

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ПОВЫШЕННАЯ СУПРЕССОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *EX VIVO* РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В СРАВНЕНИИ С НЕСТИМУЛИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ТОГО ЖЕ ДОНОРА

В.Г. Блинова¹, Ю.А. Гладилина¹, Д.Д. Елисеева², Т.А. Лобаева³, Д.Д. Жданов^{1,3*}

¹Научно-исследовательский биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

²Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80

³Российский университет дружбы народов (Университет РУДН),
кафедра биохимии имени академика Т.Т. Березова, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Регуляторные Т-клетки CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} (Трег) играют ключевую роль в поддержании толерантности к аутоантигенам, подавляют функцию эффекторных Т- и В-лимфоцитов и обеспечивают баланс между эффекторным и регуляторным звеном иммунитета. У больных с аутоиммунными заболеваниями снижено содержание Трег и нарушена функция этих клеток. Заместительная терапия аутологичными клетками пациента, выращенными *ex vivo*, может восстановить нарушенный баланс иммунной системы. Нами разработана методика культивирования клеток-предшественников Трег вне организма человека, которая позволяет из 50 мл периферической крови вырастить 300-400 млн Трег в течение одной недели. В настоящем исследовании показано, что по сравнению с Трег периферической крови, выращенные *ex vivo* клетки на 90-95% имеют фенотип CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low}. Трег и повышенную экспрессию ключевых генов транскрипции *FoxP3* и *Helios*. В трансформированных Трег повышена степень деметилирования в промоторном участке гена *FoxP3* и активированы гены-маркеры пролиферации циклина B1, Ki67 и LGALS 1. Трансформированные *ex vivo* Трег обладают повышенной супрессорной активностью, и до 80-90% клеток в популяции секретируют цитокины TNFα и IFNγ. Наши данные показывают, что выращенные *ex vivo* аутологичные Трег клетки имеют генетические, маркерные и функциональные характеристики регуляторных Т-клеток, которые в будущем могут быть использованы для адаптивной иммунотерапии больных с аутоиммунными заболеваниями, а также для подавления трансплантационного иммунитета, в частности, реакции трансплантата против хозяина.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки; трансформация *ex vivo*; супрессорная активность; клеточные маркеры; метилирование промотора; FoxP3

DOI: 10.18097/PBMC20226801055

ВВЕДЕНИЕ

Функция регуляторных Т-клеток (Трег) направлена на подавление активности клеток иммунной системы, включая эффекторные Т- и В-лимфоциты. Трег играют важную роль в поддержании иммунной толерантности и сохранении баланса между эффекторным и регуляторным звеном иммунитета. Среди нескольких субпопуляций Т-клеток с регуляторной активностью выявлены хелперные CD4⁺ Т-клетки со стабильными маркерными характеристиками CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low}, которые играют ключевую роль в поддержании иммунной толерантности в организме человека. Регуляторные Т-клетки постоянно экспрессируют CD25^{hi} — альфа-цепь высокоаффинного рецептора IL-2, который периодически, короткое время может экспрессироваться на развивающихся и активированных CD4⁺ Т-лимфоцитах. Негативный маркер — альфа-цепь рецептора IL-7 (CD127) — экспрессируется на эффекторных, но не регуляторных Т-клетках, низкая или негативная экспрессия CD127^{low} коррелирует с выраженной экспрессией FoxP3⁺CD25^{hi} и супрессивной функцией этих клеток [1]. Недавние исследования показали, что фактор транскрипции FoxP3 (Forkhead box Protein 3) выявляется

главным образом на Трег и играет ключевую роль в их развитии и функционировании. Дефект Трег вследствие мутации гена *FoxP3* вызывает развитие тяжёлого аутоиммунного синдрома IPEX, (иммунная дисрегуляция, полиэндокринопатия, энтеропатия связанные с X хромосомой), синдром наследственного воспаления у детей [2]. Сниженное количество и подавленную супрессорную активность Трег у больных с аутоиммунными заболеваниями также связывают с дефектом гена *FoxP3*.

Интенсивность экспрессии *FoxP3* в Трег зависит от метилирования специфических CpG-участков в промоторе его гена, так называемых TSDR (Treg specific demethylation region) [3]. Повышенное метилирование данного участка вызывает уменьшение экспрессии гена, в то время как повышенная экспрессия гена связана с деметилированием TSDR [4]. Другим транскрипционным фактором, играющим важную роль в функционировании Трег, является *Helios*. *Helios* связывается с промотором гена *FoxP3* и повышает его экспрессию [5].

Помимо вышеперечисленных уникальных для Трег молекул, эти клетки экспрессируют CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen, CD152) — мембранную

молекулу, которая экспрессируется Т-лимфоцитами на поздних стадиях активации и ингибирует их пролиферацию [6]. CD39 — эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза 1 (Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1; ENTPD1) — осуществляет гидролиз АТФ и АДФ до АМФ [7]. TNFRII является рецептором TNF α , который ответственен за активацию и пролиферацию лимфоцитов, а также за секрецию ингибиторных цитокинов [8].

Трег экспрессируют маркер клеток памяти CD45RO; однако недавно было показано, что есть субпопуляция Трег, на мембране которых выявляется CD45RA — маркер наивных Т-клеток, что указывает на их тимусное происхождение и позволяет отличить натуральные Трег от индуцированных на периферии [9]. Изучение рецепторов и лигандов, расположенных на мембране Трег, даёт возможность выявить пути миграции и функциональные свойства этих клеток. Нативные Трег CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} появляются в тимусе и на вторые-третьи сутки неонатального развития перемещаются в периферические лимфоидные органы (периферические Трег, пТрег). С другой стороны, обычные CD4⁺CD25⁺ Т-клетки при определённых условиях могут трансформироваться в клетки с регуляторной функцией (индуцированные Трег) [10].

Трег играют критическую роль в подавлении периферической аутореактивности и обеспечивают толерантность к аутоантигенам. У мышей, подвергнутых тимэктомии на 3-й день после рождения, Трег отсутствуют, в результате чего развивается полиаутоиммунный синдром, включающий гастрит, оофорит, тиреоидит и орхит. У пациентов с такими аутоиммунными заболеваниями, как рассеянный склероз, псориаз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа и др., количество Трег снижено и/или нарушена их супрессорная функция [11-16]. На ряде мышинных моделей показано, что адаптивная терапия Трег-клетками предотвращает возникновение и развитие аутоиммунных заболеваний [17-21]. Методы терапии аутоиммунных заболеваний аутологичными Трег-клетками активно развиваются в настоящее время [22-26]. Аутологичные Трег-клетки применяются для подавления реакции трансплантата против хозяина при пересадке костного мозга [27-30] и для предотвращения отторжения трансплантата при пересадке органов [31-33].

Целью данной работы было сравнительное изучение маркерных характеристик, экспрессии ключевых генов, секреции цитокинов, пролиферативной и супрессорной активности Трег, выделенных из периферической крови (пТрег), и тех же клеток, трансформированных *ex vivo* (тТрег). Так как трансформация CD4⁺CD25⁺ клеток-предшественников в регуляторные клетки CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} сопровождается интенсивной пролиферацией, мы поставили задачей определить, какие гены активируются в процессах дифференцировки Трег.

МЕТОДИКА

Забор крови и ex vivo трансформация Трег клеток

Кровь для получения аутологичной сыворотки забирали в пробирки с активатором свёртывания крови Vacuette Z Serum Clot Activator collection tubes (“Greiner Bio One”, Австрия), центрифугировали при 400 g в течение 20 мин, отбирали сыворотку и инактивировали её нагреванием в течение 40 мин при 56°C. Образцы крови для культивирования Трег забирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA (“Greiner Bio One”). Далее выделяли мононуклеарные клетки (PBMC — peripheral blood mononuclear cells) методом градиентного центрифугирования на Фиколе Lympholite-H (“Cedarlane”, Канада) и ресуспендировали клетки в растворе ACD-A (Anticoagulant Citrate Dextrose Solution — A, “Cytosol Laboratories Inc.”, США) с 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA PBS PH 7,2 MACS BSA Stock Solution, “Miltenyi Biotec”, Германия). Выделение фракции CD4⁺ клеток выполняли при помощи метода магнитной селекции с использованием CD4⁺ MicroBeads human Isolation Kit (“Miltenyi Biotec”) по протоколу производителя. Полученные CD4⁺ клетки высевали в 25 см² культуральные флаконы (“Corning”, США) в концентрации 5×10⁵ клеток на 1 мл среды. Использовали культуральную среду RPMI-1640 (“Life technologies”, США) с 10% аутологичной инактивированной сывороткой, стимуляторами роста 100 Ед/мл IL-2, TGF- β (оба от “R&D Systems”, США) 5 нг/мл, 5 мкг/мл анти-CD3 (“МедБиоСпектр”, Россия), 2 мкг/мл анти-CD28 (“eBiosciences”, США), а также антибиотиками 50 ед/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (оба от “Sigma”, США). Культивирование проводили в течение 7 дней в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90%. На третий день культивирования клетки рассеивали до концентрации 5×10⁵ клеток на 1 мл среды и повторно стимулировали полной средой. После культивирования производили подсчёт количества живых клеток при помощи окрашивания трипановым синим на клеточном анализаторе Vi-cell XR Viability Cell Analyzer (“Beckman Coulter”, США). Определение уровня деметилирования TSDR FoxP3, экспрессии FoxP3 и Helios, а также супрессорной активности производили в пТрег, выделенных из периферической крови при помощи CD4⁺CD25⁺ Isolation Kit (“Miltenyi Biotec”).

