

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ
В.Н. ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

БЛИНОВА ВАРВАРА ГЛЕБОВНА

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ И СУПРЕССОРНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА С СЕЛЕКТИВНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ СПЛАЙС-ВАРИАНТОВ FOXP3

1.5.4. – биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., доцент Жданов Дмитрий Дмитриевич

Москва - 2025

Оглавление

Список сокращений.....	5
Введение	7
Актуальность темы исследования.....	7
Цель исследования	8
Задачи исследования	8
Научная новизна	9
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	9
Положения, выносимые на защиту	10
Степень достоверности	10
Личный вклад автора.....	10
Апробация результатов	11
1. Обзор литературы.....	12
1.1. Регуляторные Т-клетки.....	12
1.1.1. Дифференцировка регуляторных Т-клеток.....	12
1.1.2. Иммунофенотип регуляторных Т-клеток.....	15
1.1.3. Функциональная активность регуляторных Т-клеток	21
1.2. FoxP3 как основной белок регуляторных Т-клеток.....	22
1.2.1. FoxP3 и регуляторные Т-клетки	22
1.2.2. FoxP3 как транскрипционный фактор.....	23
1.2.3. Структура FoxP3	24
1.3. Виды альтернативного сплайсинга	32
1.4. Механизм альтернативного сплайсинга	34
1.5. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды, их механизм действия и химические модификации	35
1.6. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК FoxP3.....	39
1.7. Белковые формы сплайс-вариантов FoxP3	41

1.8. Регуляторные Т-клетки и аутоиммунные заболевания	44
1.9. Возможности регенеративной терапии аутоиммунных заболеваний на основе регуляторных Т-клеток.....	46
2. Материалы и методы	50
2.1. Соблюдение этических стандартов и характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями и здоровых доноров	50
2.2. Детекция регуляторных Т-клеток в образцах периферической крови	51
2.3. Выделение регуляторных Т-клеток и размножение <i>ex vivo</i>	52
2.4. Выделение РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени.....	53
2.5. Трансфекция клеток переключающими сплайсинг олигонуклеотидами	54
2.5. Определение доли пролиферирующих регуляторных Т-клеток и мониторинг клеточной гибели.....	56
2.6. Вестерн-блоттинг	56
2.7. Анализ супрессорной активности регуляторных Т-клеток.....	57
2.8. Подавление активности теломеразы	57
2.9. Определение концентрации цитокинов	58
2.10. Статистическая обработка результатов	58
3. Результаты	59
3.1. Уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в регуляторных Т-клетках периферической крови здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными заболеваниями	59
3.2. Гомогенность и скорость пролиферации размноженных <i>ex vivo</i> регуляторных Т-клеток	61
3.3. Отсутствие изменений уровней экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в размноженных <i>ex vivo</i> регуляторных Т-клетках	62
3.4. Супрессорная активность размноженных регуляторных Т-клеток	63
3.5. Подбор размера переключающих сплайсинг олигонуклеотидов	64
3.6. Подбор комбинации переключающих сплайсинг олигонуклеотидов для селективной экспрессии индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3.....	66
3.6.1. Трансфекция регуляторных Т-клеток одиночным переключающим сплайсинг олигонуклеотидом, модулирующим альтернативный сплайсинг экзона 2 или 7	66

3.6.2. Селективная экспрессия индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 в регуляторных Т-клетках после трансфекции парой переключающих сплайсинг олигонуклеотидов	70
3.7. Пролиферативная активность регуляторных Т-клеток с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3	73
3.8. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3	78
3.9. Уровень синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности регуляторных Т-клеток.....	80
3.10. Подавление активности теломеразы регуляторными Т-клетками, селективно экспрессирующими индивидуальные сплайс-варианты FoxP3.....	83
3.11. Цитокиновый профиль регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3	84
3.12. Иммунофенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток с индивидуальными сплайс-вариантами FoxP3	85
3.13. Индукция полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 в регуляторных Т-клетках пациентов с боковым амиотрофическим склерозом	87
3.14. Пролиферативная активность регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.....	90
3.15. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.....	91
3.16. Иммунофенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.....	95
4. Обсуждение	97
5. Заключение	107
Выводы	109
Список использованной литературы	110
Благодарности	125
Приложение	126

Список сокращений

AG – динуклеотид аденин-гуанин

CAR (chimeric antigen receptor) – химерный антигенный рецептор

cmTreg (central memory) – центральные Трег памяти

CNS (conserved non-coding sequence) – консервативная некодирующая последовательность ДНК

CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) – ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4

emTreg (effector memory) – эффекторные Трег памяти

ESE (exonic splicing enhancers) – экзонные энхансеры сплайсинга

ESS (exonic splicing silencers) – экзонные сайленсеры сплайсинга

eTreg (effector) – эффекторные Трег

FoxP3 (Forkhead box protein P3) – белок Forkhead box P3

FoxP3FL (Forkhead box P3 full-length) – полноразмерная форма белка FoxP3

Gfi1 (growth factor independent 1 Transcriptional Repressor) – транскрипционный репрессор Gfi1

GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) – глюкокортикоид-индуцированный белок семейства рецепторов TNF

GU – динуклеотид гуанин-урацил

HDAC7 (histone deacetylase 7) – гистондеацетилаза 7

hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) – гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины

IPEX (Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked) синдром – X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии

ISE (intronic splicing enhancers) – интронные энхансеры сплайсинга

ISS (intronic splicing silencers) – интронные сайленсеры сплайсинга

LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, продукт гена LAG3

LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) – ассоциированный с функцией лимфоцитов антиген-1

NES (nuclear export signal) – сигнал ядерного экспорта

NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) – ядерный фактор активированных Т-клеток

NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерного импорта

nTreg (naïve) – наивные Трег

PolyP – полипиримидиновый ряд

RBR (Runx1-binding region) – участок связывания RunX

SP (single positive) – одинарно положительные (тимоциты)

SR-белки – богатые серином/аргинином регулирующие сплайсинг белки

TGF- β (transforming growth factor beta) – трансформирующий фактор роста бета

TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) – рецептор фактора некроза опухоли 2

АИЗ – аутоиммунные заболевания

АНЦА – ассоциированный васкулит – васкулит, характеризующийся определением антинейтрофильных цитоплазматических антител

АПК – антиген-презентирующая клетка

АС – альтернативный сплайсинг

БАС – боковой амиотрофический склероз

БШ – болезнь Шегрена

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

ИЛ – интерлейкин

ИНФ- γ – интерферон- γ

мяРНП – малый ядерный рибонуклеопротеин

пре-мРНК – пре-матричная рибонуклеиновая кислота

ПСО – переключающий сплайсинг олигонуклеотид

пТрег – периферические Трег

РС – рассеянный склероз

ТКР – Т-клеточный рецептор

Трег – регуляторные Т-клетки

тТрег – тимические Трег

Тх – Т-хэлпер

Введение

Актуальность темы исследования

Регуляторные Т-клетки (Трег) являются субпопуляцией CD4⁺ Т-лимфоцитов, ответственной за поддержание иммунного гомеостаза. Они контролируют иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены, индуцируя аутоотолерантность и сдерживая воспалительные реакции. Свое действие они реализуют путем супрессии иммунокомпетентных клеток различных типов. Под супрессорной активностью Трег понимают их способность ингибировать активацию, созревание, пролиферацию или функциональную активность клеток-мишеней [1]. Трег являются центральными клетками иммунной системы, супрессирующими активированные лимфоциты при аутоиммунных заболеваниях (АИЗ), при которых чрезмерная активация Т- и В-лимфоцитов является одним из основных звеньев патогенеза. Многие патогенетические механизмы развития АИЗ остаются малоизученными, что ограничивает развитие терапевтических подходов. На сегодняшний день терапия таких АИЗ как рассеянный склероз (РС), боковой амиотрофический склероз (БАС) и болезнь Шегрена (БШ) не всегда обеспечивает удовлетворительный клинический эффект [2–4], что делает актуальным изучение молекулярных механизмов патогенеза данных заболеваний с целью выявления потенциальных терапевтических мишеней и разработки подходов для регенеративной терапии. При многих АИЗ, включая вышеперечисленные, в периферической крови пациентов выявлено снижение количества Трег и/или нарушение их супрессорной функции [2,5], что приводит к увеличению числа аутоактивированных лимфоцитов и, как следствие, к прогрессированию заболеваний.

Forkhead box protein P3 (FoxP3) – основной белок, регулирующий дифференцировку, стабильность, пролиферативную и супрессорную активность Трег [6]. У человека описаны четыре основных варианта FoxP3, образующиеся в процессе альтернативного сплайсинга (АС) его пре-матричной рибонуклеиновой кислоты (пре-мРНК): полноразмерный вариант (full-length – FoxP3FL), содержащий 11 кодирующих экзонов, варианты с делецией второго – FoxP3Δ2 или седьмого экзона – FoxP3Δ7, а также вариант с делецией обоих экзонов – FoxP3Δ2Δ7 [7]. Полноразмерная белковая форма FoxP3 содержит несколько отдельных доменов, отвечающих за реализацию его функции как транскрипционного фактора. Поэтому делеции экзонов в результате АС и последующие делеции в соответствующих доменах приводят к изменению структуры белковых форм сплайс-вариантов FoxP3, что в конечном итоге сказывается на активности Трег. Влияние индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 на супрессорные механизмы и скорость пролиферации Трег не изучены в полной мере. Данные о биологических эффектах АС пре-мРНК FoxP3 могут внести вклад в понимание функционирования Трег в норме и при патологиях.

Степень разработанности темы

В 2005 году был впервые описан АС пре-мРНК FoxP3 [8]. При дальнейшем изучении влияния экспрессии различных сплайс-вариантов на функции Трег было выявлено нарушение супрессорной активности Трег и развитие аутоиммунных реакций при избирательной экспрессии укороченных сплайс-вариантов данного белка [9]. Последующие работы выявили корреляцию нарушенной экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 и такими АИЗ, как васкулит, характеризующийся определением антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА – ассоциированный васкулит) [10], тиреоидит Хашимото [11], гигантоклеточный артериит [12] и рассеянный склероз [13]. В данный момент продолжается изучение механизмов АС FoxP3 и его последствий в контексте функционирования Трег.

Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды (ПСО) — это короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, которые связываются с пре-мРНК и/или мРНК по принципу комплементарности, создавая при этом стерический блок, препятствующий связыванию факторов сплайсинга с целевой пре-мРНК/мРНК. Идея использовать данные молекулы для модуляции сплайсинга белков появилась в 1993 году и получила развитие в работах, направленных на поиск новых терапевтических агентов [14–17]. Успехом завершились результаты клинических испытаний лекарственных препаратов на основе ПСО для таких заболеваний как миодистрофия Дюшенна (Этеплирсен) [18] и спинальная мышечная атрофия (Нусинерсен) [19]. Данные о рассмотрении процесса АС FoxP3 в качестве терапевтической мишени для модуляции ПСО в литературе отсутствуют.

Цель исследования

Изучить влияние селективной индукции сплайс-вариантов FoxP3 на пролиферативную и супрессорную активность регуляторных Т-клеток человека.

