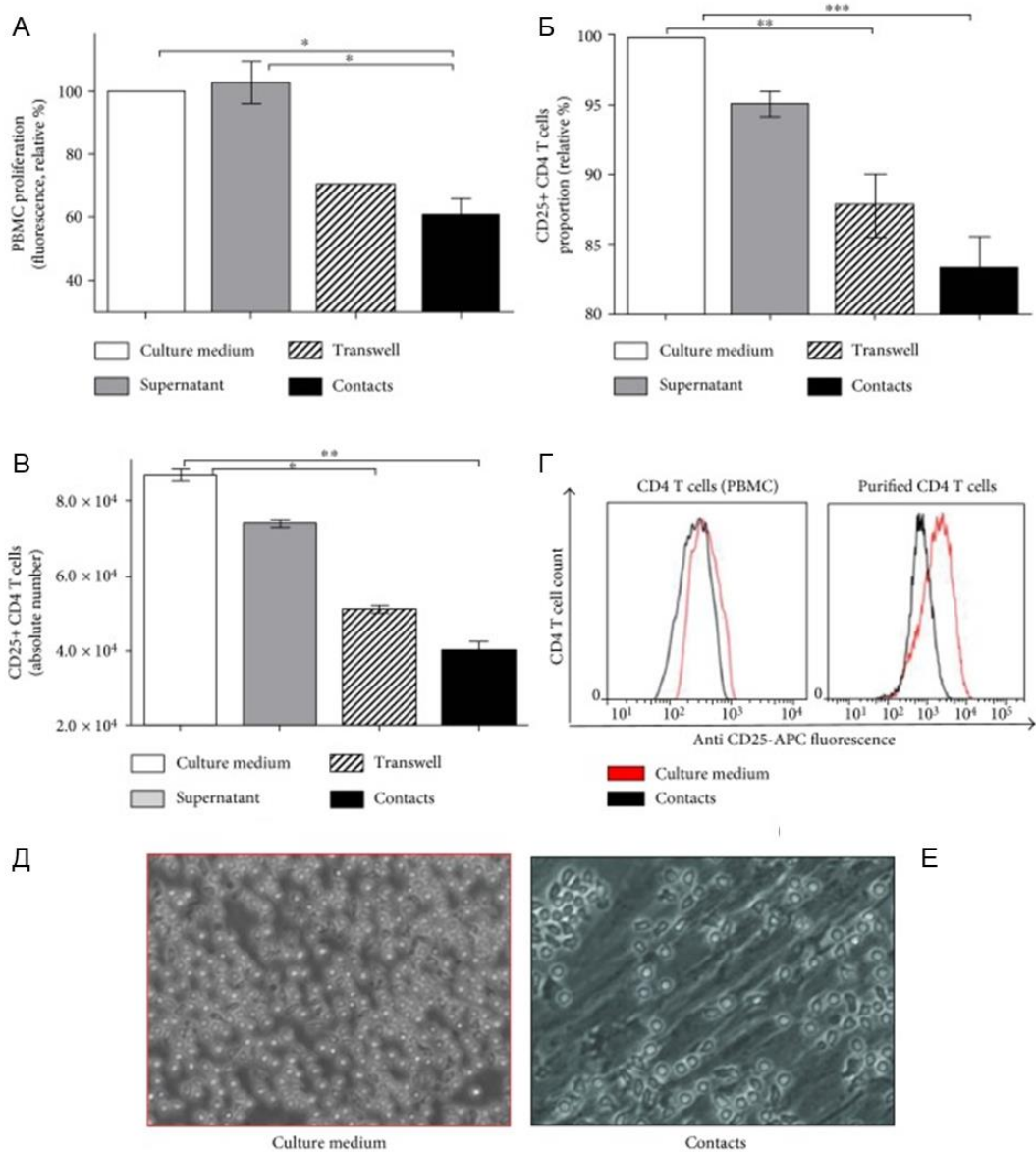


Рисунок 4-36. МСК жировой ткани (hASC) подавляют пролиферацию лимфоцитов и снижают уровень IL-2R α на поверхности активированных Т-клеток. Пролiferация PBMC, стимулированных фитогемагглютинином (РНА) и культивируемых отдельно и вместе с hASC в контактных (Contact) или бесконтактных (Transwell) условиях (соотношение 25:1, 48 ч). (А). Для стимуляции PBMC, которая сопровождается увеличением CD25 на поверхности клеток использовали сорбированные на пластике анти-CD3 и анти-CD28. Клетки культивировали с hASC в соотношении 25:1, в течении 48 ч, показаны средние значения +SEM (n=5). Культуральная среда и среда, кондиционированная только hASC, служили отрицательным контролем. Пропорция и абсолютное количество CD25+CD4 Т-клеток, определенные с использованием иммунофлуоресцентного окрашивания и анализа FACS; показаны средние значения +SEM (n=6) (Б, В). Аналогичный анализ был выполнен с использованием FACS-очищенных до чистоты >95% человеческих CD4 Т-клеток (PBMC), которые также инкубировали с hASC (правый график); результаты, полученные с использованием тотальных PBMC, окрашенных на CD25, показаны слева. Данные репрезентативных экспериментов показаны в виде гистограмм (Г). Репрезентативные изображения живых культур PBMC-hASC,

полученные с помощью светового микроскопа, оснащенного цифровой камерой. (48 ч инкубации, увеличение 10x) (Д, Е) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$).

4.4.3 Супрессия активации Т-хелперов МСК происходит за счет снижения уровня α субъединицы рецептора IL-2(CD25) на поверхности активированных лимфоцитов

Снижение количества лимфоцитов в смешанных культурах с hASC может быть вызвано двумя основными причинами: лимфоциты могут стать более чувствительными к апоптозу и быстрее умирать, или они могут медленнее делиться из-за снижения чувствительности к IL-2. Чувствительность Т-клеток к IL-2 напрямую связана с уровнем на поверхности клеток субъединицы IL-2R α (CD25), которая необходима для образования высокоаффинного рецептора IL-2 на лимфоцитах. Высокоаффинный рецептор IL-2 обеспечивает сигнал, необходимый для поддержания пролиферации Т-клеток (420). Уровень CD25 оценили в стимулированных лимфоцитах после инкубации активированных Т-клеток с МСК *in vitro*, окрашивая клетки конъюгированным с флуорофором антителом к CD25 с последующим анализом FACS. Было установлено статистически значимое уменьшение доли и количества CD4 Т-клеток с высоким уровнем CD25 в образцах, где стимулированные Т-клетки были инкубированы с hASC по сравнению с контрольными образцами (рис. 4-36 В и Г). Этот эффект был выражен как в условиях контактов между клетками, так и в условиях transwell, но иммуносупрессия была значительно выше в условиях контактов между МСК и Т-клетками клеткой (рис. 4-36 Г и Е).

Чтобы оценить изменения в апоптозе, Т-клетки, собранные из культур hASC-PBMC, окрашивали с помощью конъюгированного с флуорофором аннексина V. Это окрашивание обнаруживает фосфатидилсерин, экспонированный на поверхности клетки на ранних стадиях апоптоза, и, следовательно, отличает жизнеспособные клетки от апоптотических. Анализ доли апоптотических клеток не выявил каких-либо статистически значимых изменений в образцах с выраженным подавлением иммунитета по сравнению с таковыми в контрольных образцах. Наши данные свидетельствуют о том, что подавление CD25 на поверхности активированных Т-клеток, вероятно, ответственно за эффект иммуносупрессии *in vitro* в данной модельной системе.

4.4.4 Секреция IDO – это основной механизм бесконтактной супрессии лимфоцитов в культурах с МСК

hASC используют паракринные механизмы для подавления функции Т-клеток. Чтобы определить влияние растворимых факторов на hASC-опосредованную супрессию Т-клеток, мы добавили ростовую среду, кондиционированную hASC, культивируемых с Т-

клетками (в контактных и бесконтактных условиях), и hASC, культивируемых отдельно, к стимулированным РВМС и к hASC, соответственно. Далее оценивали снижение пролиферации Т-клеток, связанное с понижением уровня поверхностного уровня IL-2R α (CD25) в Т-клетках, для супернатантов культур, где обнаруживалось заметное подавление иммунитета с помощью hASC. Мы ожидали обнаружить повышенную продукцию эффекторных молекул, ответственных за подавление иммунитета в hASC, в частности, IDO и iNOS. Действительно, мы определили, что уровень CD25 падает в лимфоцитах, инкубированных со средой, собранной из смешанных культур hASC с активированными Т-клетками по сравнению с супернатантами hASC, которые не контактировали с лимфоцитами. Опять же, кондиционированная среда из культур клеток hASC-Т-клетки, допускающая контакты между двумя типами клеток, оказывала более глубокое подавляющее действие на Т-клетки по сравнению с таковыми в образцах, где использовался супернатант из бесконтактных культур hASC с активированными Т-клетками (рис. 4-37 А). Было зафиксировано значительное увеличение мРНК IDO и iNOS по данным определения уровня мРНК в образцах, содержащих hASC, обработанных соответствующими супернатантами (рис. 4-37 Б). Активация транскрипции генов IDO и iNOS была выше, если супернатанты получали из «бесконтактных» культур Т-клеток и hASC, а не контактных (рис. 4-37 В и Г). Чтобы доказать, что активация транскрипции приводит к повышенному синтезу соответствующих белков, мы измерили уровни белков IDO и iNOS в лизатах hASC. Уровень белка IDO был значительно выше у hASC, культивируемых в контакте с активированными Т-клетками по сравнению с hASC, инкубированным с интактными Т-клетками. Увеличение уровня IDO было еще выше в hASC, инкубированных с активированными Т-клетками в бесконтактных условиях в соответствии с данными, опубликованными ранее (401) (рис. 4-37 Д). Детектировать увеличение белка iNOS, в отличие от IDO, с помощью Вестерн-блота лизатов hASC не удалось.

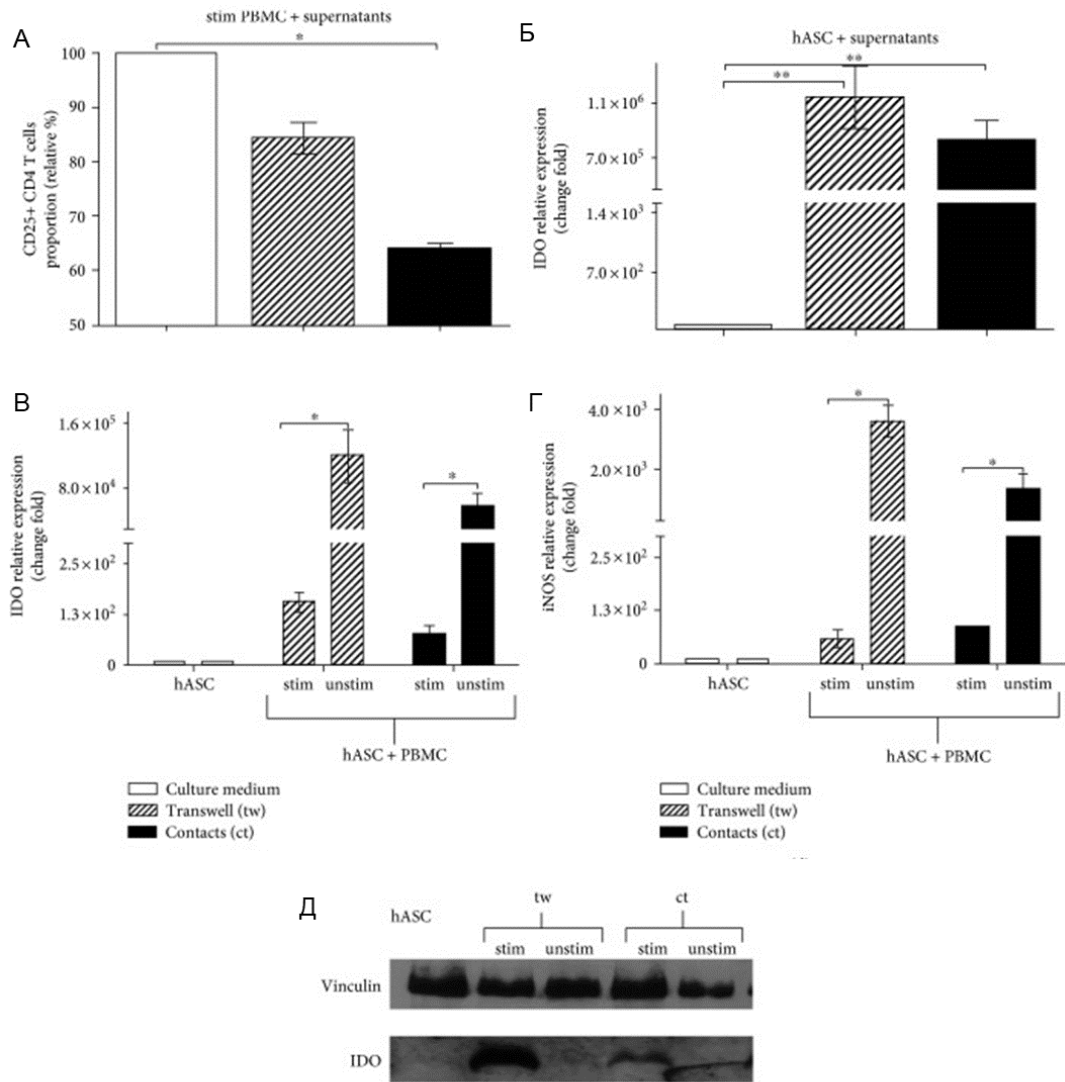


Рисунок 4-37. Увеличение уровня IDO в hASC в присутствии активированных PBMC. Супернатанты от смешанных культур активированных PBMC (анти-CD3, анти-CD28), культивированных с hASC (48 ч), негативно влияют на уровень CD25 в активированных CD4 T-клетках. После 48 часов инкубации PBMC анализировали на поверхностную экспрессию CD25 (IL-2R α) (n=3, среднее +SEM) (А); Изменения в транскрипции IDO после обработки hASC супернатантами (n=3) (Б); Транскрипционная активность генов IDO (В) и iNOS (Г) в ходе hASC-опосредованной иммуносупрессии (n=4); Уровень белка IDO в hASC, культивируемых с PBMC, стимулированными анти-CD3 и анти-CD28, в соотношении 1:25 в течение 48 часов (контроль – винкулин) (Д) (* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$; unstim – нестимулированный PBMC, stim – PBMC, стимулированные анти-CD3 и анти-CD28).