Иммунофенотипирование Трег-клеток периферической крови и тТрег

Периферическую кровь доноров отбирали в пробирки с антикоагулянтом K3EDTA (“Greiner Bio One”). Лизирование эритроцитов производили при помощи лизирующего буфера Red Blood Cell Lysis buffer (“Life Technologies”) по протоколу производителя. Клетки в количестве 5×10⁶ из осадка или после трансформации *ex vivo* ресуспендировали в 200 мкл DPBS (“Life Technologies”). Трег-клетки метили Treg detection staining cocktail (“Miltenyi Biotec”) по протоколу производителя. Количество Трег определяли методом проточной цитометрии

на цитометре MACS Quant (“Miltenyi Biotec”). Для анализа маркеров CD152, CD39 и TNFR1I PBMC или тТрег клетки метили антителами CD4-FITC, CD25-APC и каждым из антител CD152-PE, CD39-PE и TNFR1I-PE (все от “Miltenyi Biotec”) и проводили анализ методом проточной цитометрии. Количество клеток, экспрессирующих белки FoxP3 и Helios, определяли в PBMC или популяции тТрег. PBMC в количестве 1×10^6 ресуспендировали в 200 мкл DPBS и метили антителами CD4-FITC и CD25-APC (все от “Miltenyi Biotec”). Далее производили фиксацию и пермобилизацию клеток при помощи Transcription Factor Buffer Set (“BD Pharmingen”, США), мечение антителами FoxP3-PE и Helios-PE (“BD Pharmingen”) и последующий анализ на проточном цитометре. Экспрессию внутриклеточных белков FoxP3 и Helios определяли по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI — mean fluorescence intensity).

Экстракция РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Для определения экспрессии генов использовали описанную ранее процедуру [34, 35]. Тотальную РНК из пТрег или тТрег выделяли с помощью набора для выделения суммарной РНК (“Биолабмикс”, Россия) по протоколу компании-производителя. РНК в количестве 5 мкг подвергли реакции ОТ в 25 мкл реакционной смеси MMLV RT Kit (“Евроген”, Россия) по протоколу производителя. В качестве реакционной смеси для ПЦР в реальном времени использовали qPCR mix-HS SYBR (“Евроген”) с праймерами, представленными в таблице 1.

Для амплификации использовали DTprime5 (“ДНК-Технологии”, Россия) и двухтемпературный режим реакции (отжиг праймеров/элонгация). Оценку количества амплификатов определяли по флуоресценции в конце цикла элонгации. Оценку качества амплификации производили по анализу кривой плавления от 60°C до 95°C в конце реакции (после 35-го цикла). Стандартные кривые эффективности ОТ-ПЦР в реальном времени строили по серийным разведениям (1:40, 1:80, 1:160 и 1:320) суммарных кДНК эксперимента. Подсчёт уровней экспрессии проводили при помощи программного обеспечения DTprime5 (“ДНК-Технологии”). Данные представляли в виде нормализации уровней экспрессии мРНК изучаемых генов по 18S мРНК, которую использовали в качестве мРНК референсного гена с конститутивной экспрессией.

Определение уровня деметилирования FoxP3 TSDR

Для определения уровня деметилирования FoxP3 TSDR применяли метил-чувствительную ПЦР. Бисульфитную конверсию ДНК клеток осуществляли

с помощью EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (“Zymo Research”, США) после разрушения клеток протеиназой К (“Евроген”) по протоколу производителя. Бисульфитная конверсия превращает цитозин в урацил, в то время как метилированный цитозин остаётся неизменённым. После бисульфитной конверсии ген FoxP3 амплифицировали методом ПЦР в реальном времени DTprime5 в 25 мкл реакционной смеси qPCR mix-HS SYBR с использованием метил-специфических праймеров [36]. Амплификаты были секвенированы по Сэнгеру для определения степени деметилирования каждого из CpG участков TSDR.

Определение экспрессии и секреции цитокинов

Для определения количества внутриклеточных цитокинов PBMC или тТрег стимулировали Stimulation Cocktail + Protein Transport Inhibitor (“eBioscience”) в течение 4 ч в CO₂-инкубаторе. Контрольные клетки инкубировали только с Protein transport inhibitor (“eBioscience”). После стимулирования клетки метили антителами CD4-PerCp, CD25-PE, CD127-Vio770, IL10-APC (все от “Miltenyi Biotec”), фиксировали и пермеабилizировали с помощью IC Fixation Buffer и 10X Permeabilization buffer (“eBioscience”). После этого клетки метили антителами IL10-APC, IL17-APC, TNFα-Vio770 или INFγ-FITC (все от “Miltenyi Biotec”) и измеряли количество цитокинов методом проточной цитометрии. Определение концентрации цитокинов, секретируемых тТрег в кондиционную среду, определяли с помощью Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay (“Bio-Rad”, США) по протоколу производителя. Кондиционную среду на седьмой день трансформации Трег в количестве 50 мкл смешивали с 50 мкл микросфер в 96-луночной планшете и инкубировали 30 мин при непрерывном перемешивании. После отмывки микросферы инкубировали с 25 мкл антител к исследуемым цитокинам, отмывали и инкубировали с 50 мкл комплекса стрептавидин-фикоэритрин в течение 10 мин. Микросферы отмывали и ресуспендировали в 125 мкл реакционного буфера. Измерение концентрации цитокинов проводили при помощи системы Bio-Plex MAGPIX (“Bio-Rad”) по MFI микросфер. Значения MFI конвертировали в пг/мл по калибровочным кривым, построенным при измерении концентрации цитокинов из набора стандартов одновременно с измерением образцов.

Определение супрессорной активности Трег

Исследование супрессорной активности пТрег и тТрег проводили при их смешивании с эффекторными клетками по методике, описанной

Таблица 1. Праймеры, использованные для ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
FoxP3	TTTCACCTACGCCACGCTCA	CCAGTCCATCCACGGTCCA
Helios	TAAGGGCTCTCTGAAGGACA	GAATGAAAAGGCCTAGTGGA
Циклин B1	AGCTGCTGCCTGGTGAAGAG	GCCATGTTGATCTTCGCCTTA
LGALS1	AAGTGCCAGATGGATACGAA	CGTCAGCTGCCATGTAGTTGA
Ki67	AAGTTCACACGGACGTCAG	GATGCTCTTGCCATCTCC
18S	GGATCCATTGGAGGGCAAGT	ACGAGCTTTTAACTGCAGCAA

нами ранее [37]. В качестве эффекторных клеток использовали аутологичные CD4⁺CD25⁻ клетки. Данные клетки метили витальным красителем CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, “Life Technologies”) по протоколу производителя. Для активации CD4⁺CD25⁻ клеток проводили их стимуляцию 5 мкг/мл анти-CD3 антителами и аллогенными РВМС, обработанными митомицином С (Mitomycin C, “Kyowa Hakko Kogyo”, Япония). В 96-луночный планшет (“Corning”) вносили 5×10⁴ CD4⁺CD25⁺ Трег-клеток, 5×10⁴ CD4⁺CD25⁻ эффекторных клеток и 5×10⁴ аллогенных РВМС, обработанных митомицином С в 200 мкл культуральной среды RPMI-1640 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (“Life Technologies”). Клетки инкубировали в течение 5 дней в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 90%. Супрессорную активность Трег определяли методом проточной цитометрии по количеству делящихся клеток, детектированных по снижению интенсивности сигнала CFSE красителя. Индекс пролиферации (ИП) вычисляли по формуле: ИП = [CD4⁺CD25⁺ : CD4⁺CD25⁻ / CD4⁺CD25⁻].