Задачи исследования

1. Определить уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями: рассеянным склерозом, боковым амиотрофическим склерозом и болезнью Шегрена, а также в Трег здоровых доноров.
2. Подобрать последовательности переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, способных наиболее эффективно индуцировать АС пре-мРНК FoxP3 при наибольшей эффективности трансфекции клеток.
3. Осуществить модуляцию альтернативного сплайсинга пре-мРНК FoxP3 путем применения комбинации переключающих сплайсинг олигонуклеотидов для селективной экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в Трег здоровых доноров и пациентов с аутоиммунным заболеванием.

4. Оценить динамику пролиферации Трег, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, и их способность супрессировать клетки-мишени.
5. Провести иммунофенотипическую характеристику Трег с индивидуальными сплайс-вариантами FoxP3 и определить уровни синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности.

Научная новизна

Впервые определены уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови здоровых доноров и пациентов с АИЗ (РС, БАС и БШ). Впервые подобраны последовательности переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, с помощью которых осуществлена модуляция альтернативного сплайсинга пре-мРНК FoxP3 и получены Трег с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов. С целью изучения роли индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 в молекулярных механизмах иммунитета у полученных Трег определены иммунофенотип и уровни синтеза молекул, ответственных за реализацию супрессорных механизмов. Оценена пролиферативная и супрессорная активность полученных Трег.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данные о влиянии индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 в реализации биологических функций Трег могут иметь значение для понимания их роли в развитии АИЗ. Описанный в работе подход к селективной экспрессии полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 позволяет получить аутологичные Трег с увеличенной пролиферативной и супрессорной активностью. Данный подход применим для создания персонализированного клеточного продукта Трег и при дальнейшем развитии может стать основой редактирования генома Трег *ex vivo* для целей регенеративной терапии АИЗ с нарушениями Т-клеточного звена иммунитета. Описанные в работе методы могут быть использованы для дальнейших исследований биохимических и молекулярно-биологических особенностей FoxP3 в Трег.

Методология и методы исследования

В работе использованы методы биохимии, клеточной биологии и инженерии, молекулярной биологии: определение количества Трег в периферической крови, оценка уровня экспрессии сплайс-вариантов FoxP3, размножение Трег *ex vivo*, трансфекция клеток олигонуклеотидами для получения Трег с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3, оценка интенсивности пролиферации и супрессорной активности, определение иммунофенотипа полученных клеток и уровня синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности.

Положения, выносимые на защиту

1. В Трег периферической крови здоровых доноров преобладает полноразмерный сплайс-вариант FoxP3 и вариант с делецией экзона 2, в то время как в Трег пациентов с АИЗ (рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и болезнь Шегрена) преобладают сплайс-варианты с делецией экзона 7 и делециями обоих экзонов 2 и 7.
2. Олигонуклеотиды длиной 36 оснований, комплементарные участкам пре-мРНК FoxP3, регулирующим АС экзонов 2 и 7, способны эффективно индуцировать селективную экспрессию сплайс-вариантов FoxP3.
3. Трег с полноразмерным сплайс-вариантом FoxP3 обладают наибольшей супрессорной и пролиферативной активностью, тогда как Трег с делециями экзонов 2 и/или 7 менее активны, что сопряжено со снижением уровня синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности. Индукция индивидуальных сплайс-вариантов приводит к изменению иммунофенотипа Трег.
4. Подход по индукции полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 позволяет увеличить супрессорную и пролиферативную активность Трег пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.

Степень достоверности

Работа выполнена с использованием современного оборудования, реактивов и наборов надлежащей чистоты и качества. Работы с биологическим материалом, полученным от доноров, проводились в соответствии с международными этическими стандартами. В работе применены методики, зарекомендовавшие свою эффективность и надежность, новые или модифицированные методики были предварительно отработаны. Экспериментальная работа была проведена с достаточным количеством технических повторов и независимых контрольных измерений, что наряду с общепринятыми методами статистического анализа позволяет говорить о достоверности полученных результатов. Анализ результатов проведен с учетом современных данных биологических и медицинских наук. Результаты работы не противоречат данным других исследователей.

Личный вклад автора

Соискателем проработана отечественная и зарубежная литература по теме диссертации. Автор лично проводил определение содержания Трег в периферической крови, выделение Трег, определение уровня экспрессии сплайс-вариантов FoxP3, трансфекцию Трег ПСО, оценку пролиферативной активности, определение иммунофенотипа и уровня синтеза ассоциированных с супрессорной активностью молекул. Соискателем были проанализированы полученные результаты, подготовлены публикации и тезисы конференций.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на международном конгрессе CRISPR-2023 (Новосибирск, 2023), на Международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2023), на Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика» (Москва, 2024), на Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика Т.Т. Березова “Биохимия человека” (Москва, 2024), на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024), на XXXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2025).

1. Обзор литературы

1.1. Регуляторные Т-клетки

Предпосылки к изучению регуляторных клеточных механизмов появились в 1969 г., когда результаты исследования, опубликованного Я. Нишизука (Y. Nishizuka) и Т. Сакакура (T. Sakakura), выявили, что у мышей, лишенных тимуса, разрушаются ткани яичников [20]. Позднее они обнаружили, что ткани разрушавшихся яичников заполнены иммунными клетками, что свидетельствовало о наличии аутоиммунного процесса, возникшего в результате дисфункции неизвестного на тот момент регуляторного механизма [21]. В 1972 г. Р. Гершон (R. Gershon) установил, что лимфоциты, выделенные из тимуса, способны оказывать специфическое регуляторное действие на иммунные реакции, и назвал эти клетки супрессорными Т-клетками [22]. Для идентификации супрессорных Т-клеток с середины 1980-х гг. проводился поиск специфичного для данных клеток маркера [23]. В 1995 г. группа Ш. Сакагучи (S. Sakaguchi) обнаружила, что $CD4^+$ Т-клетки, экспрессирующие маркер CD25, способствуют поддержанию аутоотолерантности путем снижения иммунного ответа на собственные и чужеродные антигены неспецифическим для антигенов образом, и устранение/снижение количества $CD4^+CD25^+$ Т-клеток приводит к усилению иммунного ответа на чужеродные и определенные собственные антигены [24]. Впоследствии $CD4^+CD25^+$ Т-клетки были названы регуляторными и исследования, направленные на изучение их биологии при физиологических и различных патологических состояниях, а также на факторы, обуславливающие их активность, продолжаются и в настоящее время.