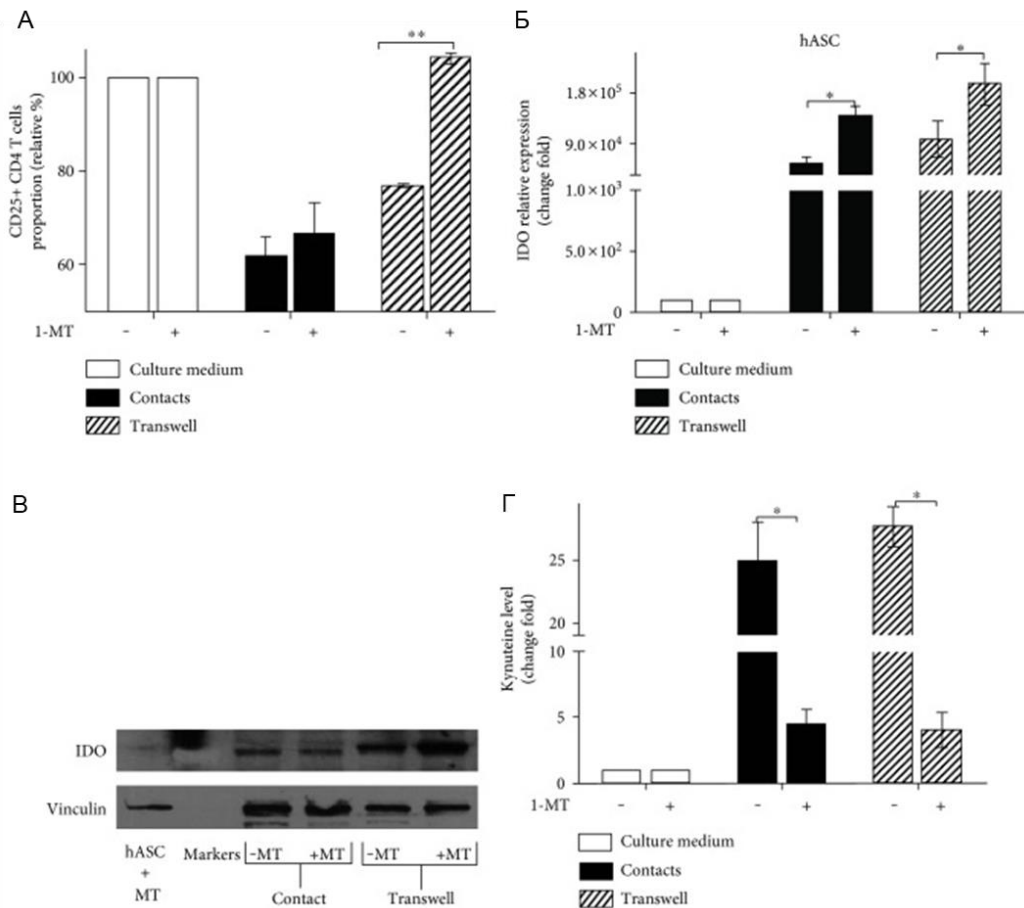


Рисунок 4-38. Ингибирование IDO блокирует паракринную опосредованную hASC иммуносупрессию. Активированные PBMC культивировали в присутствии или в отсутствие hASC в контактных и бесконтактных условиях после добавления 1-MT в течение 48 часов. Изменение доли CD25+CD4 T-клеток по сравнению с контролем, приведены результаты анализа окрашенных антителами клеток с помощью проточной цитометрии, нормированные на контроль (А); Изменения мРНК IDO в hASC в аналогичном эксперименте (Б); Уровень белка IDO в лизатах клеток hASC (В); Уровень кинуренина в супернатантах из культур hASC-PBMC. Значения абсорбции (405 нм) были нормализованы для контрольных образцов (супернатант из hASC, культивируемых отдельно); (Г) Все данные представляют среднее значение \pm SEM трех независимых экспериментов (1-MT – 1-метил-DL-триптофан; * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$).

Чтобы подтвердить участие IDO в hASC-опосредованной иммуносупрессии, мы использовали специфический ингибитор ферментативной активности IDO 1-метил-DL-триптофан. Добавление 1-MT к культурам *in vitro* частично устраняло ингибирование деления T-клеток, вызванное MCK, одновременно увеличивая долю CD25+CD4 T-клеток в бесконтактных условиях и в меньшей степени в контактных (рис. 4-38 А). В то же время, в присутствии ингибитора наблюдалось заметное увеличение транскрипции IDO в hASC, инкубированных с активированными лимфоцитами в бесконтактных условиях (рис. 4-38 Б). Повышенный уровень транскрипта IDO и соответствующего ему белкового продукта (рис.

4-38 В) коррелировал с более низким уровнем кинуренина в среде (рис. 4-38 Г). Этот результат показывает, что ингибитор влияет на ферментативную активность IDO и, вероятно, вызывает компенсаторное усиление транскрипции IDO. Сделанные наблюдения доказывают, что ферментативная активность IDO является критической для hASC-опосредованной иммуносупрессии, особенно в бесконтактных условиях (421).

4.4.5 В отсутствие активации МСК поддерживают жизнеспособность лимфоцитов

МСК могут подавлять активированные Т-клетки; однако есть противоречивые сообщения, утверждающие, что *in vitro* МСК могут поддерживать выживание и, в некоторой степени, активировать покоящиеся Т-клетки (416,417). Мы проверили способность hASC влиять на выживание и активацию покоящихся Т-клеток в смешанных культурах. Мы обнаружили увеличение количества лимфоцитов после 48 часов инкубации с hASC. Увеличение количества сопровождалось повышенным уровнем CD25 на поверхности CD4 Т-клеток (рис. 4-39 А-В). Мы также показали, что hASC поддерживает выживание очищенных CD4 Т-клеток (данные не показаны). Полученные результаты доказывают, что hASC в отсутствие антигенной стимуляции могут предоставлять сигналы выживания и/или активации для покоящихся Т-клеток. Чтобы обнаружить эти сигналы, мы сфокусировались на фенотипических изменениях в hASC после инкубации с Т-клетками. Мы обнаружили значительное увеличение молекул МНС класса II (HLA-DR) на поверхности hASC после инкубации с PBMC (рис. 4-39 Г). Возможно, в отсутствие воспаления MSC могут потенциально служить антигенпрезентирующими клетками, обеспечивая тонический сигнал для покоящихся Т-клеток, представляя низкоаффинные аутоантигены. Неожиданно мы обнаружили резкое увеличение поверхностной экспрессии HLA-DR (МНС II) во фракции PBMC после инкубации с hASC (рис. 4-39 Д). Эти данные подтверждают, что hASC *in vitro* положительно влияет на антиген-презентирующие свойства незрелых антиген-презентирующих клеток (моноцитов), содержащихся PBMC, за счет увеличения поверхностного уровня HLA-DR.

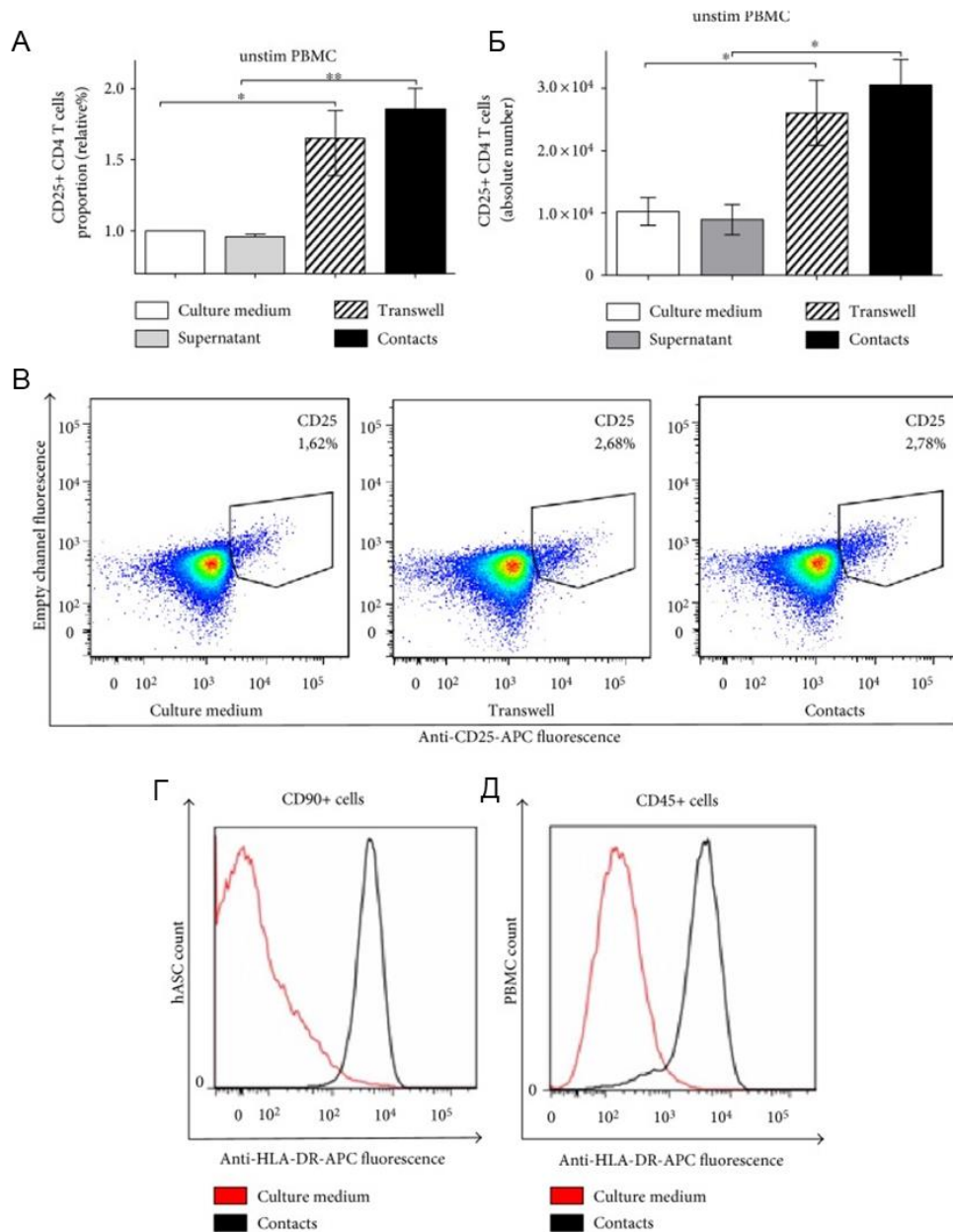


Рисунок 4-39. hASC поддерживают выживание не-стимулированных Т-клеток. Изменения уровня CD25 на поверхности не-стимулированных PBMC после культивации с hASC в контактных и бесконтактных условиях (48 ч). Доля (А) и число (Б) CD25+CD4 Т-клеток (n=6); Репрезентативный точечный график экспрессии CD25 на не-стимулированных Т-клетках, культивируемых с hASC (В); HLA-DR на поверхности не-стимулированных PBMC, культивируемых отдельно или с hASC в различных условиях в течение 7 дней. hASC (Г) и PBMC (Д), соответственно (* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$).

4.4.6 Уровень ICAM-1 резко возрастает на поверхности лимфоцитов и в МСК при со-культивировании

При сравнении hASC-опосредованной супрессии Т-клеток в условиях контактов с hASC и в бесконтактных условиях, обнаруживаются заметные различия между этими двумя типами взаимодействия hASC и Т-клеток. Например, налицо более сильное замедление

пролиферации в случае контактных культур по сравнению с бесконтактными образцами. В то же время, более высокие уровни мРНК и белка IDO можно детектировать в случае бесконтактной, зависящей от растворимых факторов иммуносупрессии.

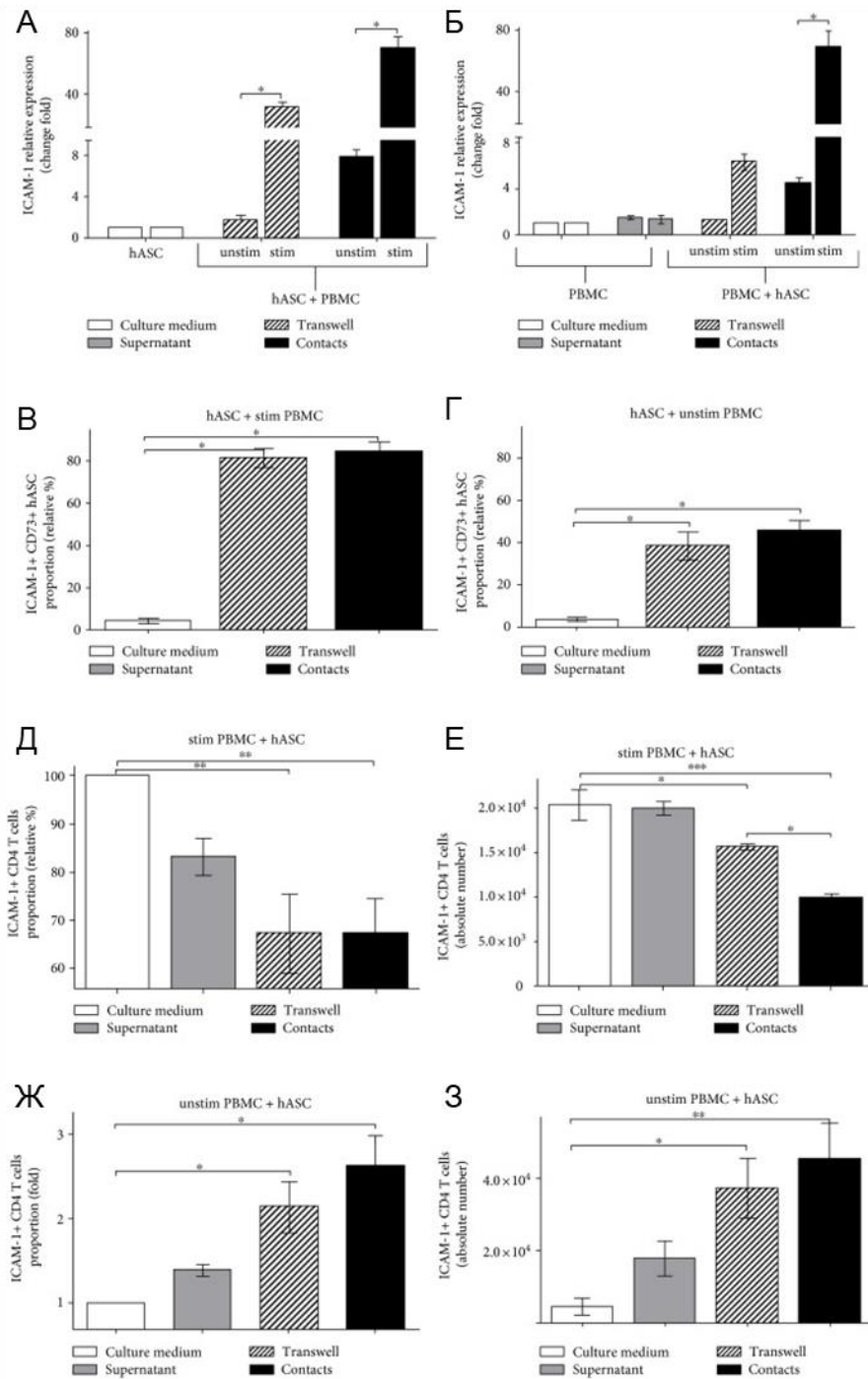


Рисунок 4-40. Изменения уровня ICAM-1 в ходе hASC-опосредованной иммуносупрессии. Уровни мРНК ICAM-1 в hASC (А) и PBMC (Б) из смешанных культур. Количество hASC с высоким уровнем ICAM-1 на поверхности (В, Г), а также стимулированных (Д, Е) или нестимулированных (Ж, З) PBMC из смешанных культур (все данные представляют собой среднее значение + SEM, $n=6$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ и *** $p<0,001$).