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 9.0. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), сравнения между группами выполняли с помощью t-критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Результаты представляли в виде среднего \pm стандартное отклонение. В квадратных скобках указаны наименьшее и наибольшее значения результата эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Увеличение количества клеток с экспрессией специфических маркеров Трег в популяции трансформированных *ex vivo* регуляторных Т-клеток

Т-клетки CD4⁺, выделенные методом магнитной селекции, культивировали в присутствии 5-10% аутологичной сыворотки и стимулирующих их ростовых факторов в течение 7 дней. Жизнеспособность клеток, оцененная окрашиванием трипановым синим на клеточном анализаторе, в течение всего периода культивирования не опускалась ниже 95%. Общее количество Трег-клеток увеличилось примерно в 300-400 раз. Отличительной фенотипической характеристикой Трег является экспрессия маркеров CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low}. Методом проточной цитометрии нами исследованы фенотипические характеристики пТрег и тТрег тех же доноров (всего 20). Результаты этих исследований показали, что в ходе культивирования количество клеток с иммунофенотипом Трег значительно увеличивается (рис. 1, табл. 2). Основные фенотипические маркеры Трег включают CD25⁺, альфа цепь рецептора IL-2, фактор транскрипции FoxP3⁺, CD127^{low}, негативный маркер Трег — альфа цепь рецептора IL-7. Наряду с увеличением экспрессии основных

Таблица 2. Доля клеток, экспрессирующих маркеры Трег в популяциях пТрег и тТрег

Клеточные маркеры	пТрег, %	тТрег, %
CD4 ⁺	46,7 \pm 12,9	98,9 \pm 0,8
CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	10,7 \pm 5,0	96,2 \pm 2,7
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low}	8,1 \pm 3,5	91,2 \pm 2,5
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	8,7 \pm 2,6	93,9 \pm 3,1
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Helios ⁺	48,3 \pm 9,6	95,9 \pm 0,4
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} CD152 ⁺	12,2 \pm 12,2	83,9 \pm 9,0
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} CD39 ⁺	23,9 \pm 8,0	77,5 \pm 14,2
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} TNFR1 ⁺	25,8 \pm 13,2	85,2 \pm 11,0

фенотипических маркеров в популяции тТрег, выявлена также повышенная экспрессия транскрипционного фактора Helios, цитотоксической молекулы CTLA4 (CD152), CD39 и TNFR1.

В итоге, конечная популяция культивированных клеток содержит около 98-99% CD4⁺ Т-клеток, которые экспрессируют CD25⁺, около 93-95% экспрессируют FoxP3 и CD127^{low}, что указывает на однородность трансформированных клеток. В исходной популяции CD4⁺ Т-клеток, выделенных из периферической крови доноров, содержалось всего около 10% Трег, популяция трансформированных *ex vivo* клеток практически полностью состояла из Трег.

Трансформация Трег сопровождается активацией генов маркеров пролиферации

Трансформация CD4⁺ Т-клеток в Трег-клетки сопровождается стимуляцией TCR, что приводит к их пролиферации. Мы проследили, как изменяется экспрессия маркеров пролиферации циклина B1, Ki67 и LGALS 1 в пТрег и тТрег. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени нами установлено, что процесс трансформации Трег *ex vivo* вызывал достоверное увеличение экспрессии всех изучаемых маркеров пролиферации. Экспрессия гена циклина B1 увеличивалась более чем в 4 раза (рис. 2А), экспрессия гена фактора роста LGALS1 увеличивалась более чем в 5 раз (рис. 2Б). Наиболее существенно (более чем в 25 раз) увеличивалась экспрессия маркера Ki67 (рис. 2В).

Увеличение экспрессии FoxP3 и Helios в популяции тТрег

FoxP3 проявляется как транскрипционный фактор развития и функционирования Трег, а его экспрессия поддерживает их специфическую активность. Другим транскрипционным фактором, играющим важную роль в функционировании Трег, является Helios, который связывается с промотором гена FoxP3 и увеличивает его экспрессию. Экспрессия FoxP3 и Helios исследована двумя методами: ОТ-ПЦР в реальном времени и MFI при проточной цитометрии, который может подтвердить результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Установлено, что в тТрег экспрессия гена FoxP3 приблизительно в 2 раза выше (1,06 \pm 0,19 [0,64; 1,31]), чем в пТрег (0,40 \pm 0,17 [0,20; 0,62]) (рис. 3А). Экспрессия гена Helios также примерно в 2 раза выше в тТрег

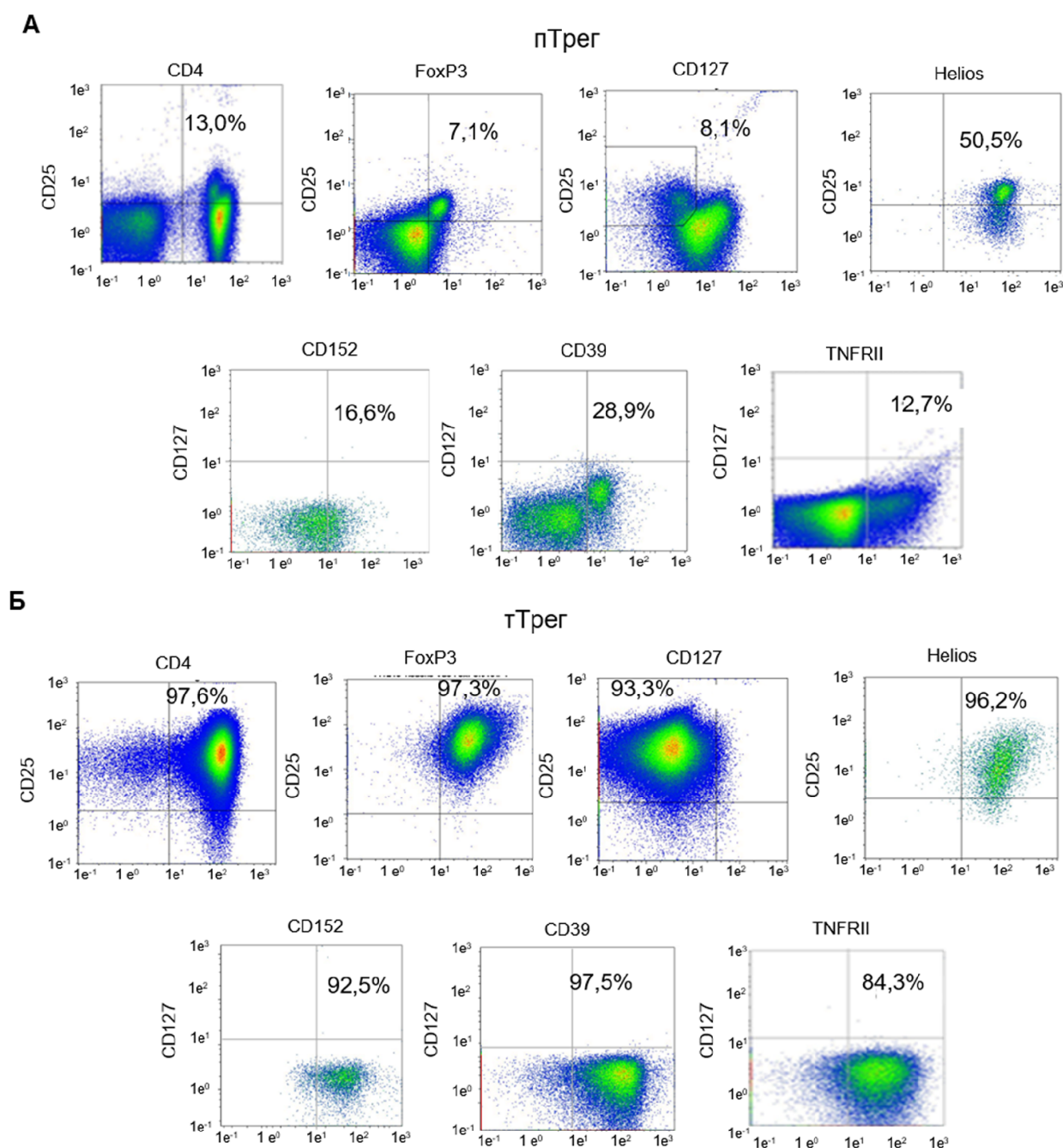


Рисунок 1. Повышенная экспрессия специфических маркеров в трансформированных Трег. Результаты проточной цитометрии (А) пТрег и (Б) тТрег. Мононуклеарные клетки были выделены из образца крови донора. Фракцию CD4⁺ клеток, полученную методом иммуно-магнитной селекции, разделили на две части: одну часть клеток сразу фенотипировали, вторую часть культивировали в течение 7 дней с целью получения тТрег и затем проводили фенотипический анализ. Клетки данных групп метили антителами к исследуемым маркерам и анализировали методом проточной цитометрии. Показан один репрезентативный эксперимент, всего исследовано 20 доноров.

($0,96 \pm 0,35$ [0,56; 1,66]) по сравнению с пТрег ($0,32 \pm 0,19$ [0,41; 0,90]). Количество внутриклеточных белков FoxP3 и Helios оценивали по показателю MFI в ходе проточной цитометрии. Было установлено, что MFI FoxP3 в популяции тТрег достоверно увеличен ($34,59 \pm 7,66$ [26,17; 37,00]) по сравнению с пТрег ($8,72 \pm 1,98$ [7,32; 10,12]) (рис. 3Б). MFI Helios в популяции тТрег был также достоверно выше ($17,94 \pm 0,47$ [17,60; 18,27]) по сравнению с пТрег ($10,14 \pm 2,45$ [8,40; 11,87]).