1.1.1. Дифференцировка регуляторных Т-клеток

1.1.1.1. Дифференцировка регуляторных Т-клеток в тимусе

Описаны два пути дифференцировки Трег в тимусе (рис. 1) [25]. Классический путь предполагает развитие $CD25^+FoxP3^-$ клеток-предшественников Трег из аутореактивных $CD4^+$ одинарно положительных (англ. *single-positive* - SP) тимоцитов. Обозначение SP отображает стадию развития тимоцита. В ходе дифференцировки сначала появляются двойные отрицательные $CD4^-CD8^-$ тимоциты, у которых отсутствуют молекулы CD4 и CD8, затем двойные положительные $CD4^+CD8^+$, после чего одинарно положительные $CD4^+CD8^-$ и $CD4^-CD8^+$ SP тимоциты. $CD4^+SP$ тимоциты с помощью Т-клеточного рецептора (ТКР) распознают аутопептиды, представленные им тимическими антиген-презентирующими клетками (АПК). В результате некоторые тимоциты подвергаются негативной селекции, тогда как остальные претерпевают дальнейшую дифференцировку [26]. Решающим фактором является аффинность ТКР к представляемому пептиду. Высокая аффинность приводит к клональной делеции. Аффинность, необходимая для дифференцировки Трег, находится в диапазоне от «средней», индуцирующей позитивную селекцию $CD4^+$ Т-клеток, до высокой, приводящей к негативной

селекции [27]. Распознавание ТКР аутопептида вызывает повышение уровня экспрессии поверхностного маркера Трег CD25. Помимо этого, для дифференцировки Трег необходим CD28-опосредованный сигналинг. CD28 распознает лиганды CD80/CD86, представленные на поверхности АПК. Считается, что CD28-опосредованный сигналинг обеспечивает выживание и дифференцировку тех тимоцитов, ТКР которых с оптимальной аффинностью распознали представленный пептид [28]. Далее $CD25^+$ предшественники Трег трансформируются в зрелые $CD25^+FoxP3^+$ Трег под действием интерлейкина-2 (ИЛ-2) или родственных ему цитокинов ИЛ-15 и ИЛ-7 [29]. Экспрессия FoxP3, в свою очередь, индуцирует экспрессию других Трег-ассоциированных молекул [30].