Приведенные факты подразумевает, что помимо ранее описанных паракринных факторов (IDO, iNOS и некоторых цитокинов), hASC несут на поверхности клеток молекулы, играющие роль в контакт-зависимой иммунной супрессии. Результаты экспериментов *in vivo* на мышах указывают, что это молекулы клеточной адгезии, такие как ICAM или VCAM (414). Чтобы сузить список потенциальных молекул, участвующих в контактной hASC-опосредованной иммуносупрессии при использовании клеток человека, были проанализированы изменения транскрипционной активности ряда генов молекул клеточной адгезии в hASC и Т-клетках (PBMC) в ходе иммуносупрессии *in vitro*. Оказалось, что как в hASC (рис. 4-40 А), так и в PBMC (рис. 4-40 Б) только количество мРНК ICAM-1 резко увеличивалось в смешанных культурах hASC и активированных PBMC. Кроме того, мы обнаружили активацию транскрипции ICAM-1, даже когда hASC инкубировали с не-стимулированными PBMC (рис. 4-40 А и Б).

Чтобы доказать, что активация транскрипции гена ICAM-1 приводит к увеличению уровня белка, мы оценили ICAM-1 на поверхности hASC и Т-клеток. Используя FACS анализ клеток, окрашенных mAb к ICAM-1, мы документально подтвердили, что в присутствии как активированных, так и не-стимулированных PBMC в hASC сильно возрастает количество ICAM на поверхности клеток (рис. 4-40 В и Г).

4.4.7 Снижение уровня ICAM-1 в присутствии МСК происходит только при активации лимфоцитов

Мы предположили, что снижение уровня IL-2R α (CD25) на активированных лимфоцитах, вероятно, может коррелировать с изменениями уровня ICAM-1 на поверхности клетки. Используя поверхностное окрашивание ICAM, мы определили, что снижение уровня ICAM-1 коррелировало с понижением уровня IL-2R α на активированных лимфоцитах в ходе hASC-опосредованной иммунной супрессии (рис. 4-40 Д). Кроме того, происходило уменьшение абсолютного количества Т-клеток, несущих высокий уровень ICAM-1 на поверхности (рис. 4-40 Е).

4.4.8 МСК индуцируют появление ICAM на поверхности лимфоцитов в отсутствие активации

Изменения уровня ICAM-1 на активированных лимфоцитах позволяет предположить, что ICAM-1 можно использовать в качестве маркера активации лимфоцитов. Мы предположили, что hASC должен влиять на уровень ICAM-1 на поверхности не-стимулированных лимфоцитов (PBMC) в условиях контакта. Измерение поверхностной динамики ICAM-1 на поверхности Т-клеток в смешанных культурах hASC

с не-стимулированными РВМС позволило обнаружить небольшое увеличение уровня ICAM-1 в бесконтактных условиях по сравнению с РВМС, культивируемыми отдельно. Увеличение ICAM-1 в условиях контакта между клетками было намного выше, чем в бесконтактных условиях (рис. 4-40 Ж). Количество клеток с фенотипом ICAM+ также было выше в не-стимулированных (РВМС), культивированных с hASC в условиях контакта (рис. 4-40 З). Представленные данные подтверждают гипотезу о том, что hASC влияют на уровень ICAM-1 на Т-клетках в зависимости от условий: они негативно регулируют ICAM-1 в активированных Т-клетках и увеличивают уровень ICAM-1 в покоящихся не-стимулированных Т-клетках.

4.4.9 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 hASC и лимфоцитах. Чтобы проверить эту гипотезу, супернатанты, собранные из культур hASC с активированными лимфоцитами и без них, добавляли к активированным РВМС. После двух дней инкубации hASC и Т-клетки оценивали на предмет изменения экспрессии гена ICAM-1. Транскрипционная активность гена ICAM-1 как в hASC, так и в РВМС увеличивалась в присутствии супернатантов. Таким образом, было показано, что добавление супернатантов, содержащих растворимые факторы,

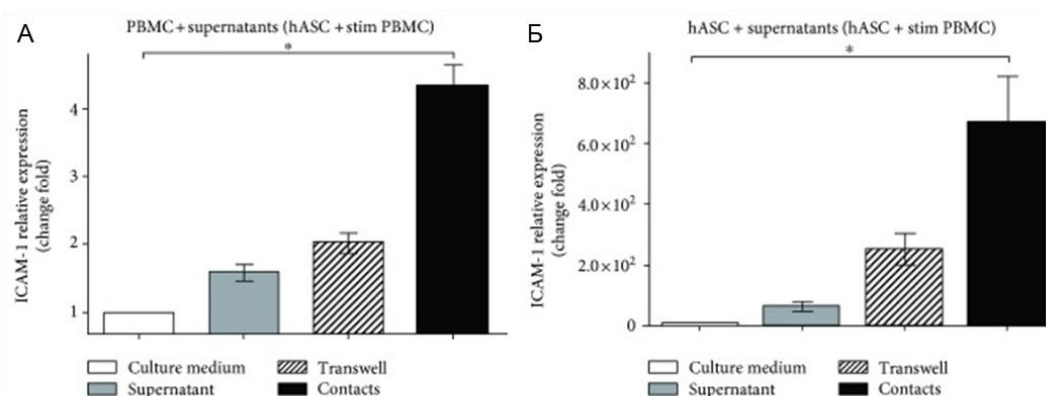


Рисунок 4-41. Супернатанты из смешанных культур hASC и активированных РВМС стимулируют транскрипцию ICAM-1 в hASC и РВМС. РВМС активировали анти-CD3 и CD28 и культивировали отдельно или в присутствии hASC в контактных и бесконтактных условиях (48 ч). Супернатанты добавляли к активированным РВМС или hASC, которые далее росли по отдельности. Изменения относительного уровня мРНК ICAM-1 в РВМС (А) и hASC (Б) анализировали с помощью обратной транскрипции и qPCR через 48 часов инкубации с супернатантом (среднее значение + SEM, n=3, * $p < 0,05$).

приводит к повышенной транскрипции гена ICAM-1 и в лимфоцитах (рис. 4-41 А), и в hASC (рис. 4-41 Б), что позволяет предположить, что растворимые факторы влияют на регуляцию

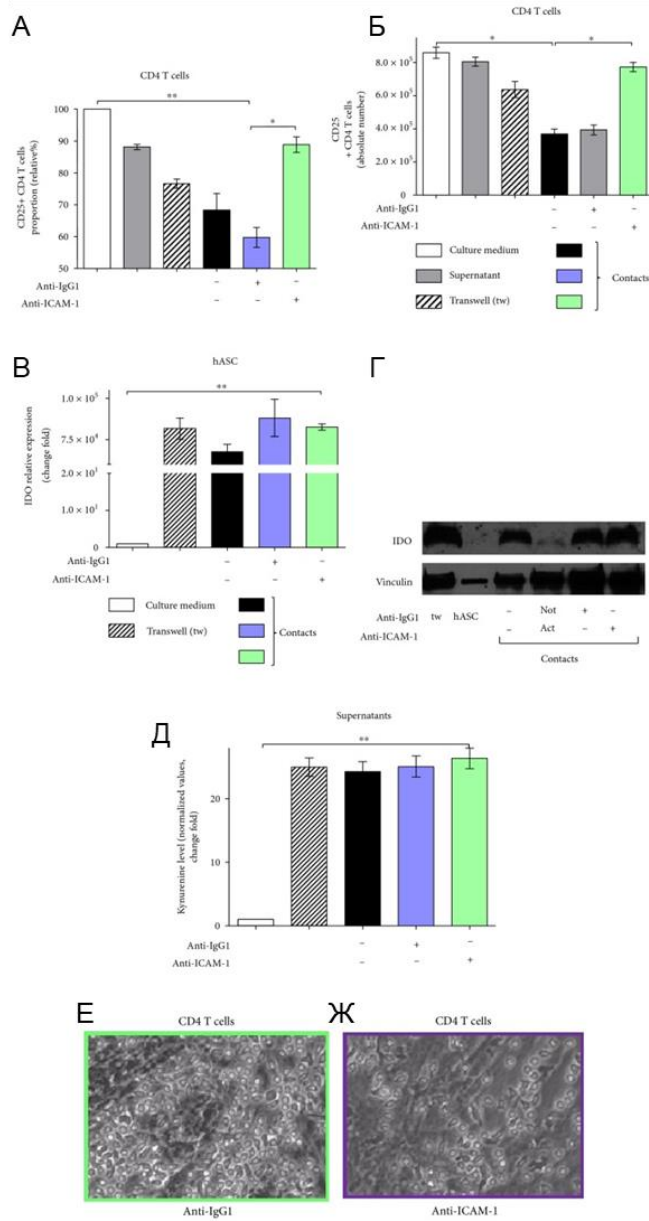


Рисунок 4-42. Блокировка CAM-1 ингибирует hASC-опосредованную иммуносупрессию независимо от IDO. CD3+CD4 T-клетки, выделенные из PBMC и активированные анти-CD3/анти-CD28, культивировали отдельно или с hASC в присутствии анти-ICAM-1 или контрольного IgG1 в контактных или бесконтактных условиях в течение 48 часов. Была определена доля и абсолютное количество CD25+CD4 T-клеток (А и Б, соответственно), изменение экспрессии гена IDO hASC (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 T-клеток-hASC после контрольной обработки IgG1 (Е) или анти-ICAM (Ж). Увеличение 10х.

транскрипции ICAM-1. Следует отметить, что супернатанты, собранные из культур, где Т-клетки, контактировали с hASC, оказывают более сильное влияние на транскрипцию ICAM-1, чем те, что были получены из бесконтактных культур.

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

Снижение ICAM-1 в активированных лимфоцитах, вызванное контактами с hASC, позволяет предположить, что ICAM-1 может участвовать в зависимой от контакта с клетками иммунной супрессии. Для проверки этого предположения заблокировали ICAM-1 на поверхности hASC и Т-клеток с помощью ICAM-специфических антител и проанализировали влияние блокировки ICAM на hASC-опосредованную супрессию Т-клеток. Инкубация с ICAM-1-блокирующими антителами приводит к значительному увеличению CD25 на поверхности лимфоцитов (рис. 4-42 А, Б), по сравнению с контрольными образцами, к которым добавляли IgG1. Эти данные можно рассматривать как свидетельство того, что ICAM-1 непосредственно участвует в ингибировании активации Т-клеток hASC *in vitro*. Чтобы проверить, может ли ICAM-1 влиять на уровень IDO и опосредованно регулировать иммуносупрессию, оценивали транскрипцию IDO и уровень белка в условиях блокировки антителами к ICAM-1. Удивительно, но опосредованная антителами блокировка ICAM-1 не влияет на уровень IDO как на уровне транскрипции, так и на уровне белка (рис. 4-42 В и Г). Уровень кинуренина в среде также не менялся (рис. 4-42 Д). Этот результат указывает на неперекрывающиеся роли ICAM-1 и IDO в hASC-опосредованной иммуносупрессии. Дополнительные эксперименты необходимы для дальнейшего выяснения детального молекулярного механизма вовлечения ICAM в контакты между MСК и Т-клетками.

4.4.11 Молекулы клеточной адгезии – потенциальная мишень для контроля воспаления в тканях

Подводя итог этой части работы, следует особо отметить, что роль ставших уже привычными молекул клеточной адгезии, таких как ICAM-1, может быть недооценена в процессах контроля воспаления и индукции регенеративных процессов на уровне отдельных тканей. В том числе, это относится и к такой важной в регуляторном и метаболическом аспектах ткани, как жировая. Известно, что хроническое воспаление на уровне абдоминальной жировой ткани может приводить к ее патологическому изменению, которое, в свою очередь, чревато системным метаболическим дисбалансом и, как следствие, тяжелым хроническим заболеваниями. В результате метаболического синдрома часто развивается диабет 2 типа, а также заболевания сердечно-сосудистой системы.

Известно, что в абдоминальном жире увеличен уровень, т.н. жировых Трег, которые, согласно свежим данным, критически важны для поддержания гомеостаза жировой ткани, особенно у пожилых людей. Поскольку МСК за счет своего секретомы могут увеличивать численность Трег, любопытно было бы проверить, играет ли ICAM-1 значимую роль во взаимодействиях Трег-МСК, которые возможны в рамках жировой ткани.

К сожалению, пока не понятно, может ли быть использована блокада ICAM-1 на уровне тканей для увеличения иммунного ответа, например, в контексте опухолевого микроокружения, поскольку лимфоциты используют эту молекулу для взаимодействия с АПК, эндотелием сосудов и клетками тканей. Соответственно, блокада ICAM должна негативно влиять на активацию лимфоцитов. Однако понимание того, что ICAM может участвовать в контроле воспаления на уровне тканевой стромы является важным с фундаментальной точки зрения.

5. СИСТЕМНЫЕ И ТКАНЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНОСУПРЕССИИ (ЗАКЛЮЧЕНИЕ)

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 приводит к потере времени и может сильно усугубить состояние больных и возможный успех дальнейшего лечения.

6. ВЫВОДЫ

1) Созданы и охарактеризованы новые линии мышей для Сге-опосредованного кондиционного нокаута генов в регуляторных CD4+Foxp3+ 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 в 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 флоксированный аллель гена Foxp1, индукция Сге-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-специфичных 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.

7. ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Starr T.K., Jameson S.C., Hogquist K.A. Positive and negative selection of T cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – V.21. – P.139–76.
2. Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation // *Annu. Rev. Immunol.* – 1996. – V.14. – P.233–58.
3. Bonomo A., Kehn P.J., Payer E., Rizzo L., Cheever A.W., Shevach E.M. Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells // *J. Immunol.* – 1995. – V.154 – P.6602–113.
4. Nishizuka Y., Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice // *Science.* – 1969. – V.166. – P.753–55.
5. Sakaguchi S., Takahashi T., Nishizuka Y. Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer // *J. Exp. Med.* – 1982. – V.156. – P.1565–76.
6. Asano M., Toda M., Sakaguchi N., Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation // *J. Exp. Med.* – 1996. – V.184. – P.387–96.
7. Ohki H., Martin C., Corbel C., Coltey M., Le Douarin N.M. Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds // *Science.* – 1987. – V.237. – P.1032–35.
8. Salaun J., Bandeira A., Khazaal I., Calman F., Coltey M., et al. Thymic epithelium tolerizes for histocompatibility antigens // *Science.* – 1990. – V.247. – P.1471–74.
9. Modigliani Y., Thomas-Vaslin V., Bandeira A., Coltey M., Le Douarin N.M., et al. Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V.92. – P.7555–59.
10. Le Douarin N., Corbel C., Bandeira A., Thomas-Vaslin V., Modigliani Y., et al. Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells // *Immunol. Rev.* – 1996. – V.149. – P.35–53.
11. Powrie F., Mason D. OX-22^{high}CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset // *J. Exp. Med.* – 1990. – V.172. – P.1701–8.
12. Morrissey P.J., Charrier K., Braddy S., Liggitt D., Watson J.D. CD4⁺ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic

severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4⁺ T cells // *J. Exp. Med.* – 1993. – V.178. – P.237–44.

13. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases // *J. Immunol.* – 1995. – V.155. – P.1151–64.

14. Shevach E.M. Regulatory T cells in autoimmunity // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – V.18. – P. 423–49.

15. Fehervari Z., Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells // *Curr. Opin. Immunol.* – 2004. – V.16. – P.203–8.

16. Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepers B., Clark L.B., et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse // *Nat. Genet.* – 2001. – V.27. – P.68–73.

17. Chatila T.A., Blaeser F., Ho N., Lederman H.M., Voulgaropoulos C., et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic deregulation syndrome // *J. Clin. Investig.* – 2000. – V.106. – P.R75–81.

18. Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3 // *Nat. Genet.* – 2001. – V.27. – P.20–21.

19. Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy // *Nat. Genet.* – 2001. – V.27. – P.18–20.

20. Gambineri E., Torgerson T.R., Ochs H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2003. – V.15. – P.430–35.

21. Godfrey V.L., Rouse B.T., Wilkinson J.E. Transplantation of T cell-mediated, lymphoreticular disease from the scurfy (sf) mouse // *Am. J. Pathol.* – 1994. – V. 145. – P.281–86.

22. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3 // *Immunity.* – 2005. – V.22. – P.329–41.

23. Gavin M.A., Rasmussen J.P., Fontenot J.D., Vasta V., Manganiello V.C., et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation // *Nature*. – 2007. – V.445. – P.771–75.
24. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 // *Science*. – 2003. – V. 299. – P.1057–61.
25. Khattri R., Cox T., Yasayko S.A., Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – P.337–42.
26. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2003. – V.4. – P.330–36.
27. Wan Y.Y., Flavell R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression // *Nature*. – 2007. - V445. – P.766–70.
28. Williams L.M., Rudensky A.Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3 // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8. – P.277–84
29. Wan Y.Y., Flavell R.A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V.102. – P. 5126–31.
30. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells // *Nature*. – 2006. – V.441. – P.235–38.
31. Lin W., Haribhai D., Relland L.M., Truong N., Carlson M.R., et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3 // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8. – P. 359–68.
32. Liston A., Farr A.G., Chen Z., Benoist C., Mathis D., et al. Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.475–80.
33. Hsieh C.S., Y., Liang Y., Fontenot J.D., Rudensky A.Y. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires // *Nat. Immunol.* – 2006. – V.7. – P. 401–10.
34. Chen Z., Benoist C., Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V.102. – P.14735–40.

35. Kim J.M., Rasmussen J.P., Rudensky A.Y. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8. – P.191–97.
36. Lahl K., Loddenkemper C., Drouin C., Freyer J., Arnason J., et al. Selective depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells induces a scurfy-like disease // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.57–63.
37. Chinen T., Volchkov P.Y., Chervonsky A.V., Rudensky A.Y. A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. – P. 2323–30.
38. Singer A., Adoro S., Park J.H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V.8. – P. 788–801.
39. Germain R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision // *Nat. Rev. Immunol.* – 2002. – V.2. – P.309–22.
40. Stromnes I.M., Cerretti L.M., Liggitt D., Harris R.A., Goverman J.M. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells // *Nat. Med.* – 2008. – V.14. – P.337–42.
41. Moran A.E., Holzapfel K.L., Xing Y., Cunningham N.R., Maltzman J.S., et al. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse // *J. Exp. Med.* – 2011. – V.208. – P.1279–89.
42. Azzam H.S., DeJarnette J.B., Huang K., Emmons R., Park C.S., et al. Fine tuning of TCR signaling by CD5 // *J. Immunol.* – 2001. – V.166. – P.5464–72.
43. Wong P., Barton G.M., Forbush K.A., Rudensky A.Y. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands // *J. Exp. Med.* – 2001. – V.193. – P.1179–87.
44. Carter J.D., Calabrese G.M., Naganuma M., Lorenz U. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2005. – V.174. – P.6627–38.
45. Lafaille J.J., Nagashima K., Katsuki M., Tonegawa S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice // *Cell.* – 1994. – V.78. – P.399–408.
46. Olivares-Villagómez D., Wang Y., Lafaille J.J. Regulatory CD4⁺ T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific

transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis // *J. Exp. Med.* – 1998. – V.188. – P.1883–94.

47. Kawahata K., Misaki Y., Yamauchi M., Tsunekawa S., Setoguchi K., et al. Generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression // *J. Immunol.* – 2002. – V.168. – P.4399–405.

48. Apostolou I., Sarukhan A., Klein L., von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen // *Nat. Immunol.* – 2002. – V.3. – P.756–63.

49. Walker L.S., Chodos A., Eggena M., Dooks H., Abbas A.K. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo // *J. Exp. Med.* – 2003. – V.198. – P.249–58.

50. Jordan M.S., Boesteanu A., Reed A.J., Petrone A.L., Hokenbeck A.E., et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide // *Nat. Immunol.* – 2001. – V.2. – P.301–6.

51. van Santen H.M., Benoist C., Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells // *J. Exp. Med.* – 2004. – V.200. – P.1221–30.

52. Hsieh C.S., Liang Y., Tzysnik A.J., Self S.G., Liggitt D., Rudensky A.Y. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors // *Immunity.* – 2004. – V.21. – P.267–77.

53. Pacholczyk R., Kern J. The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells // *Immunology.* – 2008. – V.125. – P.450–58.

54. Wong J., Obst R., Correia-Neves M., Losyev G., Mathis D., Benoist C. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4⁺ T cells // *J. Immunol.* – 2007. – V.178. – P.7032–41.

55. Pacholczyk R., Ignatowicz H., Kraj P., Ignatowicz L. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells // *Immunity.* – 2006. – V.25. – P.249–59.

56. Hinterberger M., Aichinger M., da Costa O.P., Voehringer D., Hoffmann R., Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4⁺ T cell tolerance // *Nat. Immunol.* – 2010. – V.11. – P.512–19.

57. Ouyang W., Beckett O., Ma Q., Li M.O. Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development // *Immunity.* – 2010. – V.32. – P.642–53.

58. Bautista J.L., Lio C.W., Lathrop S.K., Forbush K., Liang Y., et al. Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.610–17.
59. Leung M.W., Shen S., Lafaille J.J. TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3⁺ cells is limited to small clonal sizes // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.2121–30.
60. Long M., Park S.G., Strickland I., Hayden M.S., Ghosh S. Nuclear factor- κ B modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor // *Immunity.* – 2009. – V.31. – P.921–31.
61. Delgoffe G.M., Kole T.P., Zheng Y., Zarek P.E., Matthews K.L., et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment // *Immunity.* – 2009. – V.30. – P.832–44.
62. Josefowicz S.Z., Wilson C.B., Rudensky A.Y. Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1 // *J. Immunol.* – 2009. – V.182. – P.6648–52.
63. Liu G., Burns S., Huang G., Boyd K., Proia R.L., et al. The receptor S1P1 overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.769–77.
64. Patton D.T., Garden O.A., Pearce W.P., Clough L.E., Monk C.R., et al. Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 δ is critical for the function of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2006. – V.177. – P.6598–602.
65. Polansky J.K., Kretschmer K., Freyer J., Floess S., Garbe A., et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – V.38. – P.1654–63.
66. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes // *Immunity.* – 2000. – V.12. – P.431–40.
67. Tai X., Cowan M., Feigenbaum L., Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2 // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – P.152–62.
68. Mantel P.Y., Ouaked N., Ruckert B., Karagiannidis C., Welz R., et al. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells // *J. Immunol.* – 2006. – V.176. – P.3593–602.

69. Ouyang W., Beckett O., Ma Q., Paik J.H., DePinho R.A., Li M.O. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2010. – V.11. – P.618–27.
70. Kim H.P., Leonard W.J. CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1543–51.
71. Schmidt-Supprian M., Tian J., Grant E.P., Pasparakis M., Maehr R., et al. Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF- κ B activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V.101. – P.4566–71.
72. Gupta S., Manicassamy S., Vasu C., Kumar A., Shang W., Sun Z. Differential requirement of PKC- θ in the development and function of natural regulatory T cells // *Mol. Immunol.* – 2008. – V.46. – P.213–24.
73. Medoff B.D., Sandall B.P., Landry A., Nagahama K., Mizoguchi A., et al. Differential requirement for CARMA1 in agonist-selected T-cell development // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – V.39. – P.78–84.
74. Barnes M.J., Krebs P., Harris N., Eidenschenk C., Gonzalez-Quintial R., et al. Commitment to the regulatory T cell lineage requires CARMA1 in the thymus but not in the periphery // *PLoS Biol.* - 2009. – V.7. – P.e51.
75. Molinero L.L., Yang J., Gajewski T., Abraham C., Farrar M.A., Alegre M.L. CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3+ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2009. – V.182. – P.6736–43.
76. Sriskantharajah S., Belich M.P., Papoutsopoulou S., Janzen J., Tybulewicz V., et al. Proteolysis of NF- κ B1 p105 is essential for T cell antigen receptor-induced proliferation // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.38–47.
77. Isomura I., Palmer S., Grumont R.J., Bunting K., Hoyne G., et al. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3+ CD4 regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.3001–14.
78. Ruan Q., Kameswaran V., Tone Y., Li L., Liou H.C., et al. Development of Foxp3+ regulatory T cells is driven by the c-Rel enhanceosome // *Immunity.* – 2009. – V.31. – P.932–40.
79. Visekruna A., Huber M., Hellhund A., Bothur E., Reinhard K., et al. c-Rel is crucial for the induction of Foxp3+ regulatory CD4+ T cells but not T(H)17 cells // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – V.40. – P.671–76.

80. Zheng Y., Josefowicz S., Chaudhry A., Peng X.P., Forbush K., Rudensky A.Y. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate // *Nature*. – 2010. – V.463. – P.808–12.
81. Rao S., Gerondakis S., Woltring D., Shannon M.F. c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter // *J. Immunol.* – 2003. – V.170. – P.3724–31.
82. Weintraub H. Formation of stable transcription complexes as assayed by analysis of individual templates // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V.85. – P.5819–23.
83. Oh H., Grinberg-Bleyer Y., Liao W., Maloney D., Wang P., et al. An NF- κ B Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function // *Immunity* – 2017 – 2017. – V.47. – P. 450-65.
84. Fontenot J.D., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny // *J. Exp. Med.* – 2005. – V.202. – P.901–6.
85. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Moon J.J., Chu H.H., et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire // *Immunity*. – 2008. – V.28. – P.112–21.
86. Lio C.W., Hsieh C.S. A two-step process for thymic regulatory T cell development // *Immunity*. – 2008. – V.28. – P.100–11.
87. Gavin M.A., Bevan M.J. Increased peptide promiscuity provides a rationale for the lack of N regions in the neonatal T cell repertoire // *Immunity*. – 1995. – V. 3. – P.793–800.
88. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Gavin M.A., Rudensky A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – P.1142–51.
89. Burchill M.A., Yang J., Vang K.B., Farrar M.A. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis // *Immunol. Lett.* – 2007. – V.114. – P.1–8.
90. Malek T.R. The biology of interleukin-2 // *Annu. Rev. Immunol.* – 2008. – V.26. – P.453–79.

91. Vang K.B., Yang J., Mahmud S.A., Burchill M.A., Vegoe A.L., Farrar M.A. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development // *J. Immunol.* – 2008. – V.181. – P.3285–90.
92. Burchill M.A., Yang J., Vogtenhuber C., Blazar B.R., Farrar M.A. IL-2 receptor β -dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2007. – V.178. – P.280–90.
93. Yao Z., Kanno Y., Kerenyi M., Stephens G., Durant L., et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3 // *Blood.* – 2007. – V.109. – P.4368–75.
94. Burchill M.A., Goetz C.A., Prlic M., O'Neil J.J., Harmon I.R., et al. Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells // *J. Immunol.* – 2003. – V.171. – P.5853–64.
95. Malin S., McManus S., Cobaleda C., Novatchkova M., Delogu A., et al. Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development // *Nat. Immunol.* – 2010. – V.11. – P.171–79.
96. Liu Y., Zhang P., Li J., Kulkarni A.B., Perruche S., Chen W. A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2008. – V.9. – P.632–40.
97. Marie J.C., Letterio J.J., Gavin M., Rudensky A.Y. TGF- β 1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2005. - V201. – P.1061–67.
98. Li M.O., Sanjabi S., Flavell R.A. Transforming growth factor- β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms // *Immunity.* – 2006. – V.25. – P.455–71.
99. Marie J.C., Liggitt D., Rudensky A.Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor- β receptor // *Immunity.* – 2006. – V.25. – P.441–54.
100. Tone Y., Furuuchi K., Kojima Y., Tykocinski M.L., Greene M.I., Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer // *Nat. Immunol.* – 2008. - V9. – P.194–202.
101. Hsieh C.S., Rudensky A.Y. The role of TCR specificity in naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cell biology // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2005. – V.293. – P.25–42.

102. Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., Khazaie K., Nussenzweig M.C., von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – P.1219–27.
103. Lathrop S.K., Bloom S.M., Rao S.M., Nutsch K., Lio C.W., et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota // *Nature.* – 2011. – V.478. – P.250–54.
104. Lathrop S.K., Santacruz N.A., Pham D., Luo J., Hsieh C.S. Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205. – P.3105–17.
105. Gottschalk R.A., Corse E., Allison J.P. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. – P.1701–11.
106. Waldmann H., Adams E., Cobbold S. Reprogramming the immune system: co-receptor blockade as a paradigm for harnessing tolerance mechanisms // *Immunol. Rev.* – 2008. – V.223. – P.361–70.
107. Zheng S.G., Wang J.H., Stohl W., Kim K.S., Gray J.D., Horwitz D.A. TGF- β requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4⁺CD25⁺ regulatory cells // *J. Immunol.* – 2006. – V.176. – P.3321–29.
108. Kim J.M., Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells // *Immunol. Rev.* – 2006. – V.212. – P.86–98.
109. Benson M.J., Pino-Lagos K., Roseblatt M., Noelle R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1765–74.
110. Curotto de Lafaille M.A., Kutchukhidze N., Shen S., Ding Y., Yee H., Lafaille J.J. Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation // *Immunity.* – 2008. – V.29. – P.114–26.
111. Curotto de Lafaille M.A., Lafaille J.J. Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? // *Immunity.* – 2009. – V.30. – P.626–35.
112. Mucida D., Kutchukhidze N., Erazo A., Russo M., Lafaille J.J., Curotto de Lafaille M.A. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs // *J. Clin. Investig.* – 2005. – V.115. – P.1923–33.
113. Kretschmer K., Heng T.S., von Boehmer H. De novo production of antigen-specific suppressor cells in vivo // *Nat. Protoc.* – 2006. – V.1. – P.653–61.

114. Verginis P., McLaughlin K.A., Wucherpfennig K.W., von Boehmer H., Apostolou I. Induction of antigen-specific regulatory T cells in wild-type mice: visualization and targets of suppression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V.105. – P.3479–84.
115. Daniel C, Weigmann B., Bronson R., von Boehmer H. Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimetope // *J. Exp. Med.* – 2011. – V.208. – P.1501–10.
116. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3 // *J. Exp. Med.* – 2003. – V.198. – P.1875–86.
117. Selvaraj R.K., Geiger T.L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF- β // *J. Immunol.* – 2007. – V.179. – P.1390.
118. Zheng S.G., Wang J.H., Gray J.D., Soucier H., Horwitz D.A. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF- β , and IL-10 // *J. Immunol.* – 2004. – V.172. – P.5213–21.
119. Schallenberg S., Tsai P.Y., Riewaldt J., Kretschmer K. Identification of an immediate Foxp3⁻ precursor to Foxp3⁺ regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. – P.1393–407.
120. Davidson T.S., DiPaolo R.J., Andersson J., Shevach E.M. Cutting edge: IL-2 is essential for TGF- β -mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells // *J. Immunol.* – 2007. – V.178. – P.4022–26.
121. Horwitz D.A., Zheng S.G., Wang J., Gray J.D. Critical role of IL-2 and TGF- β in generation, function and stabilization of Foxp3⁺CD4⁺ Treg // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – V.38. – P.912–15.
122. Laurence A., Tato C.M., Davidson T.S., Kanno Y., Chen Z., et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation // *Immunity.* – 2007. – V.26. – P.371–81.
123. Bettelli E., Korn T., Oukka M., Kuchroo V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells // *Nature.* – 2008. – V.453. – P.1051–57.
124. Zhu J., Davidson T.S., Wei G., Jankovic D., Cui K., et al. Down-regulation of Gfi-1 expression by TGF- β is important for differentiation of Th17 and CD103⁺ inducible regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.329–41.

125. Grainger J.R., Smith K.A., Hewitson J.P., McSorley H.J., Harcus Y., et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. – P.2331–41.
126. Sauer S., Bruno L., Hertweck A., Finlay D., Leleu M., et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V.105. – P.7797–802.
127. Haxhinasto S., Mathis D., Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205. – P.565–74.
128. Harada Y., Harada Y., Elly C., Ying G., Paik J.H., et al. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. – P.1381–91.
129. Kerdiles Y.M., Stone E.L., Beisner D.R., McGargill M.A., Ch'en I.L., et al. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function // *Immunity.* – 2010. – V.33. – P.890–904.
130. Wong J., Mathis D., Benoist C. TCR-based lineage tracing: no evidence for conversion of conventional into regulatory T cells in response to a natural self-antigen in pancreatic islets // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.2039–45.
131. Annacker O., Coombes J.L., Malmstrom V., Uhlig H.H., Bourne T., et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis // *J. Exp. Med.* – 2005. – V.202. – P.1051–61.
132. Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Carcamo C.V., Hall J., Sun C.M., et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1757–64.
133. Sun C.M., Hall J.A., Blank R.B., Bouladoux N., Oukka M., et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1775–85.
134. Hill J.A., Hall J.A., Sun C.M., Cai Q., Ghyselinck N., et al. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi cells // *Immunity.* – 2008. – V.29. – P.758–70.
135. Xiao S., Jin H., Korn T., Liu S.M., Oukka M., et al. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF- β -driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression // *J. Immunol.* – 2008. – V.181. – P.2277–84.

136. Elias K.M., Laurence A., Davidson T.S., Stephens G., Kanno Y., et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway // *Blood*. – 2008. – V.111. – P.1013–20.
137. Xu L., Kitani A., Stuelten C., McGrady G., Fuss I., Strober W. Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I // *Immunity*. – 2010. – V.33. – P.313–25.
138. Maynard C.L., Hatton R.D., Helms W.S., Oliver J.R., Stephensen C.B., Weaver C.T. Contrasting roles for all-trans retinoic acid in TGF- β -mediated induction of Foxp3 and Il10 genes in developing regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.343–57.
139. Hall J.A., Bouladoux N., Sun C.M., Wohlfert E.A., Blank R.B., et al. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses // *Immunity*. – 2008. – V.29. – P.637–49.
140. Belkaid Y., Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells // *Immunity*. – 2008. – V.29. – P.362–71.
141. Atarashi K., Tanoue T., Shima T., Imaoka A., Kuwahara T., et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species // *Science*. – 2011. – V.331. – P.337–41.
142. Hill J.A., Feuerer M., Tash K., Haxhinasto S., Perez J., et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature // *Immunity*. – 2007. – V.27. – P.786–800.
143. Sugimoto N., Oida T., Hirota K., Nakamura K., Nomura T., et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis // *Int. Immunol.* – 2006. – V.18. – P.1197–209.
144. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function // *Nature*. – 2008. – V.453. – P.236–40.
145. Ivanov I.I., McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells // *Cell*. – 2006. – V.126. – P.1121–33.
146. Zheng Y., Josefowicz S.Z., Kas A., Chu T.T., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells // *Nature*. – 2007. – V.445. – P.936–40.

147. Marson A., Kretschmer K., Frampton G.M., Jacobsen E.S., Polansky J.K., et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation // *Nature*. – 2007. – V.445. – P.931–35.
148. Birzele F., Fauti T., Stahl H., Lenter M.C., Simon E., et al. Next-generation insights into regulatory T cells: expression profiling and FoxP3 occupancy in human // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V.39. – P.7946–60.
149. Schubert L.A., Jeffery E., Zhang Y., Ramsdell F., Ziegler S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V.276. – P.37672–79.
150. Samstein R.M., Arvey A., Josefowicz S.Z., Peng X., Reynolds A., et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification // *Cell*. – 2012. – V.151. – P.153–66.
151. Bettelli E., Dastrange M., Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – V.102. – P.5138–43.
152. Grant C., Oh U., Fugo K., Takenouchi N., Griffith C., et al. Foxp3 represses retroviral transcription by targeting both NF- κ B and CREB pathways // *PLoS Pathog.* – 2006. – V.2. – P.e33.
153. Lopes J.E., Torgerson T.R., Schubert L.A., Anover S.D., Ocheltree E.L., et al. Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor // *J. Immunol.* – 2006. – V.177. – P.3133–42.
154. Cobaleda C., Jochum W., Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors // *Nature*. – 2007. – V.449. – P.473–77.
155. Ghisletti S., Barozzi I., Mietton F., Polletti S., De Santa F., et al. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages // *Immunity*. – 2010. – V.32. – P.317–28.
156. Heinz S., Benner C., Spann N., Bertolino E., Lin Y.C., et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities // *Mol. Cell*. – 2010. – V.38. – P.576–89.
157. Zheng Y., Chaudhry A., Kas A., deRoos P., Kim J.M., et al. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses // *Nature*. – 2009. – V.458. – P.351–56.

158. Li B., Saouaf S.J., Samanta A., Shen Y., Hancock W.W., Greene M.I. Biochemistry and therapeutic implications of mechanisms involved in FOXP3 activity in immune suppression // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – V.19. – P.583–88.
159. Li B., Samanta A., Song X., Iacono K.T., Bembas K., et al. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V.104. – P.4571–76.
160. Patel J.H., Du Y., Ard P.G., Phillips C., Carella B., et al. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60 // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V.24. – P.10826–34.
161. Wu Y., Borde M., Heissmeyer V., Feuerer M., Lapan A.D., et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT // *Cell.* – 2006. – V.126. – P.375–87.
162. Ono M., Yaguchi H., Ohkura N., Kitabayashi I., Nagamura Y., et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1 // *Nature.* – 2007. – V.446. – P.685–89.
163. Bandukwala H.S., Wu Y., Feuerer M., Chen Y., Barboza B., et al. Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells // *Immunity.* – 2011. – V.34. – P.479–91.
164. Suwanvanichkij V. Displacement and disease: the Shan exodus and infectious disease implications for Thailand // *Confl. Health.* – 2008. – V.2. – P.4.
165. Rudra D., Egawa T., Chong M.M., Treuting P., Littman D.R., Rudensky A.Y. Runx-CBF β complexes control expression of the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.1170–77.
166. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell.* – 2004. – V.116. – P.281–97.
167. Cobb B.S., Hertweck A., Smith J., O'Connor E., Graf D., et al. A role for Dicer in immune regulation // *J. Exp. Med.* – 2006. – V.203. – P.2519–27.
168. Liston A., Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovskiy A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205. – P.1993–2004.
169. Chong M.M., Rasmussen J.P., Rudensky A.Y., Littman D.R. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205. – P.2005–17.

170. Zhou X., Jeker L.T., Fife B.T., Zhu S., Anderson M.S., et al. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity // *J. Exp. Med.* – 2008. – V.205. – P.1983–91.
171. Lu L.F., Thai T.H., Calado D.P., Chaudhry A., Kubo M., et al. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein // *Immunity.* – 2009. – V.30. – P.80–91.
172. Kohlhaas S., Garden O.A., Scudamore C., Turner M., Okkenhaug K., Vigorito E. Cutting edge: the Foxp3 target miR-155 contributes to the development of regulatory T cells. // *J. Immunol.* – 2009. – V.182. P. 2578–82.
173. Yao R., Ma Y.L., Liang W., Li H.H., Ma Z.J., Yu X., et al. MicroRNA-155 modulates Treg and Th17 cells differentiation and Th17 cell function by targeting SOCS1. // *PLoS One.* – 2012. - V.7. -e46082.
174. Sanchez-Diaz R., Blanco-Dominguez R., Lasarte .S, Tsilingiri K., Martin-Gayo E., et al. Thymus-derived regulatory T cell development is regulated by C-type lectin-mediated BIC/microRNA 155 expression. *Mol. Cell. Biol.* – 2017. - V.37. – P.1–18.
175. Heyn J., Luchting B., Hinske L.C., Hübner M., Azad S.C., Kreth S. miR-124a and miR-155 enhance differentiation of regulatory T cells in patients with neuropathic pain. // *J. Neuroinflammation.* – 2016. – V.13. - P.248.
176. Warth S.C., Hoefig K.P., Hiekel A., Schallenberg S., Jovanovic K., et al. Induced miR-99a expression represses Mtor cooperatively with miR-150 to promote regulatory T-cell differentiation. // *EMBO J.* – 2015. – V.34. - P.1195–213.
177. Singh Y., Garden O.A., Lang F., Cobb B.S. MicroRNA-15b/16 enhances the induction of regulatory T cells by regulating the expression of Rictor and mTOR. // *J. Immunol.* – 2015. – V.195. - P.5667–77.
178. Negi V., Paul D., Das S., Bajpai P., Singh S., et al. Altered expression and editing of miRNA-100 regulates iTreg differentiation. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V.43. – P.57–65.
179. Qin A., Wen Z., Zhou Y., Li Y., Li Y., et al. MicroRNA-126 regulates the induction and function of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells through PI3K/AKT pathway. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2013. – V.17. -P.252–64.
180. Merckenschlager M., von Boehmer H. PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. // *J. Exp. Med.* – 2010. – V.207. -P.1347–50.