Увеличение уровня деметилирования TSDR в тТрег

Экспрессия FoxP3 напрямую зависит от уровня деметилирования TSDR. Методом метил-чувствительной ПЦР и секвенированием TSDR пТрег и тТрег доноров установлено, что трансформация *ex vivo* вызывает увеличение деметилирования данного участка (рис. 4А). В популяции пТрег данный показатель составил $41,7 \pm 8,3\%$ [28,5; 49,5], в то время как в популяции

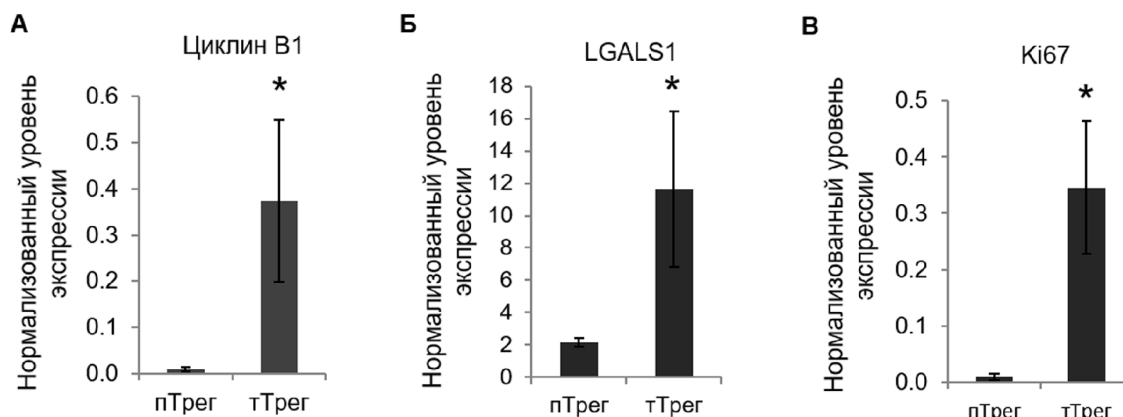


Рисунок 2. Экспрессия маркеров клеточной пролиферации в тТрег значительно выше по сравнению с пТрег. Уровни экспрессии маркеров пролиферации, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени: (А) Циклин В1, (Б) LGALS1, (В) Ki67. Уровни экспрессии генов были нормализованы по отношению к референсному гену 18S. * — $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента.

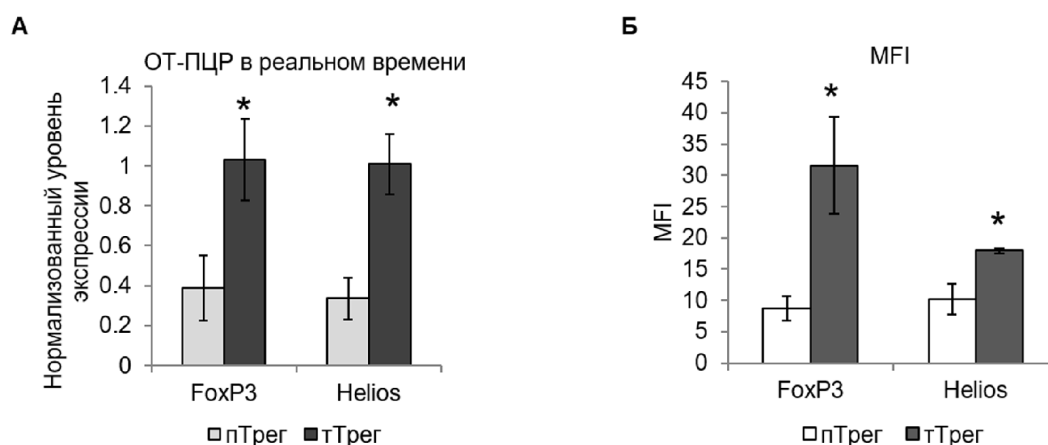


Рисунок 3. Экспрессия *FoxP3*, *Helios* и маркеров клеточной пролиферации в тТрег значительно выше по сравнению с пТрег. (А) Уровни экспрессии *FoxP3* и *Helios* измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. (Б) Значения MFI *FoxP3* и *Helios* измеренные методом проточной цитометрии; клетки гейтированы по CD4⁺ и CD25⁺. Уровни экспрессии маркеров пролиферации, измеренные методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровни экспрессии генов были нормализованы по отношению к референсному гену 18S. * — $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента.

тТрег он увеличился до $59,5 \pm 5,4\%$ [50,7; 65,6]; $p < 0,05$. Анализ степени деметилирования каждого CpG-участка внутри TSDR показал отсутствие очевидной зависимости между уровнями деметилирования какого-либо конкретного CpG-участка при *ex vivo* трансформации. Различия обнаружены только в общей доле деметилирования участка (рис. 4Б).

Увеличение секреции цитокинов в популяции тТрег

С целью изучения механизмов повышенной функциональной активности тТрег на таргетные клетки мы изучили внутриклеточную экспрессию и секрецию цитокинов в кондиционную среду. Мы сравнили уровень внутриклеточной экспрессии цитокинов в популяции пТрег и тех же клеток, трансформированных *ex vivo*. Была изучена внутриклеточная экспрессия IL-10, IL-17, TNF α и INF γ . Результаты, полученные методом проточной цитометрии, показали, что пропорция пТрег, секретирующих IL-10, за исключением

одного случая, не превышала 0,2% и составила $0,75 \pm 1,74\%$ [0,02%; 6,5%] (рис. 5А,В). В популяции тТрег тех же доноров пропорция IL-10-секретирующих клеток увеличилась не достоверно и составила $3,2 \pm 3,8\%$ [0,1%; 12,1%] (рис. 5Б,В). Внутриклеточная экспрессия IL-17 в пТрег составила $4,8 \pm 4,4\%$ [0,3%; 11,3%] (рис. 5А,Г). При трансформации *ex vivo* количество клеток, синтезирующих IL-17, увеличивалось почти втрое и составило $15,5 \pm 5,3\%$ [5,7%; 23,0%]; $p < 0,05$ (рис. 5Б,Г). Обнаружено достоверное увеличение экспрессии TNF α и INF γ после трансформации Трег. Количество клеток пТрег, синтезирующих TNF α , составило $36,7 \pm 11,3\%$ [23,0%; 61,1%] (рис. 5А,Д) и увеличилось более чем в два раза до уровня $81,6 \pm 6,2\%$ [68,0%; 89,1%]; $p < 0,05$ в популяции тТрег (рис. 5Б,Д). Количество клеток пТрег, экспрессирующих INF γ , составило $36,6 \pm 12,4\%$ [21,8%; 44,0%] (рис. 5А,Е) и увеличилось до уровня $69,4 \pm 17,3\%$ [42,5%; 90,6%]; $p < 0,05$ в тТрег (рис. 5Б,Е).