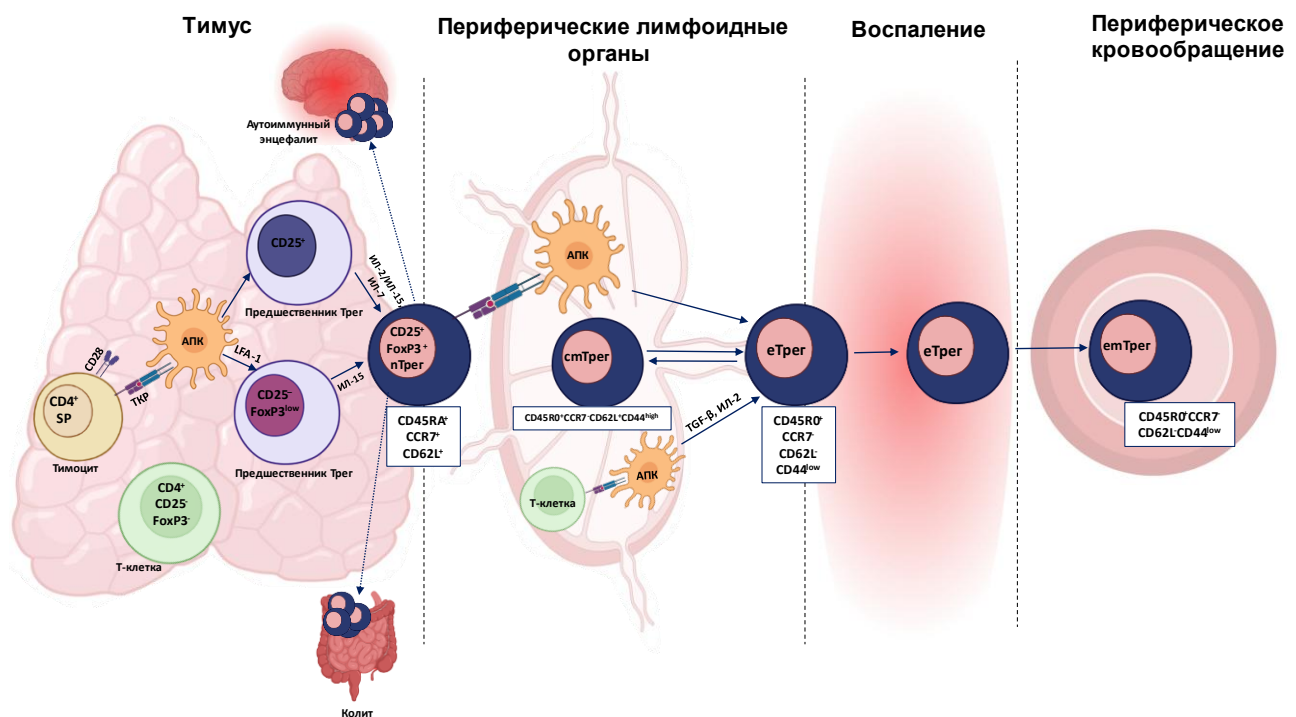


Рисунок 1. Дифференцировка Трег. Дифференцировка Трег в тимусе из $CD4^+SP$ тимоцитов приводит к существованию двух видов предшественников Трег: $CD25^+$ и $CD25^-FoxP3^{low}$. На их появление влияет аффинность ТКР к представляемому пептиду и участие различных костимулирующих факторов. Зрелые pТрег, полученные от двух видов предшественников, характеризуются различиями в функциональной активности. Трег в периферических лимфоидных органах развиваются из $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитов при воздействии ИЛ-2 и трансформирующего фактора роста бета (англ. *transforming growth factor beta* - *TGF-β*). pТрег при распознавании антигена, представленного АПК, приобретают фенотип eТрег. Миграция Трег из/в лимфоидные органы сопряжена со сменой фенотипа. Изображение создано с использованием программы BioRender. Описание представленных на рисунке 1 маркеров приведено в таблице 2.

Согласно «неклассическому» пути, предшественниками Трег являются клетки с изначально низким уровнем экспрессии FoxP3 и отсутствием CD25 (CD25⁻FoxP3^{low}), что было показано на клетках мышей [25]. Их появлению способствует слабая аффинность взаимодействия расположенных на CD4⁺SP тимоцитах ТКР с представляемым им пептидом. Для усиления аффинности данным клеткам необходима костимуляция ассоциированным с функцией лимфоцитов антигеном-1 (англ. *lymphocyte function-associated antigen 1* - LFA-1). Для трансформации CD25⁻FoxP3^{low} в зрелые Трег клеткам необходим ИЛ-15 [25].

Трег, прошедшие дифференцировку в тимусе, называются тимическими – тТрег. Примечательно, что зрелые тТрег, полученные от двух типов предшественников, различаются по реализуемой ими функциональной активности. Трег, развившиеся из CD25⁺ предшественников, предотвращают возникновение экспериментального аутоиммунного энцефалита [25]. Трег, полученные из CD25⁻FoxP3^{low} предшественников, способны сдерживать развитие колита [25]. Существование двух типов предшественников Трег в тимусе отражает присущую данным клеткам гетерогенность.

1.1.1.2. Дифференцировка регуляторных Т-клеток в периферических лимфоидных органах

Помимо развития в тимусе, дифференцировка Трег также может проходить из CD4⁺CD25⁻ Т-клеток в периферических лимфоидных органах (рис. 1) [30]. В отличие от тТрег, при развитии периферических Трег (пТрег) ТКР распознают чужеродные, поступающие с пищей антигены, аллергены, антигены комменсальных микроорганизмов, а также фетальные антигены [31]. Подобная антигенная специфичность обуславливает локализацию пТрег преимущественно в лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (мукозо-ассоциированная лимфоидная ткань) [32]. К ней относится лимфоидная ткань желудочно-кишечного и урогенитального трактов, дыхательной системы и др. Кроме того, распознаванию могут подвергаться и аутопептиды, не представленные тимическими АПК. Таким образом, уникальная природа распознаваемых ТКР антигенов формирует особый репертуар ТКР пТрег. Уникальный репертуар ТКР пТрег обуславливает их отличную от пТрег функциональную активность [28]. Помимо распознавания антигенов ТКР для дифференцировки пТрег необходима стимуляция цитокинами ИЛ-2 и TGF-β. Большая концентрация TGF-β способствует активации локуса FoxP3 и стимулирует выживание и деление клеток. TGF-β также подавляет экспрессию транскрипционного репрессора Gfi-1 (англ. *growth factor independent 1 Transcriptional Repressor*), ингибирующего дифференцировку пТрег. ИЛ-2 препятствует дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в Т-хэлперы 17 типа (Th17) [33].

В зависимости от статуса дифференцировки выделяют наивные (англ. *naïve* – nТрег), эффекторные (англ. *effector* - еТрег), эффекторные клетки памяти (англ. *effector memory* - емТрег) и центральные клетки памяти (англ. *central memory* - смТрег) (рис. 1) [34].

Трег являются наивными до распознавания родственного им антигена [35]. При воздействии антигена они активируются и дифференцируются в еТрег. При нахождении в периферических лимфоидных органах происходит дифференцировка еТрег в смТрег. Дифференцировка еТрег в емТрег происходит при миграции клеток в ткани или периферическое кровообращение в ответ на воздействие антигена [34]. Выделенные типы Трег характеризуются сменой фенотипа.

1.1.2. Иммунофенотип регуляторных Т-клеток

На фенотипическую характеристику Трег существенное влияние оказывают такие свойства клеток, как гетерогенность и пластичность (таблица 1). Под гетерогенностью понимается генетически обусловленное необратимое свойство Трег, характеризующееся возникновением различных субпопуляций клеток в результате двух возможных путей развития в тимусе. Пластичность — это обратимое свойство Трег, которое характеризуется сменой фенотипа (англ. *phenotype-switch*) в адаптационных целях в ответ на или с целью изменения микроокружения. Данные свойства проявляются, начиная с дифференцировки Трег, и прослеживаются при функционировании клеток и также в связи с возникновением новых физиологических и патологических условий.

Таблица 1. Критерии различия между гетерогенностью и пластичностью Трег.

Критерий	Гетерогенность	Пластичность
Причина появления различных субпопуляций	Различные пути дифференцировки в тимусе	Изменяющиеся условия среды (воспаление, микроокружение опухоли)
Клеточный предшественник субпопуляций	Разные	Общий
ТКР	Аффинность к представляемому аутоантигену разнится у предшественников субпопуляций	Не выявлено зависимости
Обратимость развития субпопуляций	Необратимое	Обратимое
Экспрессия маркёров	Стабильная	Нестабильная

Основным препятствием для идентификации Трег и сравнительного анализа их функциональных свойств является пластичность. Смена фенотипа и изменение экспрессии определенных маркёров ассоциированы с процессами дифференцировки, пролиферативной и функциональной активностью Трег. В таблице 2 приведен обзор наиболее изученных маркёров в контексте идентификации популяции Трег и их биологических свойств. Следует отметить, что приведенное в таблице распределение маркёров по категориям не является строгим, т.к. некоторые молекулы влияют на несколько аспектов жизнедеятельности Трег.