181. Crellin N.K., Garcia R.V., Levings M.K. Altered activation of AKT is required for the suppressive function of human CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. // *Blood*. – 2007. – V.109. P.2014–22.
182. Murugaiyan G., Beynon V., Mittal A., Joller N., Weiner H.L. Silencing microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. // *J. Immunol.* – 2011. – V.187. - P.2213–21.
183. Rouas R., Fayyad-Kazan H., El Zein N., Lewalle P., Rothe F., et al. Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – V.39. – P.1608–18.
184. Jiang S., Li C., Olive V., Lykken E., Feng F., et al. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. // *Blood*. - 2011. – V.118. P.5487–97.
185. Baumjohann D., Ansel K.M. MicroRNA regulation of T helper cell differentiation and plasticity. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – V.13. – P.666.
186. Kang S.G., Liu W.H., Lu P., Jin H.Y., Lim H.W., et al. MicroRNAs of the miR-17~92 family are critical regulators of T(FH) differentiation. // *Nat. Immunol.* – 2013. – V.14. – P.849–57.
187. Liu S.Q., Jiang S., Li C., Zhang B., Li Q.J. miR-17-92 cluster targets phosphatase and tensin homology and Ikaros family zinc finger 4 to promote TH17-mediated inflammation. // *J. Biol. Chem.* – 2014. – V.289. – P.12446–56.
188. Benson M.J., Pino-Lagos K., Roseblatt M., Noelle R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1765–74.
189. Cho S., Wu C.J., Yasuda T., Cruz L.O., Khan A.A., et al. miR-23~27~24 clusters control effector T cell differentiation and function. // *J. Exp. Med.* – 2016. – V.213. – P.235–49.
190. Gao Y., Lin F., Su J., Gao Z., Li Y., et al. Molecular mechanisms underlying the regulation and functional plasticity of FOXP3⁺ regulatory T cells. // *Genes Immun.* – 2012. – V.13. P.1.
191. Monticelli S. MicroRNAs in T helper cell differentiation and plasticity. // *Semin.Immunol.* – 2013. – V.25. – P.291–8.
192. Kelada S., Sethupathy P., Okoye I.S., Kistasis E., Czieso S., et al. miR-182 and miR-10a are key regulators of Treg specialisation and stability during schistosome and Leishmania-associated inflammation. // *PLoS Pathog.* – 2013. – V. 9. - e1003451.

193. Jeker L.T., Zhou X., Gershberg K., de Kouchkovsky D., Morar M.M., et al. MicroRNA 10a marks regulatory T cells. // *PLoS One*. – 2012. - V7. - e36684.
194. Fayyad-Kazan H., Rouas R., Fayyad-Kazan M., Badran R., El Zein N., et al. MicroRNA profile of circulating CD4-positive regulatory T cells in human adults and impact of differentially expressed microRNAs on expression of two genes essential to their function. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V.287. – P.9910–22.
195. Liu X., Robinson S., Setoyama T., Tung S., D'abundo L., et al. FOXP3 is a direct target of miR15a/16 in umbilical cord blood regulatory T cells. // *Bone Marrow Transplant.* – 2014. - V.49. – P.793.
196. Muranski P., Restifo N.P. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. // *Blood*. – 2013. – V.121. – P.2402–14.
197. Dong L., Wang X., Tan J., Li H., Qian W., et al. Decreased expression of microRNA-21 correlates with the imbalance of Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2014. - V.18. – P.2213–24.
198. Kennedy G.A., Varelias A., Vuckovic S., Le Texier L., Gartlan K.H., et al. Addition of interleukin-6 inhibition with tocilizumab to standard graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic stem-cell transplantation: a phase 1/2 trial. // *Lancet Oncol.* – 2014. – V.15. – P.1451–9.
199. Yang H.-Y., Barbi J., Wu C.-Y., Zheng Y., Vignali P.D., et al. MicroRNA-17 modulates regulatory T cell function by targeting Co-regulators of the Foxp3 transcription factor. // *Immunity*. – 2016. – V.45. - 83–93.
200. Koch M.A., Tucker-Heard G., Perdue N.R., Killebrew J.R., Urdahl K.B., Campbell D.J. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.595–602.
201. Lu L.F., Boldin M.P., Chaudhry A., Lin L.L., Taganov K.D., Hanada T., et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. // *Cell* – 2010. – V.142. – P. 914–29.
202. Dooley J., Linterman M.A., Liston A. MicroRNA regulation of T-cell development. // *Immunol. Rev.* – 2013. – V.253. P.53–64.
203. Lu L.-F., Gasteiger G., Yu I.-S., Chaudhry A., Hsin J.-P., et al. A single miRNA-mRNA interaction affects the immune response in a context-and cell-type-specific manner. // *Immunity*. – 2015. – V.43. – P.52–64.

204. Beyer M., Thabet Y., Muller R.U., Sadlon T., Classen S., et al. Repression of the genome organizer SATB1 in regulatory T cells is required for suppressive function and inhibition of effector differentiation. // *Nat. Immunol.* – 2011. – V.12. – P.898–907.
205. Kitagawa Y., Ohkura N., Kidani Y., Vandenbon A., Hirota K., et al. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. // *Nat. Immunol.* – 2017. – V.18. - P.173–83.
206. Belver L., Papavasiliou F.N., Ramiro A.R. MicroRNA control of lymphocyte differentiation and function. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – V.23. – P.368–73.
207. Shan J., Feng L., Luo L., Wu W., Li C., et al. MicroRNAs: potential biomarker in organ transplantation. *Transpl. Immunol.* – 2011. – V.24. – P.210–5.
208. Zhang M., Zhang Q., Liu F., Yin L., Yu B., Wu J. MicroRNA-155 may affect allograft survival by regulating the expression of suppressor of cytokine signaling 1. // *Med. Hypotheses.* – 2011. – V.77. – P.682–4.
209. Skinner J.P., Keown A.A., Chong M.M. The miR-17~92a cluster of microRNAs is required for the fitness of Foxp3+ regulatory T cells. // *PLoS One* – 2014. – V.9. - e88997.
210. de Kouchkovsky D., Esensten J.H., Rosenthal W.L., Morar M.M., Bluestone J.A., Jeker L.T. MicroRNA-17–92 regulates IL-10 production by regulatory T cells and control of experimental autoimmune encephalomyelitis. // *J. Immunol.* – 2013. – V.191. – P.1594–605.
211. Xiao C., Srinivasan L., Calado D.P., Patterson H.C., Zhang B., et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with elevated miR-17–92 expression in lymphocytes. // *Nat. Immunol.* – 2008. - V.9. – P.405.
212. Lu Y., Hippen K.L., Lemire A.L., Gu J., Wang W., et al. miR-146b antagomir-treated human Tregs acquire increased GVHD inhibitory potency. // *Blood.* – 2016. – V. 128. – P.1424–35.
213. Huang B., Zhao J., Lei Z., Shen S., Li D., et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep.* – 2009. – V.10. – P.180–5.172214. Komatsu N., Mariotti Ferrandiz M.E., Wang Y., Malissen B., Waldmann H., Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V.106. – P.1903–8.

215. Osorio F., LeibundGut-Landmann S., Lochner M., Lahl K., Sparwasser T., et al. DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers // *Eur. J. Immunol.* - 2008. - V.38. - P.3274-81.
216. Xu L., Kitani A., Fuss I., Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β // *J. Immunol.* - 2007. - V.178. - P.6725-29.
217. Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J., Kang H.S., Chung Y., et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs // *Immunity.* - 2008. - V.29. - P.44-56.
218. Vu M.D., Xiao X., Gao W., Degauque N., Chen M., et al. OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs // *Blood.* - 2007. - V.110. - P.2501-10.
219. So T., Croft M. Cutting edge: OX40 inhibits TGF- β - and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25⁺Foxp3⁺ T cells // *J. Immunol.* - 2007. - V.179. - P.1427-30.
220. Zhou X., Bailey-Bucktrout S.L., Jeker L.T., Penaranda C., Martinez-Llordella M., et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo // *Nat. Immunol.* - 2009. - V.10. - P.1000-7.
221. Josefowicz S.Z., Niec R., Kim H.Y., Treuting P., Chinen T., et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal Th2 inflammation // *Nature.* - 2012. - V. 482. - P.395-9.
222. Baron U., Floess S., Wiczorek G., Baumann K., Grutzkau A., et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells // *Eur. J. Immunol.* - 2007. - V.37. - P.2378-89.
223. Floess S., Freyer J., Siewert C., Baron U., Olek S., et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells // *PLoS Biol.* - 2007. - V.5. - P.e38.
224. Polansky J.K., Schreiber L., Thelemann C., Ludwig L., Krüger M., et al. Methylation matters: binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells // *J. Mol. Med.* - 2010. - V.88. - P.1029-40.
225. Bruno L., Mazarella L., Hoogenkamp M., Hertweck A., Cobb B.S., et al. Runx proteins regulate Foxp3 expression // *J. Exp. Med.* - 2009. - V.206. - P.2329-37.
226. Kitoh A., Ono M., Naoe Y., Ohkura N., Yamaguchi T., et al. Indispensable role of the Runx1-Cbfb transcription complex for in vivo-suppressive function of FoxP3⁺ regulatory T cells // *Immunity.* - 2009. V.31. - P.:609-20.

227. Klunker S., Chong M.M., Mantel P.Y., Palomares O., Bassin C., et al. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.2701–15.
228. Ziegler S.F. FOXP3: of mice and men // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – V.24. – P.209–26.
229. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R., Crellin N., Dai M., et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs // *J. Clin. Investig.* – 2005. – V.115. – P.3276–84.
230. Gavin M.A., Torgerson T.R., Houston E., DeRoos P., Ho W.Y., et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V.103. – P.6659–64.
231. Morgan M.E., van Bilsen J.H., Bakker A.M., Heemskerk B., Schilham M.W., et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans // *Hum. Immunol.* – 2005. – V.66. – P.13–20.
232. Wang J., Ioan-Facsinay A., van der Voort E.I., Huizinga T.W., Toes R.E. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – V.37. – P.129–38.
223. Shevach E.M., Tran D.Q., Davidson T.S., Andersson J. The critical contribution of TGF- β to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function // *Eur. J. Immunol.* – 2008. – V.38. – P.915–17.
224. McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A., Young D.A., Shevach E.M., et al. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells :gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor // *Immunity.* – 2002. – V.16. – P.311–23.
225. Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T., Ishida Y., Sakaguchi S. Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance // *Nat. Immunol.* – 2002. – V.3. – P.135–42.
226. Ronchetti S., Zollo O., Bruscoli S., Agostini M., Bianchini R., et al. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – V.34. – P.613–22.
227. Stephens G.L., McHugh R.S., Whitters M.J., Young D.A., Luxenberg D., et al. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T

cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells // *J. Immunol.* – 2004. – V.173. – P.5008–20.

228. Malek T.R., Yu A., Zhu L., Matsutani T., Adeegbe D., Bayer A.L. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis // *J. Clin. Immunol.* – 2008. – V.28. – P.635–39.

229. Pandiyan P., Zheng L., Ishihara S., Reed J., Lenardo M.J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells // *Nat. Immunol.* – 2007. – V.8. – P.1353–62.

230. Bachmann M.F., Kohler G., Ecabert B., Mak T.W., Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous // *J. Immunol.* – 1999. – V.163. – P.1128–31.

231. Read S., Malmstrom V., Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation // *J. Exp. Med.* – 2000. – V.192. – P.295–302.

232. Read S., Greenwald R., Izcue A., Robinson N., Mandelbrot D., et al. Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo // *J. Immunol.* – 2006. – V.177. – P.4376–83.

233. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 // *J. Exp. Med.* – 2000. – V.192. – P.303–10.

234. Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function // *Science.* – 2008. – V.322. – P.271–75.

235. Friedline R.H., Brown D.S., Nguyen H., Kornfeld H., Lee J., et al. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance // *J. Exp. Med.* – 2009. – V.206. – P.421–34.

236. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4 // *Science.* – 2011. – V.332. – P.600–3.

2237. Kobie J.J., Shah P.R., Yang L., Rebhahn J.A., Fowell D.J., Mosmann T.R. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine // *J. Immunol.* – 2006. – V.177. – P.6780–86.

2238. Bopp T., Becker C., Klein M., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1303–10.
239. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression // *Blood.* – 2007. – V.110. – P.1225–32.
240. Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression // *J. Exp. Med.* – 2007. – V.204. – P.1257–65.
241. Huang C.T., Workman C.J., Flies D., Pan X., Marson A.L., et al. Role ofLAG-3 in regulatory T cells // *Immunity.* – 2004. – V.21. – P.503–13.
242. Liang B., Workman C., Lee J., Chew C., Dale B.M., et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II // *J. Immunol.* – 2008. – V.180. – P.5916–26.
243. Yu X., Harden K., Gonzalez L.C., Francesco M., Chiang E., et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.48–57.
244. Tang Q., Adams J.Y., Tooley A.J., Bi M., Fife B.T., et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice // *Nat. Immunol.* – 2006. – V.7. – P.83–92.
245. Tadokoro C.E., Shakhar G., Shen S., Ding Y., Lino A.C., et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo // *J. Exp. Med.* – 2006. – V.203. – P.505–11.
246. Sarris M., Andersen K.G., Randow F., Mayr L., Betz A.G. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition // *Immunity.* – 2008. – V.28. – P.402–13.
247. Solomon B.D., Mueller C., Chae W.J., Alabanza L.M., Bynoe M.S. Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – V.108. – P.2040–45.
248. Ronchetti S., Nocentini G., Riccardi C., Pandolfi P.P. Role of GITR in activation response of T lymphocytes // *Blood.* – 2002. – V.100. – P.350–52.
249. Shevach E.M., McHugh R.S., Piccirillo C.A., Thornton A.M. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells // *Immunol. Rev.* – 2001. – V.182. – P.58–67.

250. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells // *Nat. Immunol.* – 2005. – V.6. – P.338–44.
251. Rubtsov Y.P., Rasmussen J.P., Chi E.Y., Fontenot J., Castell L., et al. IL-10 produced by regulatory T cells contributes to their suppressor function by limiting inflammation at environmental interfaces // *Immunity.* – 2008. – V.28. – P.546–58.
252. Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function // *Nature.* – 2007. – V.450. – P.566–69.
253. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor- β 1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation // *Immunity.* – 2007. – V.26. – P.579–91.
254. Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death // *Immunity.* – 2004. – V.21. – P.589–601.
255. Gondek D.C., Lu L.F., Quezada S.A., Sakaguchi S., Noelle R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism // *J. Immunol.* – 2005. – V.174. – P.1783–86.
256. Zhao D.M., Thornton A.M., DiPaolo R.J., Shevach E.M. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes // *Blood.* – 2006. – V.107. – P.3925–32.
257. Gondek D.C., Devries V., Nowak E.C., Lu L.F., Bennett K.A., et al. Transplantation survival is maintained by granzyme B⁺ regulatory cells and adaptive regulatory T cells // *J. Immunol.* – 2008. – V.181. – P.4752–60.
258. Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., Song J., Collins L.I., et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance // *Immunity.* – 2007. – V.27. – P.635–46.
259. Chaudhry A., Rudra D., Treuting P., Samstein R.M., Liang Y., et al. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner // *Science.* – 2009. – V.326. – P.986–91.
260. Chung Y., Tanaka S., Chu F., Nurieva R.I., Martinez G.J., et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions // *Nat. Med.* – 2011. – V.17. – P.983–88.