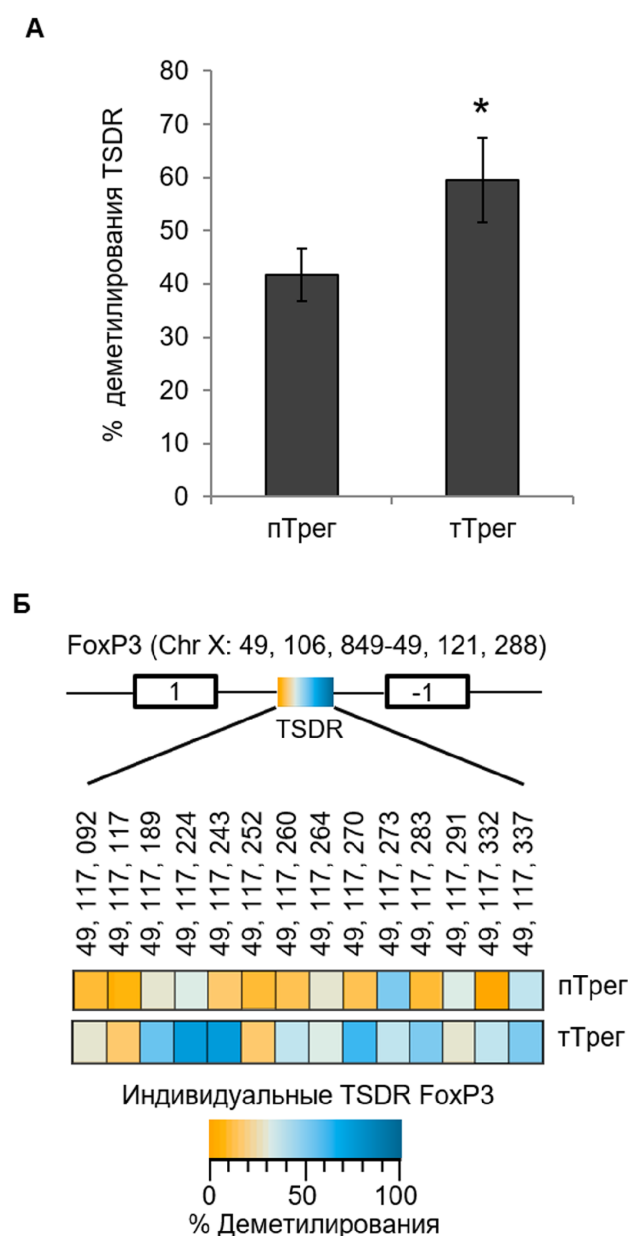


Рисунок 4. Повышенный уровень деметилирования TSDR в тТрег по сравнению с пТрег. (А) Средний уровень деметилирования TSDR в пТрег и тТрег. Трег периферической крови (пТрег) были выделены методом иммуно-магнитной сепарации. Фракцию CD4⁺ клеток культивировали с добавлением стимулирующих антител и цитокинов в соответствии с протоколом для получения трансформированных Трег (тТрег). Степень деметилирования TSDR в пТрег и тТрег была исследована методом бисульфитной конверсии ДНК, амплификации данного участка методом ПЦР и последующего секвенирования. * — $p \leq 0,05$ по критерию Стьюдента. (Б) Пропорция деметилирования каждого CpG-участка внутри TSDR. Результаты секвенирования амплификатов участков TSDR были зашифрованы в цветовом коде в соответствии с легендой. Показан пример уровней деметилирования CpG-участка внутри TSDR пТрег и тТрег одного донора. Каждая ячейка соответствует отдельному CpG-участку. Абсолютные координаты указаны в соответствии с GRCh37/hg19 human genome assembly. Всего исследовано 10 доноров.

Исследование концентрации цитокинов в кондиционной среде с помощью метода Bio-Plex показало, что IL-10, несмотря на низкую экспрессию в тТрег, присутствует в кондиционной среде в концентрациях 304 ± 190 пг/мл [42 пг/мл; 741 пг/мл] (рис. 5Ж). Концентрация IL-17 имела высокие значения 993 ± 641 пг/мл [163 пг/мл; 2330 пг/мл], что согласуется с достаточно высокой внутриклеточной экспрессией. Несмотря на очень высокую внутриклеточную экспрессию в кондиционной среде обнаружены очень низкие концентрации TNF α — 28 ± 19 пг/мл [3 пг/мл; 98 пг/мл]. В кондиционной среде тТрег обнаружены высокие концентрации INF γ — 5684 ± 2714 пг/мл [378 пг/мл; 11781 пг/мл], что согласуется с высокой внутриклеточной экспрессией данного цитокина.

Более высокая супрессорная активность трансформированных ex vivo Трег по сравнению с периферическими Трег

Функциональной особенностью Трег является их способность подавлять пролиферативную активность таргетных клеток. Мы сравнили супрессорную активность пТрег и тТрег при их культивировании с таргетными CD4⁺CD25⁻ клетками. Подсчёт пролиферативной активности таргетных клеток методом проточной цитометрии показал, что пТрег ингибируют пролиферацию почти на 100% в пропорциях от 1:1 до 4:1 (рис. 6А,Б). Индекс пролиферации в пропорции 16:1 был $55,2 \pm 4,0$. Более высокие разведения пТрег не показали супрессорной активности. Супрессорная активность тТрег оставалась высокой даже при разведениях 32:1 (рис. 6В,Г). Индекс пролиферации при разведении пТрег 64:1 составил $88,9 \pm 2,7$. Более высокие разведения тТрег не показали достоверной супрессорной активности. Полученные результаты указывают на то, что Трег клетки после трансформации ex vivo обладают в два раза большей супрессорной активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время предпринимаются попытки различными способами культивировать Трег-клетки *in vitro*. В большинстве случаев в качестве исходных клеток используются CD4⁺CD25⁺ Т-клетки из пуповинной крови плода, мононуклеарные клетки периферической крови человека или селезёнки мышей. Несмотря на многочисленные исследования, проблема культивации Трег остается весьма актуальной. Клетки с маркерами CD4⁺CD25^{hi} наиболее подходят для этой цели, поскольку обладают стабильным фенотипом и супрессорным потенциалом [38]. Клетки CD4⁺CD25⁺ культивируют *in vitro* в присутствии различных стимуляторных молекул и цитокинов [39]. Наиболее применяемым методом является стимуляция данных клеток посредством больших количеств IL-2, и антител anti-CD3 и anti-CD28, что позволяет увеличить количество Трег до 40000 раз за 3-4 недели [40]. Однако в результате такой стимуляции сохраняется

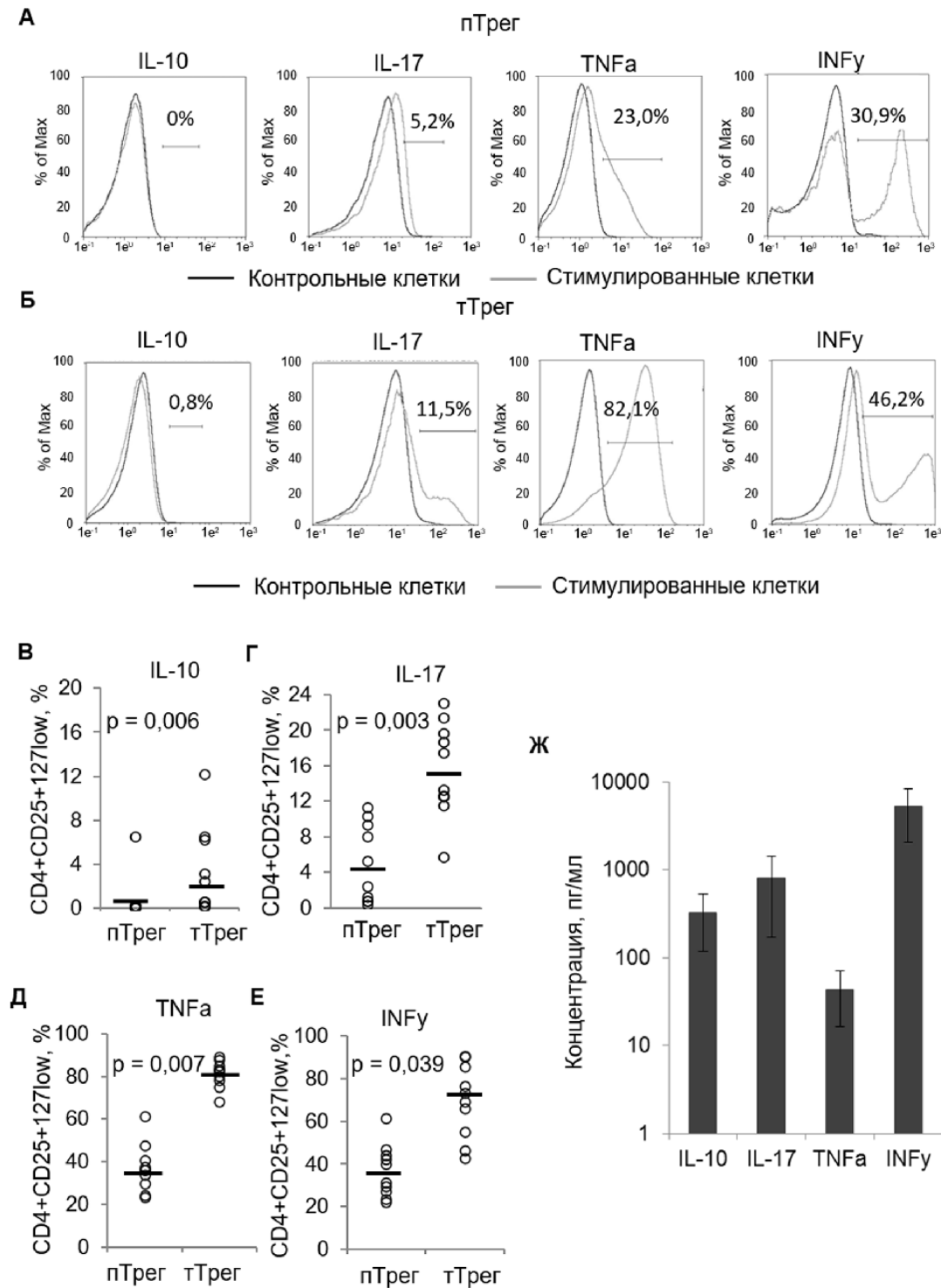


Рисунок 5. Повышенная секреция цитокинов в трансформированных Трег по сравнению с периферическими нестимулированными Трег. (**А, Б**) Результат измерения уровней синтеза внутриклеточных цитокинов методом проточной цитометрии. Из крови доноров были выделены РВМС и фракция клеток $CD4^+$. Фракцию клеток $CD4^+$ культивировали с добавлением стимулирующих антител и цитокинов для получения тТрег. РВМС и тТрег инкубировали со стимулятором и ингибитором транспорта белков или только с ингибитором транспорта белков в качестве контроля. Клетки были помечены антителами к $CD4$, $CD25$ и $CD127$, зафиксированы, пермеабильизованы и помечены антителами к исследуемым цитокинам. Количество цитокинов исследовали методом проточной цитометрии после предварительного гейтирования клеток $CD4^+$, $CD25^+$, $CD127^{low}$. Показан пример клеток, синтезирующих отдельный цитокин по сравнению с не стимулированными клетками в пТрег и тТрег. Всего исследовано 10 доноров. (**В-Е**) Уровни синтеза внутриклеточных цитокинов у каждого из десяти доноров. Горизонтальная черта обозначает медиану. Статистический анализ проведён по критерию Манна-Уитни, достоверным считали $p \leq 0,05$. (**Ж**) Концентрация цитокинов в кондиционной среде тТрег, измеренная методом Bio-Plex. Результаты измерений отображены в логарифмической шкале.