Таблица 2. Маркёры, ассоциированные с идентификацией и функционированием Трег.

Маркёр	Биологическая функция	Ассоциация с Трег	Источники
<i>Идентификация</i>			
CD25, альфа субъединица рецептора ИЛ-2	Оказывает влияние на активацию Т-клеток, индуцированную активацией клеточную смерть, функционирование эффекторных Т-клеток	Высокий уровень экспрессии CD25 является одной из преобладающих характеристик Трег	[30]
CD127, альфа субъединица рецептора ИЛ-7	Влияет на дифференцировку Т-лимфоцитов и клеточный иммунитет	Низкий уровень экспрессии CD127 является одной из преобладающих характеристик Трег. Экспрессия значительно повышается во время активации, тогда как в устойчивом состоянии уровень экспрессии CD127 низкий или отсутствует	[30]
<i>Дифференцировка</i>			
CD45RA/RO, рецепторный белок семейства	Иницирует ТКР-сигналинг	Маркёр статуса дифференцировки Трег. nТрег экспрессируют	[36]

тирозинфосфатаз. CD45RA – белковая форма сплайс-варианта данного белка, содержащая аминокислотные остатки, кодируемые экзоном «А». CD45RO – белковая форма, у которой отсутствуют аминокислотные остатки, кодируемые экзоном «А», «В» или «С»		CD45RA, Трег памяти экспрессируют CD45RO	
CD357 (GITR), член суперсемейства рецепторов TNF	Регулирует иммунные реакции, являясь костимулирующим фактором для активации, дифференцировки и выживания Т-клеток, а также для формирования Т-клеток памяти	Стабильная экспрессия GITR (<i>glucocorticoid-induced TNFR-related protein</i>) регулирует созревание и пролиферацию Трег	[37,38]
CD134 (OX40), член суперсемейства рецепторов TNF	Экспрессируется на Т-лимфоцитах. Обеспечивает пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов и их выживание	Экспрессия OX40 коррелирует с ранними стадиями дифференцировки FoxP3⁺ предшественников тТрег. OX40-опосредованный сигналинг влияет на	[39]

		созревание и пролиферацию тТрег	
CD120b (TNFR2), рецептор фактора некроза опухоли 2	TNFR2 (<i>tumor necrosis factor receptor 2</i>) оказывает противовоспалительное действие, обладает иммуносупрессорной функцией, воздействуя на различные типы иммунных клеток	Высокий и стабильный уровень экспрессии активированными Трег. Взаимодействие между TNF-α и TNFR2 критически влияет на активацию, пролиферацию и фенотипическую стабильность Трег	[40]
CD62L (L-селектин), трансмембранный лектиновый рецептор, молекула адгезии лейкоцитов	Регулирует миграцию наивных и центральных Т-клеток памяти в лимфатические узлы и активированных CD8 ⁺ Т-клеток в места вирусной инфекции	Обеспечивают миграцию Трег в периферические лимфоидные органы	[41,42]
CCR7, рецептор хемокинов класса С-С седьмого типа	Участвует в локализации дендритных клеток и Т-клеток в лимфатических узлах. Участвует в индукции периферической толерантности		[42,43]
CD44, рецептор гиалуроновой кислоты, интегральный клеточный гликопротеин	Связывается с компонентами внеклеточного матрикса и белками цитоскелета. Опосредует адгезию к эндотелию и перемещение лимфоцитов в очаг воспаления	Высокая экспрессия характерна для центральных Трег памяти	[30]

Стабильность			
Helios	Член семейства транскрипционных факторов Ikaros. Регулирует ранние этапы дифференцировки Т- и В-лимфоцитов, NK- и дендритных клеток	Экспрессия Helios позволяет идентифицировать стабильные Трег	[44,45]
Супрессорная активность			
TIGIT, трансмембранный гликопротеиновый Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM	Подавляет функцию Т- и NK-клеток и является ключевым ингибитором противоопухолевых реакций	Высокий уровень экспрессии после активации Трег. Усиленная супрессорная активность TIGIT ⁺ Трег по сравнению с TIGIT ⁻ Трег ассоциирована с усиленной продукцией TIGIT ⁺ Трег супрессорного цитокина ИЛ-10 и гранзима В. TIGIT ⁺ Трег ингибируют Тх1 и Тх17.	[46]
CD39, экзофермент, катализирующий превращение АДФ/АТФ в АМФ и АМФ в аденозин	Ключевая роль в регуляции величины и продолжительности пуринергических сигналов, доставляемых иммунным клеткам	Уровень экспрессии CD39 особенно высок в условиях воспаления. CD39 ^{high} Трег характеризуются более высоким уровнем экспрессии FoxP3 и усиленной супрессорной активностью	[47,48]
CD152 (CTLA-4), ингибирующий рецептор	CTLA-4 (<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>) регулирует костимуляцию Т-клеток. Оказывает влияние	Стабильный уровень экспрессии. CTLA-4 определяет Трег с	[30,49,50]