261. Linterman M.A., Pierson W., Lee S.K., Kallies A., Kawamoto S., et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response // *Nat. Med.* – 2011. – V.17. – P.975–82.
262. Feuerer M., Hill J.A., Mathis D., Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes // *Nat. Immunol.* – 2009. – V.10. – P.689–95.
263. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. // *Nat. Med.* – 2009.- V.15. P.921–29.
264. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, et al. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* - 1993. – V.259. P.974–77. 265. Kendal AR, Chen Y, Regateiro FS, Ma J, Adams E, et al. Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. *J. Exp. Med.* - 2011. – V.208. P.2043–53.
266. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. // *Nature.* – 2003. – V. 423. – P.356–61.
267. Kochi Y., Okada Y., Suzuki A., Ikari K., Terao C., et al. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. // *Nat. Genet.* – 2010. – V.42. – P.515–19.
268. Begovich A.B., Carlton V.E., Honigberg L.A., Schrodi S.J., Chokkalingam A.P., et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. // *Am J Hum Genet.* – 2004. – V.75. – P.330–37.
269. Lee A.T., Li W., Liew A., Weisman M., Massarotti E.M., et al. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. // *Genes Immun.* -2005. – V.6. – P.129–33.
270. Bang S.-Y., Lee K.-H., Cho S.-K., Lee H.-S., Lee K.W., et al. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status // *Arthritis Rheum.* – 2010. – V.62. – P.69-77.
271. Feitsma A.L., van der Voort E.I., Franken K.L., el Bannoudi H., Elferink B.G., et al. Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis. // *Arthritis Rheum.* – 2010. - V.62. – P.117-25.

272. Charpin C., Balandraud N., Guis S., Roudier C., Toussirot E., et al. HLA-DRB1*0404 is strongly associated with high titers of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2008. - V.26. – P.627-31.
273. Bellatin M.F., Han M., Fallena M., Fan L., Xia D., et al. Production of autoantibodies against citrullinated antigens/peptides by human B cells. // *J. Immunol.* – 2012.- V.188.- P.542-50.
274. Cordova K.N., Willis V.C., Haskins K., Holers V.M. A citrullinated fibrinogen-specific T cell line enhances autoimmune arthritis in a mouse model of rheumatoid arthritis. // *J. Immunol.* – 2013. – V.190. – P.1457-65.
275. Arnoux F., Mariot C., Peen E., Lambert N.C., Balandraud N., et al. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2017. - V.114. – P.E10169-E10177.
276. Gorlino C.V., Dave M.N., Blas R., Crespo M.I., Lavanchy A., et al. Association between levels of synovial anti-citrullinated peptide antibodies and neutrophil response in patients with rheumatoid arthritis. // *Eur. J. Immunol.* – 2018.- V.48. – P.1563-72.
277. Pieper J., Dubnovitsky A., Gerstner C., James E.A., Rieck M., et al. Memory T cells specific to citrullinated α -enolase are enriched in the rheumatic joint. // *J. Autoimmun.* – 2018. – V.92. – P.47-56.
278. Infantino M., Manfredi M., Meacci F., Sarzi-Puttini P., Ricci C., et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor isotypes in the diagnosis of rheumatoid arthritis: an assessment of combined tests. // *Clin. Chim. Acta.* – 2014. – V.436. – P.237-42.
279. Fang Q., Ou J., Nandakumar K.S. Autoantibodies as Diagnostic Markers and Mediator of Joint Inflammation in Arthritis. // *Mediators Inflamm.* – 2019. – V. 2019. – P.6363086.
280. Huang X., He Y., Han J., Zhuang J., He J., Sun E. Not only anti-inflammation, etanercept abrogates collagen-induced arthritis by inhibiting dendritic cell migration and maturation. // *Cent. Eur. J. Immunol.* – 2019. – V.44. – P.237-245.
281. Spiering R., Jansen M.A.A., Wood M.J., Fath A.A., Eltherington O., et al. Targeting of tolerogenic dendritic cells to heat-shock proteins in inflammatory arthritis. // *J. Transl. Med.* – 2019. – V.17. – P.375.

282. Isaacs J.D., Iqbal K. Potential Pharmacologic Targets for the Prevention of Rheumatoid Arthritis. // *Clin. Ther.* – 2019. – V.41. – P.1312-22.

283. Cutolo M., Sulli A., Paolino S., Pizzorni C. CTLA-4 blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: an update. // *Expert. Rev. Clin. Immunol.* – 2016. – V.12. – P. 417-25.

284. Fortea-Gordo P., Nuño L., Villalba A., Peiteado D., Monjo I., et al. Two populations of circulating PD-1hiCD4 T cells with distinct B cell helping capacity are elevated in early rheumatoid arthritis. // *Rheumatology (Oxford)*. – 2019. – V.58. – P.1662-73.

285. Nevius E., Gomes AC., Pereira J.P. Inflammatory Cell Migration in Rheumatoid Arthritis: A Comprehensive Review. // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2016. – V.51. – P.59-78.

286. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S., Nakashima T., Oh-hora M., et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. // *Nat. Med.* – 2014. - V.20. – P.62-8.

287. Pfeifle R., Rothe T., Ipseiz N., Scherer H.U., Culemann S. Regulation of autoantibody activity by the IL-23-T(H)17 axis determines the onset of autoimmune disease. // *Nat. Immunol.* – 2017. – V.18. – P.104-113.

288. Allard-Chamard H., Carrier N., Dufort P., Durand M., de Brum-Fernandes A.J., et al. Osteoclasts and their circulating precursors in rheumatoid arthritis: Relationships with disease activity and bone erosions. // *Bone Rep.* – 2020. - V.12. – P.100282.

289. McHugh J. CCL21-CCR7 axis in RA: linking inflammation and bone erosion. // *Nat. Rev. Rheumatol.* - 2019. – V.15. – P.576.

290. Alivernini S., MacDonald L., Elmesmari A., Finlay S., Tulusso B. et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. // *Nat. Med.* – 2020. – V.26. – P.1295-1306.

291. Wei K., Korsunsky I., Marshall J.L., Gao A., Watts G.F.M., et al. Notch signaling drives synovial fibroblast identity and arthritis pathology. // *Nature.* – 2020. – V.582. – P.259-64.

292. Kalden J.R. Emerging Therapies for Rheumatoid Arthritis. // *Rheumatol. Ther.* – 2016.- V.3. - P.31-293. Iwata S, Tanaka Y. Progress in understanding the safety and efficacy of Janus kinase inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis. // *Expert Rev. Clin. Immunol.* – 2016. – V.12. P. 1047-57.

294. Conigliaro P., Triggianese P., De Martino E., Fonti G.L., Chimenti M.S., et al. Challenges in the treatment of Rheumatoid Arthritis. // *Autoimmun. Rev.* – 2019. - V.18. – P.706-13.
295. Andersen K.M., Kelly A., Lyddiatt A., Bingham C.O. 3rd, Bykerk V.P., et al. Patient Perspectives on DMARD Safety Concerns in Rheumatology Trials: Results from Inflammatory Arthritis Patient Focus Groups and OMERACT Attendees Discussion. // *J. Rheumatol.* – 2019. - V.46. – P.1168-72.
296. Marino A., Giani T., Cimaz R. Risks associated with use of TNF inhibitors in children with rheumatic diseases. // *Expert Rev. Clin. Immunol.* – 2019. - V.15. – P.189-198.
297. Wang W., Zhou H., Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – V.158. – P:502-516.
298. Zavvar M., Assadiasl S., Zargarani S., Akhtari M., Poopak B., et al. Adoptive Treg cell-based immunotherapy: Frontier therapeutic aspects in rheumatoid arthritis. // *Immunotherapy.* – 2020. – V.12. – P.933-46.
299. Santinon F., Batignes M., Mebrek M.L., Biton J., Clavel G., et al. Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Type II in FoxP3 Stability and as a Marker of Treg Cells Specifically Expanded by Anti-Tumor Necrosis Factor Treatments in Rheumatoid Arthritis. // *Arthritis Rheumatol.* – 2020. – V.72. - 576-87.
300. Bell G.M., Anderson A.E., Diboll J., Reece R., Eltherington O., et al. Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2017. – V.76. – P.227-234.
301. Miao J., Zhu P. Functional Defects of Treg Cells: New Targets in Rheumatic Diseases, Including Ankylosing Spondylitis. // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2018. - V.20. – P.30.
302. Cribbs AP, Kennedy A, Penn H, Read JE, Amjadi P, et al. Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by ctla-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – V.66. – P.2344-54.
303. Attias M., Al-Aubodah T., Piccirillo C.A. Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2019. - V.197. – P.36-51.
304. Farrugia M., Baron B. The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. // *J. Clin. Transl. Res.* – 2016. – V.2. – P.84-90.

305. Zhou Y., Leng X., Luo S., Su Z., Luo X., et al. Tolerogenic Dendritic Cells Generated with Tofacitinib Ameliorate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Modulation of Th17/Treg Balance. // *J. Immunol. Res.* – 2016. – V.2016. – P.5021537.
306. Yokoyama Y., Iwasaki T., Kitano S., Satake A., Nomura S., et al. IL-2-Anti-IL-2 Monoclonal Antibody Immune Complexes Inhibit Collagen-Induced Arthritis by Augmenting Regulatory T Cell Functions. // *J. Immunol.* – 2018. – V.201. – P.899-1906.
307. Ahmed M.S., Bae Y.S. Dendritic Cell-based Immunotherapy for Rheumatoid Arthritis: from Bench to Bedside. // *Immune Netw.* – 2016. – V.16. – P.44-51.
308. Zhang X., Olsen N., Zheng S.G. The progress and prospect of regulatory T cells in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* – 2020. – V.111. – P.102461.
309. Kikuchi J., Hashizume M., Kaneko Y., Yoshimoto K., Nishina N., et al. Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. // *Arthritis Res. Ther.* – 2015. – V. 17. – P.10.
310. Walter G.J., Evans H.G., Menon B., Gullick N.J., Kirkham B.W., et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4+CD45ro+CD25+CD127(low) regulatory T cells. // *Arthritis Rheum.* – 2013. – V.65. – P.627-38.
311. Kennedy A., Schmidt E.M., Cribbs A.P., Penn H., Amjadi P., et al. A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibits dysregulated methylation in rheumatoid arthritis Treg cells. // *Eur. J. Immunol.* – 2014. – V.44. – P.2968-78.
312. Ellis S.D., McGovern J.L., van Maurik A., Howe D., Ehrenstein M.R., Notley C.A. Induced CD8+FoxP3+ Treg cells in rheumatoid arthritis are modulated by p38 phosphorylation and monocytes expressing membrane tumor necrosis factor α and CD86. // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – V.66. – P.2694-705.
313. Yu J., Zhou P. The advances of methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. // *Inflammopharmacology.* – 2020. – V.28. – P.1183-93.
314. Wang Q., Oryoji D., Mitoma H., Kimoto Y., Koyanagi M., et al. Methotrexate Enhances Apoptosis of Transmembrane TNF-Expressing Cells Treated with Anti-TNF Agents. // *Front. Immunol.* – 2020. – V.11. – P.2042.

315. Emery P., Horton S., Dumitru R.B., Naraghi K., van der Heijde D., et al. Pragmatic randomised controlled trial of very early etanercept and MTX versus MTX with delayed etanercept in RA: the VEDERA trial. // *Ann. Rheum. Dis.* – 2020. – V.79. – P.464-471.
316. Mahmood Z., Schmalzing M., Dörner T., Tony H.P., Muhammad K. Therapeutic Cytokine Inhibition Modulates Activation and Homing Receptors of Peripheral Memory B Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients. // *Front. Immunol.* – 2020. – V.11. – P.572475.
317. Pandolfi F., Franza L., Carusi V., Altamura S., Andriollo G., Nucera E. Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V.21. - P.5238.
318. Hua J., Inomata T., Chen Y., Foulsham W., Stevenson W., et al. Pathological conversion of regulatory T cells is associated with loss of allotolerance. // *Sci. Rep.* – 2018. – V.8. – P.7059.
319. Lee S.Y., Yoon B.Y., Kim J.I., Heo Y.M., Woo Y.J., et al. Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. // *Immunology.* – 2014. – V.141. – P.353-61.
320. Shahrara S., Pickens S.R., Mandelin A.M. 2nd, Karpus W.J., Huang Q., et al. IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. // *J. Immunol.* – 2010. – V.184. – P.4479-87.
321. Zwerina K., Koenders M., Hueber A., Marijnissen R.J., Baum W., et al. Anti-IL-17A therapy inhibits bone loss in TNF- α -mediated murine arthritis by modulation of the T-cell balance. // *Eur. J. Immunol.* – 2012. – V.42.- P.413-23.
322. Shen F., Verma A.H., Volk A., Jones B., Coleman B.M., et al. Combined blockade of TNF- α and IL-17A alleviates progression of collagen-induced arthritis without causing serious infections in mice. // *J. Immunol.* – 2019. – V.202. – P.2017-26.
323. Pappas D.A., Blachley T., Zlotnick S., Best J., Emeanuru K., Kremer J.M. Methotrexate Discontinuation and Dose Decreases After Therapy with Tocilizumab: Results from the Corrona Rheumatoid Arthritis Registry. // *Rheumatol. Ther.* – 2020. – V.7. – P. 357-369.
324. Tada, Y., Ono, N., Suematsu, R., Tashiro S., Sadanaga Y., et al. The balance between Foxp3 and Ror- γ t expression in peripheral blood is altered by tocilizumab and abatacept in patients with rheumatoid arthritis. // *BMC Musculoskelet. Disord.* – 2016. – V.17. – P. 290.

325. Cavalli G., Dinarello C.A. Anakinra Therapy for Non-cancer Inflammatory Diseases. // *Front Pharmacol.* – 2018. – V.9. – P.1157.
326. Ha D., Tanaka A., Kibayashi T., Tanemura A., Sugiyama D., et al. Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2019. - V.116. – P.609-618.
327. Roers A., Siewe L., Strittmatter E., Deckert M., Schlüter D., et al. T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. // *J. Exp. Med.* – 2004. – V.200. – P.1289-97.
328. Katz J.D., Wang B., Haskins K., Benoist K., Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. // *Cell.* – 1993. – V.74. – P.1089-100.
329. Drakes M.L., Blanchard T.G., and Czinn S.J. Colon lamina propria dendritic cells induce a proinflammatory cytokine response in lamina propria T cells in the SCID mouse model of colitis. // *J. Leukoc. Biol.*– 2005. – V.78. – P.1291–1300.
330. Ohl L., Mohaupt M., Czeloth N., Hintzen G., Kiafard Z., et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. // *Immunity.* – 2004. – V.21. – P. 279–88.
331. Burich A., Hershberg R., Waggie K., Zeng W., Brabb T., et al. Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell- deficient mice. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – V.281. - G764–G778.
332. Henderson W.R., Jr., Lewis D.B., Albert R.K., Zhang Y., Lamm W.J., et al. The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. // *J. Exp. Med.* – 1996.- V.184. – P.1483–94.
333. Zhang Y., Lamm W.J., Albert R.K., Chi E.Y., Henderson W.R., Jr., Lewis, D.B. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – V.155. – P. 661–9.
334. Henderson W.R., Jr., Chi E.Y., Bollinger J.G., Tien Y.T., Ye X., et al. 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. -P.865–77.