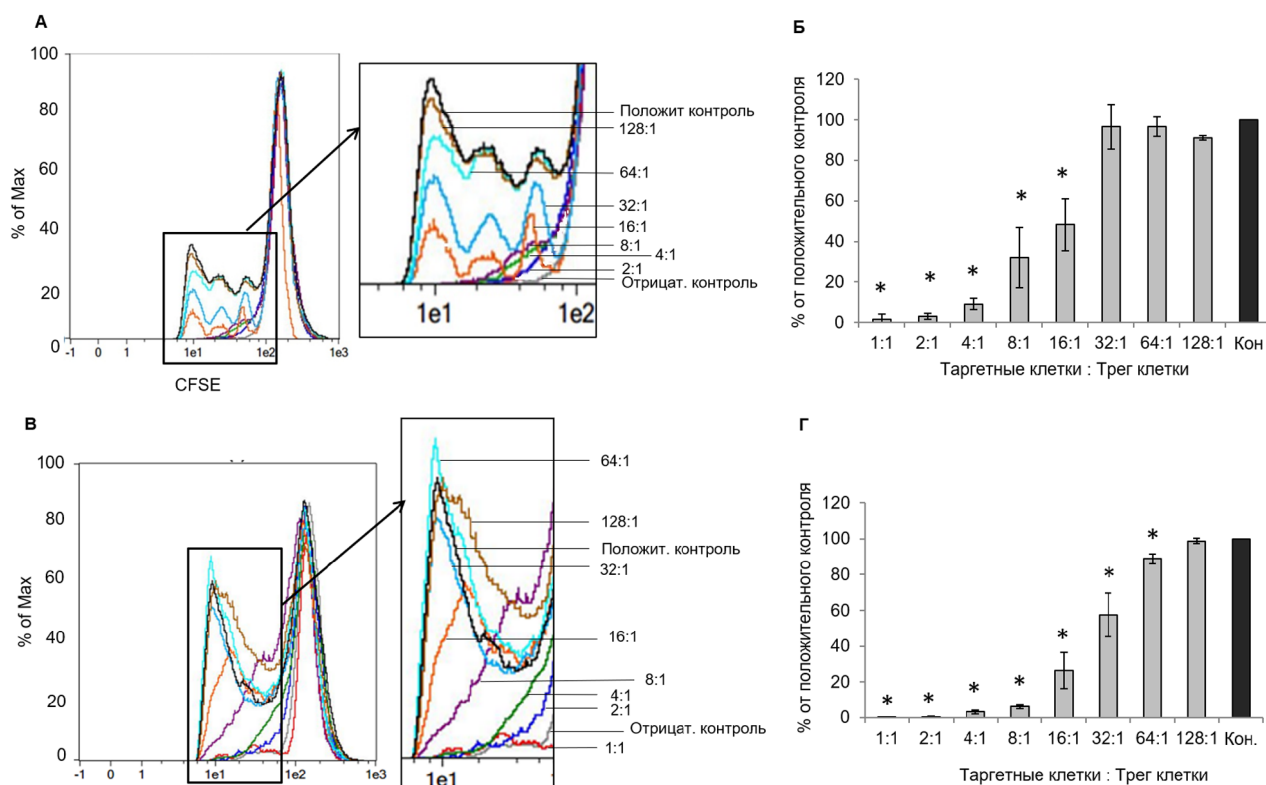


Рисунок 6. Повышенная супрессорная активность тТрег. Диаграммы пролиферации таргетных клеток ко-культивированных в различных пропорциях с (А) пТрег и (В) тТрег. Отрицат. контроль — отрицательный контроль, CD4⁺CD25⁻ клетки. Положит. контроль — положительный контроль, CD4⁺CD25⁻ клетки ко-культивированные со стимуляторными клетками. Индексы пролиферации (ИП) таргетных клеток, ко-культивированных с (Б) пТрег и (Г) тТрег. Кон — контроль, Т-клетки CD4⁺CD25⁻ ко-культивированные со стимуляторными клетками.

значительная примесь других, нерегуляторных клеток. Для получения CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} Трег-клеток мы использовали CD4⁺ стартовые клетки-предшественники, выделенные из периферической крови здоровых доноров методом иммуно-магнитной селекции [41]. Популяция периферических CD4⁺ Т-клеток содержала около 90% конвенциональных CD4⁺CD25⁻ и менее 10% регуляторных CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} Т-клеток. В ходе трансформации CD4⁺CD25⁻ Т-клеток *ex vivo* количество Трег CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} увеличивалось и достигало более 90%. Общее количество клеток возрастало примерно в 30-40 раз, тогда как количество CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} Трег увеличивалось примерно в 300-400 раз. Эти данные свидетельствуют о том, что в процессе культивирования наряду с делением Трег, очевидно, происходит трансформация конвенциональных Т-клеток CD4⁺CD25⁻ в Трег-клетки CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low}.

Так как конечная популяция культивированных клеток содержит до 99% CD4⁺, которые экспрессируют CD25⁺, около 95% клеток экспрессируют FoxP3 и CD127^{low}, это указывает на однородность трансформированной популяции клеток. В то время как в исходной популяции CD4⁺ Т-клеток, выделенных из периферической крови доноров, содержалось всего около 10% Трег, популяция трансформированных *ex vivo* клеток практически полностью состояла из Трег.

Пролиферация CD4⁺ клеток-предшественников необходима для их трансформации в регуляторные Т-клетки [42]. Пролиферация CD4⁺ клеток сопровождалась повышением экспрессии циклина B1, Ki67 и LGALS1 (Lectin, galactoside-binding, soluble, 1), которые служат активаторами митоза и являются маркерами пролиферации. Циклин B1 является регуляторным транскрипционным фактором, который ускоряет созревание клеток путём образования факторов созревания (maturation-promoting factors). Циклин B1 экспрессируется преимущественно в G2/M фазах клеточного цикла [43]. Белок LGALS1 принадлежит к семейству белков, связывающихся с бета-галактозидазой. Он участвует в межклеточных взаимодействиях, взаимодействиях клеток с матриксом и является аутокринным регулятором клеточной пролиферации [44]. Ki67 является ядерным белком, который участвует во множестве сигнальных каскадов при пролиферации клеток [45]. Мы обнаружили значительное увеличение экспрессии данных маркеров при *ex vivo* трансформации регуляторных Т-клеток. Это указывает на значимость пролиферации клеток-предшественников для их трансформации в регуляторные Т-клетки.

Экспрессия гена *FoxP3* является главным фактором, поддерживающим специфическую активность Трег [4, 46]. Нами исследованы MFI в Трег периферической крови (пТрег) здоровых доноров, и те же клетки, трансформированные *ex vivo* (тТрег).

Показано, что MFI FoxP3 и MFI Helios в пТрег достоверно ниже, чем MFI FoxP3 и Helios в тТрег. Данные MFI FoxP3 и Helios Трег согласуются с данными по экспрессии кодирующих их генов. Как известно, Helios связывается с промотором гена *FoxP3* и увеличивает его экспрессию [5]. Таким образом, результаты наших исследований показывают выраженную экспрессию ключевых генов *FoxP3* и *Helios* в популяции трансформированных Трег, что, очевидно, обеспечивает повышенную функциональную активность этих клеток.

Интенсивность экспрессии *FoxP3* в большей степени зависит от метилирования специфических CpG-участков в промоторе его гена, так называемом TSDR [3]. Повышенное метилирование данного участка вызывает уменьшение экспрессии гена, в то время как повышенная экспрессия гена связана с деметилированием TSDR [4]. Трансформированные Трег показали усиленное деметилирование в участке TSDR. Уровень деметилирования был высокий и стабильный. Эти данные соответствуют повышенной экспрессии *FoxP3* в тТрег, что, очевидно, также определяет их высокую пролиферативную и функциональную активность.