	на развитие в тимусе, периферическую толерантность	сильной супрессорной активностью	
CD223 (LAG-3), рецептор иммунной контрольной точки	LAG-3 (<i>lymphocyte-activation gene 3</i>) ингибирует пролиферацию клеток, иммунную функцию, секрецию цитокинов	Экспрессия LAG-3 способствует усилению супрессорной активности. LAG-3 также проявляет синергизм с CTLA-4, усиливая супрессорную активность Трег	[51,52]
GARP (LRRC32), индуцируемый глюкокортикоидами мембранный рецептор TGF- β	Регулирует доступность связанного с мембраной TGF- β и модулирует его активацию на Трег и тромбоцитах	Отсутствие GARP приводит к снижению уровня CD25, CTLA-4 и супрессорного цитокина ИЛ-10 и к нарушению супрессорной активности Трег	[53,54]
Nrp-1, Нейропилин-1. Трансмембранный гликопротеин	Nrp-1 (<i>Neuropilin 1</i>) участвует в нейрональном развитии и ангиогенезе	Отсутствие Nrp-1 приводит к нарушению супрессорной активности Трег	[55]

Следует учитывать, что экспрессия маркёров не всегда стабильна и постоянна. С данным фактом сопряжены сложности в идентификации и изучении Трег. В настоящее время основным специфичным маркёром линии Трег, играющим центральную роль в регуляции процессов дифференцировки и приобретении клетками пролиферативной и супрессорной активности, принято считать FoxP3. В связи с этим наиболее корректным считается использование CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ или CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ фенотипа Трег [56]. Однако, как показано в данной работе, Трег с различными сплайс-вариантами FoxP3 обладают различным иммунофенотипом, и идентификация FoxP3 имеющимися антителами не всегда позволяет детектировать делеционные белковые варианты. Интересна позиция исследователей относительно определения Helios как маркёра стабильности Трег. Было показано, что в ходе культивирования Трег повторяющаяся стимуляция ТКР приводит к понижению уровня экспрессии Helios, что сопряжено с потерей экспрессии FoxP3 и дальнейшей фенотипической,

эпигенетической и функциональной дестабилизацией данных клеток [45]. При этом проведенный нокаут *Helios* в Трег человека не привел к изменению стабильности и функциональных свойств в условиях воспаления, что указывает на необходимость дальнейшего изучения вовлеченности *Helios* в биологию Трег.

1.1.3. Функциональная активность регуляторных Т-клеток

В организме человека при физиологических условиях, а также при различных аутоиммунных, инфекционных и аллергических заболеваниях Трег способствуют поддержанию иммунологической толерантности [1]. Функциональная активность Трег направлена на подавление эффекторных Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток человека. Как было упомянуто ранее, под супрессорной активностью Трег понимают их способность ингибировать активацию, созревание, пролиферацию или функциональную активность таргетных клеток [1].

Свое действие Трег реализуют посредством нескольких контакт-зависимых и контакт-независимых супрессорных механизмов, которые можно разделить на следующие категории (рис. 2): секреция ингибирующих цитокинов и гранзимов, реализация супрессорной активности через межклеточный контакт, путем нарушения метаболизма эффекторных Т-лимфоцитов и путем подавления синтеза активной формы теломеразы в клетках-мишенях [57–59].

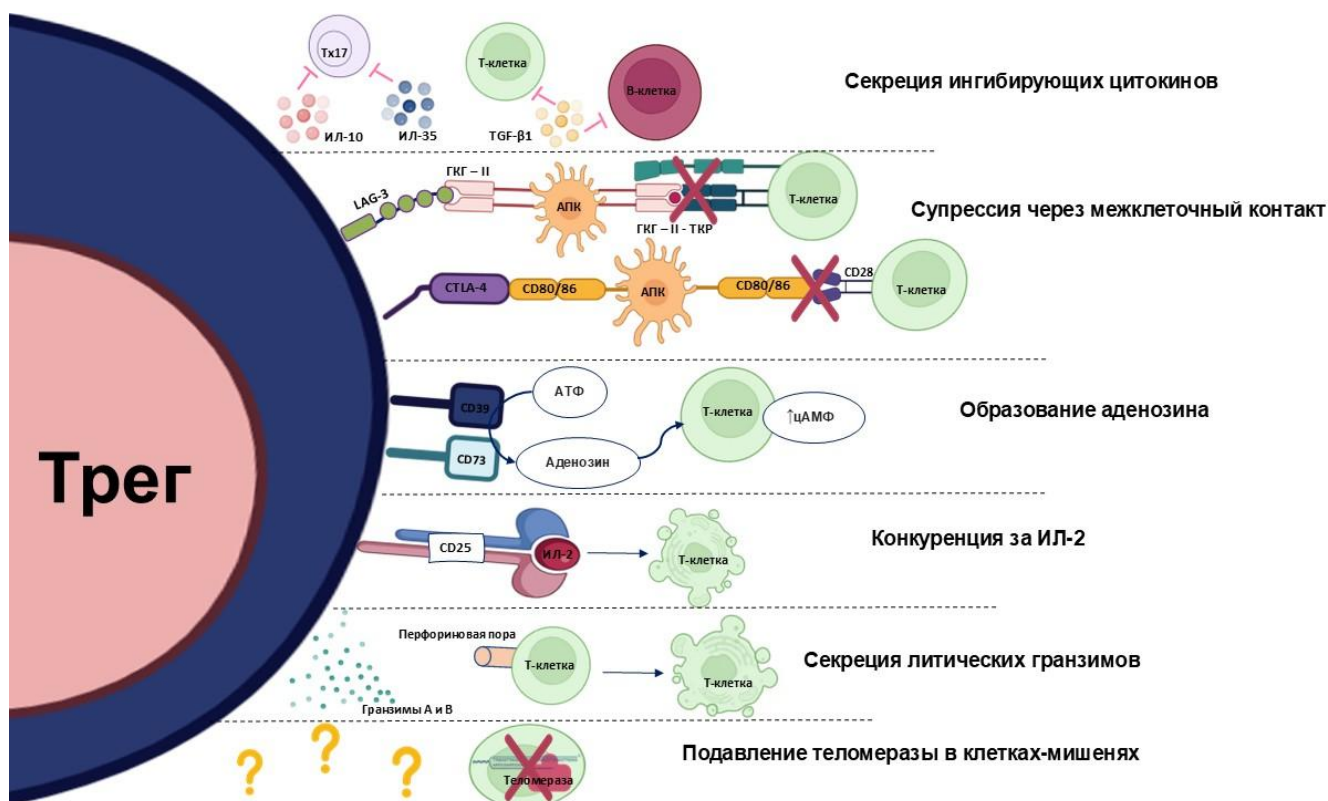


Рисунок 2. Механизмы Трег-опосредованной супрессии. Схематически показаны супрессорные механизмы Трег. Разъяснения приведены в основном тексте работы. Изображение создано с использованием программы BioRender.