335. Henderson W.R., Jr., Banerjee E.R., Chi E.Y. Differential effects of (S)- and (R)-enantiomers of albuterol in a mouse asthma model. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2005. – V.116. – P.332–340.
336. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. // *Tissue Engineering.* – 2001. – V.7, - P.211–228.
337. Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. // *Cell* – 2007. – V.130. – P.77–88.
338. Barthlott T., Moncrieffe H., Veldhoen M., Atkins C.J., Christensen J. CD25+ CD4+ T cells compete with naive CD4+ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production. // *Int. Immunol.* – 2005. - V.17. – P.279-88.
339. Maynard C.L., Harrington L.E., Janowski K.M., Oliver J.R., Zindl C.L., et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. // *Nat Immunol.* – 2007. - V.8. – P.931-41.
340. Makela M.J., Kanehiro A., Borish L., Dakhama A., Loader J., et. al. IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000.- V.97. - 6007–12.
341. el Marjou F., Janssen K.P., Chang B.H., Li M., Hindie V., et al. Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. // *Genesis.* – 2004. – V.39. – P.186-93.
342. Dor Y., Brown J., Martinez O.I., Melton D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. // *Nature.* – 2004. – V.429. – P.41-6.
343. Liao W., Schonnes D.E., Oh J., Cui Y., Cui K., et al. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. // *Nat. Immunol.* – 2008. - V.9. – P.1288-96.
344. Setoguchi R., Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. // *J. Exp. Med.* – 2005. – V.201. – V.723-35.

345. Burchill M.A., Yang J., Vogtenhuber C., Blazar B.R., Farrar M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. // *J. Immunol.* – 2007. – V.178. – P.280-90.
346. Bayer A.L., Yu A., Malek T.R. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. // *J. Immunol.* -2007. – V.178. – P.4062-71.
347. Oldenhove G., Bouladoux N., Wohlfert E.A., Hall J.A., Chou D., et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. // *Immunity.* – 2009. – V.31. – P.772-86.
348. Zhou X., Bailey-Bucktrout S., Jeker L.T., Bluestone J.A. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – V.21. – P.281-5.
349. Wu H.J., Ivanov I.I., Darce J., Hattori K., Shima T., et al. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. // *Immunity.* – 2010. - V.32. – P.815-27.
350. Tsuji M., Komatsu N., Kawamoto S., Suzuki K., Kanagawa O., et al. Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3+ T Cells in Gut Peyer's Patches. // *Science.* – 2009. - V.323. – P.1488-92.
351. Song X., Li B., Xiao Y., Chen C., Wang Q., et al. Structural and biological features of FOXP3 dimerization relevant to regulatory T cell function. // *Cell Rep.* – 2012. – V.1. – P.665-75.
352. Hu H., Wang B., Borde M., Nardone J., Maika S., et al. Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. // *Nat. Immunol.* – 2006 – V.7. – P.819–26.
353. Wang H., Geng J., Wen X., Bi E., Kossenkov A.V., et al. The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells. // *Nat Immunol.* – 2014. – V.15. – P.667-75.
354. Feng X., Ippolito G.C., Tian L., Wiehagen K., Oh S., et al. Foxp1 is an essential transcriptional regulator for the generation of quiescent naive T cells during thymocyte development. // *Blood.* – 2010. – V.115. – P.510-8
355. Feng X., Wang H., Takata H., Day T.J., Willen J., Hu H. Transcription factor Foxp1 exerts essential cell-intrinsic regulation of the quiescence of naive T cells. // *Nat Immunol.* – 2011. – V.12. – P.544-50.

356. Li B., Samanta A., Song X., Iacono K.T., Brennan P., et al. FOXP3 is a homooligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. // *Int. Immunol.* – 2007. – V.19. – P.825-35.14.
357. Rudra D., deRoos P., Chaudhry A., Niec R.E., Arvey A., et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. // *Nat. Immunol.* – 2012. - V.13. – P.1010-9.
358. Gerstein M.B., Kundaje A., Hariharan M., Landt S.G., Yan K.K., et al. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. // *Nature.* – 2012. - V.489. – P.91-100.
359. Heinz S., Benner C., Spann N., Bertolino E., Lin Y.C., et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. // *Mol Cell.* – 2010. – V.38. – P.576-89.
360. Koh K.P., Sundrud M.S., Rao A. Domain requirements and sequence specificity of DNA binding for the forkhead transcription factor FOXP3. // *PLoS One.* – 2009. – V.4. - e8109.
361. Chen Y., Chen C., Zhang Z., Liu C.C., Johnson M.E., et al. DNA binding by FOXP3 domain-swapped dimer suggests mechanisms of long-range chromosomal interactions. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. - V.43. – P.1268-82.
362. van der Veecken J., Gonzalez A.J., Cho H., Arvey A., Hemmers S., et al. Memory of Inflammation in Regulatory T Cells. // *Cell.* – 2016. - V.166. – P.977-990.
363. Zhang Y., Li S., Yuan L., Tian Y., Weidenfeld J., et al. Foxp1 coordinates cardiomyocyte proliferation through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms. // *Genes Dev.* – 2010. – V.24. – P.1746-57.
364. Hisaoka T., Nakamura Y., Senba E., Morikawa Y. The forkhead transcription factors, Foxp1 and Foxp2, identify different subpopulations of projection neurons in the mouse cerebral cortex. // *Neuroscience.* – 2010. - V.166. – P.551–563.
365. Cesario J.M., Almaidhan A.A., Jeong J. Expression of forkhead box transcription factor genes Foxp1 and Foxp2 during jaw development. // *Gene Expr. Patterns.* – 2016. - V.20. – P.111–19.
366. Banham A.H., Beasley N., Campo E., Fernandez P.L., Fidler C., et al. The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. // *Cancer Res.* – 2001. - V.61. – P.8820-9.

367. Gabut M., Samavarchi-Tehrani P., Wang X., Slobodeniuc V., O'Hanlon D., et al. An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. // *Cell*. – 2011. – V.147. – P.132-46.
368. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., et al. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. // *Nat. Immunol.* – 2016. – V.17. – P.1322-1333.
369. Levine A.G., Arvey A., Jin W., Rudensky, A. Y. Continuous requirement for the TCR in regulatory T cell function. // *Nat. Immunol.* – 2014. - V.15. – P.1070–78.370.
- Calvo Alén J., Pérez T., Romero Yuste S., Ferraz-Amaro I., Alegre Sancho J.J. et al. Efficacy and Safety of Combined Therapy with Synthetic Disease-modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis: Systematic Literature Review. // *Reumatol. Clin.* – 2020. – V.16. – P.324-332.
371. Bugatti S., Vitolo B., Caporali R., Montecucco C., Manzo A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V.2014. – P.681678.
372. Cope A.P. T cells in rheumatoid arthritis. // *Arthritis Res. Ther.* – 2008. - V.10, S1.
373. Rudensky A.Y. Regulatory T cells and Foxp3. // *Immunol. Rev.* – 2011. – V.241. – P.260-8.
374. Janssen K.M., Westra J., Chalan P., Boots A.M., de Smit M.J., et al. Regulatory CD4+ T-Cell Subsets and Anti-Citrullinated Protein Antibody Repertoire: Potential Biomarkers for Arthritis Development in Seropositive Arthralgia Patients? // *PLoS One*. – 2016. – V.11. - e0162101.
375. Choy E.H. Selective modulation of T-cell co-stimulation: a novel mode of action for the treatment of rheumatoid arthritis. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2009. – V.27. – P.510-8.
376. Steward-Tharp S.M., Song Y.J., Siegel R.M., O'Shea J.J. New insights into T cell biology and T cell-directed therapy for autoimmunity, inflammation, and immunosuppression. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – V.1183. – P.123-48.
377. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. // *Cell*. – 2008. - V.133. – P.775-87.
378. Zeng H., Chi H. The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation. // *Oncoimmunology*. – 2013. – V.2. - e26586.

379. Buckner J. Mechanisms of impaired regulation by CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human autoimmune diseases. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010. - V.10. - P.849–59.
380. Abbas A.K., Benoist C., Bluestone J.A., Campbell D.J., Ghosh S., et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. // *Nat. Immunol.* – 2013. – V.14. - P.307-8.
381. Miyara M., Yoshioka Y., Kitoh A., Shima T., Wing K., et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. // *Immunity.* – 2009. – V.30. – P.899-911.
382. Miyara M., Ito Y., Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2014. – V.10. – P.543-51.
383. Prakken B., Wehrens E., van Wijk F. Editorial: Quality or quantity? Unraveling the role of Treg cells in rheumatoid arthritis. // *Arthritis Rheum.* – 2013. – V.65. – P.552-4.
384. Klimiuk P.A., Yang H., Goronzy J.J., Weyand C.M. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. // *Clin. Immunol.* – 1999. – V.90. – P.65-78.
385. Cao D., Malmström V., Baecher-Allan C., Hafler D., Klareskog L., Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – V.33. – P.215-23.
386. Cao D., Vollenhoven R.v., Klareskog L. et al. CD25brightCD4+regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. // *Arthritis Res. Ther.* – 2004 – V.6.- R335.
387. van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma .JW., Lafeber F.P., Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. // *Arthritis Rheum.* – 2004. – V.50. – P.2775-85.
388. Möttönen M., Heikkinen J., Mustonen L., Isomäki P., Luukkainen R., Lassila O. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2005. – V.140. – P.360-7.

389. Liu M.F., Wang C.R., Fung L.L., Lin L.H., Tsai C.N. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. // *Scand. J. Immunol.* – 2005. – V.62. – P.312-7.
390. Cao D., Börjesson O., Larsson P., Rudin A., Gunnarsson I., et al. FOXP3 identifies regulatory CD25^{bright} CD4⁺ T cells in rheumatic joints. // *Scand. J. Immunol.* – 2006. – V.63. – P.444-52.
391. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. // *Cell Tissue Kinetics.* – 1970 – V.20. – P.393–403.
392. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. // *Cytotherapy.* – 2006. – V.8. – P.315-7.
393. Prockop D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. // *Science.* – 1997.- V.276. – P.71–74.
394. Salem H. K., Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. // *Stem Cells.* – 2010. – V.28. – P.585–96.
395. Javazon E. H., Beggs K. J., Flake A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. // *Exp. Hematol.* – 2004. – V.32. – P.414–25.
396. Deans R. J., Moseley A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. // *Exp Hematol.* – 2000. – V.28. – P.875–84.
397. Kalinina N.I., Sysoeva V.Y., Rubina K.A., Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. // *Acta Naturae.* – 2011. -V.3. - P.30–37.
398. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M., Ferrer K., McIntosh K., et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. // *Exp Hematol.* – 2002. - V.30. – P.42-8.
399. Rubtsov Y.P., Suzdaltseva Y.G., Goryunov K.V., Kalinina N.I., Sysoeva V. Y., Tkachuk V.A. Regulation of immunity via multipotent mesenchymal stromal cells. // *Acta Naturae.* -2012. – V.4. – P.23–31.
400. DelaRosa O., Lombardo E., Beraza A., Mancheño-Corvo P., Ramirez C., et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. // *Tissue Eng. Part A.* – 2009. – V.15. – P.2795-806.

401. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. // *Exp. Cell Res.* – 2006. – V.312. – P.2169–2179.
402. Taylor M.W., Feng G.S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. // *FASEB Journal.* – 1991. – V.5. – P.2516–22.
403. Hui X., Zhang G.X., Ciric B., Rostami A. IDO: a double-edged sword for TH1/TH2 regulation. // *Immunol. Letters.* – 2008. – V.121. – P.1–6.
404. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Ferrara G.B. T cell proliferation is blocked by indoleamine-2,3-dioxygenase. // *Transplant. Proceedings.* – 2001. – V.33. – P.428–30.
405. Ren G., Su J., Zhang L., Zhao X., Ling W., et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. // *Stem Cells.* – 2009. – V.27. – P.1954–62.
406. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. // *Nature Immunology.* – 2001. – V.2. – P.907–16.
407. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. // *Cell Stem Cell.* – 2008. – V.2. – P.141–50.
408. Sato K., Ozaki K., Oh I., Meguro A., Hatanaka K., et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. // *Blood.* – 2007. – V.109. – P.228–34.
409. Krampera M., Glennie S., Dyson J., Scott D., Laylor R., et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. // *Blood.* – 2003. – V.101. – P.3722–9.
410. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. // *Blood.* – 2002. – V.99. – P.3838–43.
411. Newman R.E., Yoo D., LeRoux M.A., Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. // *Inflammation & Allergy - Drug Targets.* – 2009. – V.8. – P.110–23.
412. Augello A., Tasso R., Negrini S.M., Amateis A., Indiveri F., et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. // *Eur. J. Immunol.* – 2005. – V.35. – P.1482–90.

413. Xue Q., Luan X.Y., Gu Y.Z., Wu H.Y., Zhang G.B., et al. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. // *Stem Cells Dev.* – 2010. – V.19. – P.27-38.
414. Ren G., Zhao X., Zhang L., Zhang J., L'Huillier A., et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. // *J. Immunol.* – 2010. – V.184. – P.2321-8.
415. Shi Y., Su J., Roberts A.I., Shou P., Rabson A.B., Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. // *Trends Immunol.* – 2012. – V.33. – P.136-43.
416. Aggarwal S., Pittenger M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. // *Blood.* – 2005. – V.105. – P.1815-22.
417. Wang Y., Chen X., Cao W., Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. // *Nat. Immunol.* – 2014. – V.15. – P.1009–16.
418. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. // *Immunol. Cell Biol.* – 2013. – V.91. – P.19–26.
419. Corkum C.P., Ings D.P., Burgess C., Karwowska S., Kroll W., Michalak T.I. Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT™) and standard density gradient. // *BMC Immunol.* – 2015. - V.16. – P.48.
420. Boyman O., Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* – 2012. – V.12. – P.180–190.
421. Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. // *Blood.* – 2004. – V.103. – P.4619-21.