Принято считать, что регуляторные Т-клетки секретируют противовоспалительный цитокин IL-10, за счёт которого осуществляется их супрессорный эффект [47]. Неожиданно для нас, ни в периферических, ни в трансформированных Трег мы не обнаружили сколько-нибудь заметной секреции IL-10. Внутриклеточная экспрессия этого цитокина была крайне мала.

Мы исследовали также экспрессию IL-17, который играет критическую роль в антимикробной защите, контролирует аутоиммунные реакции и воспаление. Периферические CD4⁺ Т-клетки человека содержат субпопуляцию CD4⁺FoxP3⁺ Трег-клеток, которые экспрессируют CCR6 и продуцируют при активации IL-17. Эти клетки коэкспрессируют FoxP3 и RORγt факторы транскрипции, критичные для Трег или критичные для дифференцировки и функциональной активности Th17 Трег. Показано, что CD4⁺FoxP3⁺CCR6⁺IL-17⁺-продуцирующие клетки могут строго подавлять пролиферацию CD4⁺ респондерных Т-клеток.

В наших экспериментах внутриклеточная экспрессия IL-17 в пТрег была невысокой (3-7%), но повышалась до 10-20% в тТрег. При этом, обращает на себя внимание высокая экспрессия IFNα и TNFγ в периферических и, особенно, в трансформированных Трег. Провоспалительный цитокин IFNγ, как считалось ранее [48], играет важную роль в активации аутоагрессивных Т-клеток и последующем воспалении центральной нервной системы. Однако впоследствии оказалось, что блокирование IFNγ усиливает клинические проявления заболевания и увеличивает патологические изменения в центральной нервной системе [48]. У мышей с нокаутированным геном IFNγ наблюдалась редуцированная частота и подавленная функция Трег-клеток, а также и более тяжёлое течение

экспериментального аутоиммунного энцефалита. *In vitro* обработка CD4⁺CD25⁺ Т-клеток IFNγ приводит к конверсии этих клеток в Трег, повышенной экспрессии FoxP3 и увеличенной супрессивной функции. Dominguez-Villar и соавт. [49] описали повышенное количество Th1-подобных FoxP3-положительных клеток, экспрессирующих IFNγ, в группе нелеченых больных с ремитирующим рассеянным склерозом по сравнению с группой здоровых доноров.

В настоящее время TNFα причислен к плейотропным цитокинам [50]. Биологические функции TNFα опосредованы двумя структурно близкими но функционально различными рецепторами: TNFR1, у которого в цитоплазматическом хвосте имеется домен смерти, отвечающий за сигналинг большинства провоспалительных, цитотоксических и апоптотических эффектов, классически причисляемых к функциям TNFα [51]. В противоположность этому, у TNFR2 отсутствует внутриклеточный домен смерти, этот рецептор опосредует сигналы обеспечивающие активацию и пролиферацию лимфоцитов [52].

Нами показано, что IFNγ экспрессируют от 70% до 90% тТрег, а TNFα выявляется в 85-95% тТрег. Можно предположить, что супрессорная активность Трег опосредуется именно этими цитокинами.

Функциональной особенностью Т-регуляторных клеток является их способность подавлять пролиферацию активированных таргетных эффекторных клеток, в том числе и Т-клеток, ответственных за возникновение и развитие аутоиммунных реакций. Одним из механизмов, по которому Трег способны ингибировать пролиферацию эффекторных лимфоцитов, является ингибирование активности теломеразы — фермента, ответственного за синтез теломер на концах хромосом эукариот [53, 54]. Результаты наших исследований указывают на значительно усиленную супрессорную активность трансформированных Трег.

Наши данные убедительно показывают преимущества трансформированных *ex vivo* Трег, которые могут быть использованы как инструмент для иммунотерапии при аутоиммунных заболеваниях и подавлении отторжения трансплантата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии № 12-3 от 28.12.2020 г. Письменное согласие на участие в исследовании получено от всех доноров.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hartigan-O'Connor D.J., Poon C., Sinclair E., McCune J.M. (2007) Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J. Immunol. Methods*, **319**, 41-52.
- Gambineri E., Torgerson T.R., Ochs H.D. (2003) 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.*, **15**, 430-435.
- Rossetti M., Spreafico R., Saidin S., Chua C., Moshref M., Leong J.Y., Tan Y.K., Thumboo J., van Loosdregt J., Albani S. (2015) Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region. *J. Immunol.*, **194**, 113-124.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, **4**, 330-336.
- Thornton A.M., Korty P.E., Tran D.Q., Wohlfert E.A., Murray P.E., Belkaid Y., Shevach E.M. (2010) Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.*, **184**, 3433-3441.
- Callahan M.K., Postow M.A., Wolchok J.D. (2014) CTLA-4 and PD-1 pathway blockade: combinations in the clinic. *Front. Oncol.*, **4**, 385. DOI: 10.3389/fonc.2014.00385
- Bono M.R., Fernández D., Flores-Santibáñez F., Roseblatt M., Sauma D. (2015) CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.*, **589**(22), 3454-3460.
- Chen X., Oppenheim J.J. (2010) Oppenheim, TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr. Dir. Autoimmun.*, **11**, 119-134.
- Booth N.J., McQuaid A.J., Sobande T., Kissane S., Agius E., Jackson S.E., Salmon M., Falciani F., Yong K., Rustin M.H., Akbar A.N., Vukmanovic-Stejic M. (2010) Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J. Immunol.*, **184**, 4317-4326.
- Yadav M., Stephan S., Bluestone J.A. (2013) Peripherally induced tregs — role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front. Immunol.*, **4**, 232. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00232
- Kukreja A., Cost G., Marker J., Zhang C., Sun Z., Lin-Su K., Ten S., Sanz M., Exley M., Wilson B., Porcelli S., Maclaren N. (2002) Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.*, **109**, 131-140.
- de Kleer I.M., Wedderburn L.R., Taams L.S., Patel A., Varsani H., Klein M., de Jager W., Pugayung G., Giannoni F., Rijkers G., Albani S., Kuis W., Prakken B. (2004) CD4+CD25 bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J. Immunol.*, **172**, 6435-6443.
- Crispin J.C., Alcocer-Varela J., de Pablo P., Martinez A., Richaud-Patin Y., Alarcón-Segovia D. (2003) Immunoregulatory defects in patients with systemic lupus erythematosus in clinical remission. *Lupus*, **12**, 386-393.
- Valencia X., Yarboro C., Illei G., Lipsky P.E. (2007) Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, **178**, 2579-2588.
- Lyssuk E.Y., Torgashina A.V., Soloviev S.K., Nassonov E.L., Bykovskaia S.N. (2007) Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **601**, 113-119.
- Venken K., Hellings N., Thewissen M., Somers V., Hensen K., Rummens J.-L., Medaer R., Hupperts R., Stinissen P. (2008) Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*, **123**, 79-89.
- Bach J.F., Chatenoud L. (2001) Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu. Rev. Immunol.*, **19**, 131-161.
- Kohm A.P., Carpentier P.A., Anger H.A., Miller S.D. (2002) Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, **169**, 4712-4716.
- Wu A.J., Hua H., Munson S.H., McDevitt H.O. (2002) Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12287-12292.
- Hoffmann P., Ermann J., Edinger M., Fathman C.G., Strober S. (2002) Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.*, **196**, 389-399.
- Mekala D.J., Geiger T.L. (2005) Immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis with redirected CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*, **105**, 2090-2092.
- Miyara M., Ito Y., Sakaguchi S. (2014) TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **10**, 543-551.
- Serr I., Weigmann B., Franke R.K., Daniel C. (2014) Treg vaccination in autoimmune type 1 diabetes. *BioDrugs*, **28**, 7-16.
- Buc M. (2013) Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.*, **2013**, 963748. DOI: 10.1155/2013/963748
- Fessler J., Felber A., Duftner C., Dejaco C. (2013) Therapeutic potential of regulatory T cells in autoimmune disorders. *BioDrugs*, **27**, 281-291.
- Miyara M., Gorochov G., Ehrenstein M., Musset L., Sakaguchi S., Z. (2011) Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, **10**, 744-755.
- Xia G., Kovochich M., Truitt R.L., Johnson B.D. (2004) Tracking ex vivo-expanded CD4+CD25+ and CD8+CD25+ regulatory T cells after infusion to prevent donor lymphocyte infusion-induced lethal acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, **10**, 748-760.
- Trzonkowski P., Dukat-Mazurek A., Bieniaszewska M., Marek-Trzonkowska N., Dobyszek A., Juścińska J., Dutka M., Myśliwska J., Hellmann A. (2013) Treatment of graft-versus-host disease with naturally occurring T regulatory cells. *BioDrugs*, **27**, 605-614.
- di Ianni M., Falzetti F., Carotti A., Terenzi A., Castellino F., Bonifacio E., del Papa B., Zei T., Ostini R.I., Cecchini D., Aloisi T., Perruccio K., Ruggeri L., Balucani C., Pierini A., Sportoletti P., Aristei C., Falini B., Reisner Y., Velardi A., Aversa F., Martelli M.F. (2011) Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, **117**, 3921-3928.
- Edinger M., Hoffmann P. (2011) Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr. Opin. Immunol.*, **23**, 679-684.

31. Safinia N., Scotta C., Vaikunthanathan T., Lechler R.I., Lombardi G. (2015) Regulatory T cells: serious contenders in the promise for immunological tolerance in transplantation. *Front. Immunol.*, **6**, 438. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00438
32. Askar M. (2014) T helper subsets & regulatory T cells: rethinking the paradigm in the clinical context of solid organ transplantation. *Int. J. Immunogenet.*, **41**, 185-194.
33. Hilbrands R., Howie D., Cobbold S., Waldmann H. (2013) Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Immunotherapy*, **5**, 717-731.
34. Жданов Д.Д., Васина Д.А., Орлова В.С., Готовцева В.Ю., Бибикина М.В., Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2016) Эндонуклеаза EndoG индуцирует альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT и гибель опухолевых клеток. *Биомедицинская химия*, **62**(3), 239-250. [Zhdanov D.D., Vasina D.A., Orlova V.S., Gotovtseva V.Y., Bibikova M.V., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2016) Apoptotic endonuclease EndoG induces alternative splicing of telomerase catalytic subunit hTERT and death of tumor cells. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **62**(3), 239-250.] DOI: 10.18097/pbmc20166203239
35. Жданов Д.Д., Покровский В.С., Орлова Е.В., Орлова В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Соколов Н.Н. (2017) Внутриклеточная локализация апоптотической эндонуклеазы EndoG и сплайс-вариантов каталитической субъединицы теломеразы hTERT. *Биохимия*, **82**, 1163-1175. [Zhdanov D.D., Pokrovsky V.S., Orlova E.V., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. (2017) Intracellular localization of apoptotic endonuclease EndoG and splice-variants of telomerase catalytic subunit hTERT. *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 894-905.] DOI: 10.1134/S0006297917080041
36. Wiczorek G., Asemisen A., Model F., Turbachova I., Floess S., Liebenberg V., Baron U., Stauch D., Kotsch K., Pratschke J., Hamann A., Loddenkemper C., Stein H., Volk H.D., Hoffmüller U., Grützkau A., Mustea A., Huehn J., Scheibenbogen C., Olek S. (2009) Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res.*, **69**, 599-608.
37. Blinova V.G., Novachly N.S., Gippius S.N., Hilal A., Gladilina Y.A., Eliseeva D.D., Zhdanov D.D. (2021) Phenotypical and functional characteristics of human regulatory T cells during *ex vivo* maturation from CD4⁺ T lymphocytes. *Appl. Sci.*, **11**, 5776. DOI: 10.3390/app11135776
38. Ukena S.N., Höpting M., Velaga S., Ivanyi P., Grosse J., Baron U., Ganser A., Franzke A. (2011) Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: phenotype, function, stability, and expansion capacity. *Exp. Hematol.*, **39**, 1152-1160.
39. Hippen K.L., Merkel S.C., Schirm D.K., Sieben C.M., Sumstad D., Kadidlo D.M., McKenna D.H., Bromberg J.S., Levine B.L., Riley J.L., June C.H., Scheinberg P., Douek D.C., Miller J.S., Wagner J.E., Blazar B.R. (2011) Massive *ex vivo* expansion of human natural regulatory T cells (Tregs) with minimal loss of *in vivo* functional activity. *Sci. Transl. Med.*, **3**, 83ra41. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001809
40. Hoffmann P., Eder R., Kunz-Schughart L.A., Andreesen R., Edinger M. (2004) Large-scale *in vitro* expansion of polyclonal human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Blood*, **104**, 895-903.
41. Lifshitz G.V., Zhdanov D.D., Lokhonina A.V., Eliseeva D.D., Lyssuck E.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaia S.N. (2016) *Ex vivo* expanded regulatory T cells CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} develop strong immunosuppressive activity in patients with remitting-relapsing multiple sclerosis. *Autoimmunity*, **49**, 388-396.
42. Feng Y., van der Veeken J., Shugay M., Putintseva E.V., Osmanbeyoglu H.U., Dikiy S., Hoyos B.E., Moltedo B., Hemmers S., Treuting P., Leslie C.S., Chudakov D.M., Rudensky A.Y. (2015) A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance. *Nature*, **528**, 132-136.
43. Miyazaki T., Arai S. (2007) Two distinct controls of mitotic cdk1/cyclin B1 activity requisite for cell growth prior to cell division. *Cell Cycle*, **6**, 1419-1425.
44. Thiemann S., Man J.H., Chang M.H., Lee B., Baum L.G. (2015) Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations. *J. Biol. Chem.*, **290**, 22662-22677.
45. Tegl A.C., Cudrici C.D., Nguyen V., Danoff J., Kruszewski A.M., Boodhoo D., Mekala A.P., Vlaicu S.I., Chen C., Rus V., Badea T.C., Rus H. (2015) RGC-32 is a novel regulator of the T-lymphocyte cell cycle. *Exp. Mol. Pathol.*, **98**, 328-337.
46. Williams L.M., Rudensky A.Y. (2007) Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.*, **8**, 277-284.
47. Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., Schuler G. (2001) *Ex vivo* isolation and characterization of CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.*, **193**, 1303-1310.
48. Ferber I.A., Brocke S., Taylor-Edwards C., Ridgway W., Dinisco C., Steinman L., Dalton D., Fathman C.G. (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*, **156**, 5-7.
49. Dominguez-Villar M., Baecher-Allan C.M., Hafler D.A. (2011) Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat. Med.*, **17**, 673-675.
50. Chen X., Bäuml M., Männel D.N., Howard O.M.Z., Oppenheim J.J. (2007) Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol.*, **179**, 154-161.
51. Chen G., Goeddel D.V. (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, **296**, 1634-1635.
52. Grell M., Becke F.M., Wajant H., Männel D.N., Scheurich P. (1998) TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.*, **28**, 257-263.
53. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. (2018) Murine regulatory T cells induce death of effector T, B, and NK lymphocytes through a contact-independent mechanism involving telomerase suppression and telomere-associated senescence. *Cell. Immunol.*, **331**, 146-160.
54. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Pokrovsky V.S., Sokolov N.N. (2018) Contact-independent suppressive activity of regulatory T cells is associated with telomerase inhibition, telomere shortening and target lymphocyte apoptosis. *Mol. Immunol.*, **101**, 229-244.

Поступила в редакцию: 14. 01. 2022.
После доработки: 27. 01. 2022.
Принята к печати: 28. 01. 2022.

INCREASED SUPPRESSOR ACTIVITY OF TRANSFORMED EX VIVO REGULATORY T-CELLS IN COMPARISON WITH UNSTIMULATED CELLS OF THE SAME DONOR

V.G. Blinova¹, Y.A. Gladilina¹, D.D. Eliseeva², T.A. Lobaeva³, D.D. Zhdanov^{1,3,*}

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: zhdanovdd@mail.ru

²Research Center of Neurology,
80 Volokolamskoe Shosse, Moscow, 125367 Russia

³Department of Biochemistry, Peoples Friendship University of Russia (RUDN University),
6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia

Regulatory T-cells CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} (Tregs) play a key role in the maintenance of tolerance to auto antigens, inhibit function of effector T and B lymphocytes, and provide a balance between effector and regulatory arms of immunity. Patients with autoimmune diseases have decreased Treg numbers and impaired suppressive activity. Transformed *ex vivo* autologous Tregs could restore destroyed balance of the immune system. We developed a method for Treg precursor cell cultivation. Following the method, we were able to grown up 300-400 million of Tregs cells from 50 ml of peripheral blood during a week. Transformed *ex vivo* Tregs are 90-95% CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD127^{low} and have increased expression of transcription genes *FoxP3* and *Helios*. Transformed *ex vivo* Tregs have increased demethylation of FoxP3 promoter and activated genes of proliferation markers Cycline B1, Ki67 and LGALS 1. Transformed *ex vivo* Tregs have increased suppressive activity and up to 80-90% these cells secrete cytokines TNF α и IFN γ . Our data suggest transformed *ex vivo* autologous Tregs have genetic, immunophenotypic and functional characteristics for regulatory T-cells and further can be used for adoptive immunotherapy autoimmune diseases and inhibition of transplantation immunity.

Key words: regulatory T-cells; transformation *ex vivo*; suppression activity; cell markers; promoter methylation; FoxP3

Funding. The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030.

Received: 14.01.2022, revised: 27.01.2022, accepted: 28.01.2022.