В контактных механизмах Трег-опосредованной супрессии задействованы мембранные молекулы CTLA-4 и LAG-3. CTLA-4 связывается с костимуляторными молекулами CD80/86 на поверхности АПК, дендритных клеток (ДК) и моноцитов, предотвращая их взаимодействие с CD28 на Т-клетках и тем самым блокируя их активацию [49]. Без соответствующей костимуляции Т-клетки толерантны к антигену, представленному им. LAG-3, имеющий высокую гомологию со структурой CD4, с высокой аффинностью связывается с молекулами главного комплекса гистосовместимости-II (ГКГ-II), экспрессируемыми АПК, тем самым запуская ингибирующий сигнальный путь, который предотвращает активацию АПК и, соответственно, Т-лимфоцитов [51].

К механизмам контакт-независимой регуляторной активности Трег относятся их способность супрессировать эффекторные клетки путем высвобождения супрессорных цитокинов TGF- β , ИЛ-10 и ИЛ-35, а также вызывать цитолиз за счёт высвобождения гранзимов А и В. ИЛ-35 и ИЛ-10 способствуют подавлению T_H17 [60]. TGF- β 1 подавляет рост и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов [61]. Гранзимы вызывают апоптоз эффекторных Т-клеток [62]. Кроме того, Трег способны «конкурировать» за ростовой фактор ИЛ-2, необходимый для пролиферации Т-клеток, поглощая его из окружающей среды и понижая его доступность для эффекторных клеток [63]. Помимо этого, экзоферменты эктоапираза CD39 и экто-5'-нуклеотидаза CD73, секретируемые Трег, катализируют образование аденозина, который связывается с аденозиновым рецептором на поверхности эффекторных Т-лимфоцитов [48]. Активация рецептора приводит к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ и нарушению пролиферации клеток. Кроме того, Трег содержат большое количество цАМФ, который нарушает функцию эффекторных клеток контактно-зависимым образом [57]. К относительно недавно открытому и еще не полностью изученному контакт-независимому механизму Трег-опосредованной супрессии относятся их способность супрессировать активность теломеразы, подавляя синтез её активной формы, в Т-, В- лимфоцитах и НК-клетках [59]. Согласно изученному механизму Трег активируют апоптотическую эндонуклеазу EndoG, которая индуцирует альтернативный сплайсинг каталитической субъединицы теломеразы hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). Это приводит к остановке клеточного цикла, переходу клеток в состояние репликативного старения и гибели по пути апоптоза [58,59].

1.2. FoxP3 как основной белок регуляторных Т-клеток

1.2.1. FoxP3 и регуляторные Т-клетки

FoxP3 — это транскрипционный фактор, являющийся основным маркёром линии Трег. Мутации в гене *FoxP3* приводят к летальному X-сцепленному синдрому иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (англ. *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked* - IPEX-синдром). При этом ключевым в патогенезе

ИРЕХ-синдрома является дисфункция Трег, приводящая к мультиорганному аутоиммунному поражению [64]. Нарушение способности Трег ингибировать активность $CD4^+$ Т-клеток приводит к инфильтрации аутореактивными лимфоцитами многочисленных органов, что впоследствии вызывает деструкцию тканей. Значительный вклад в деструкцию также вносит продукция аутоантител плазматическими клетками, вызванная чрезмерной аутоактивацией Т- и В – лимфоцитов. Взаимосвязь между мутацией *FoxP3* и возникновением данного синдрома у человека была описана в 2000 году [65]. У мышей *scurfy*, характеризующихся наличием мутации сдвига рамки считывания в гене *Foxp3*, наблюдалось столь же обширное аутоиммунное поражение, характеризующееся полной дисфункцией Трег [66,67]. Открытие роли данных мутаций в возникновении аутоиммунных поражений привело к дальнейшему изучению взаимосвязи между *FoxP3* и Трег. Возникающим поражениям у человека и мыши были подвержены только особи мужского пола, но не гетерозиготные по генам X-хромосомы особи женского пола. Данное наблюдение и системный характер аутоиммунных поражений согласуются с гипотезой о том, что мутации *Foxp3* могут нарушать дифференцировку и/или функционирование $CD25^+$ Трег-клеток несмотря на высокие количества мРНК и белка *Foxp3* [68–70]. Индуцированная экспрессия *Foxp3* в $CD25^-CD4^+$ Т-клетках с использованием ретровирусных векторов приводила к приобретению супрессорной функции и фенотипа Трег, тогда как у мышей с трансгенным геном *Foxp3* супрессорную функцию проявляли $CD8^+$ Т-клетки [68–70]. Кроме того, перенос маркированных клеток костного мозга от мышей с нокаутом *Foxp3* к мышам дикого типа и наоборот, показал, что дифференцировка Трег в мышах происходит только от клеток-предшественников с достаточным количеством *Foxp3* [68]. Полученные результаты доказали, что *FoxP3* необходим для дифференцировки Трег *in vivo*. Кроме того, было показано, что делеция аллеля *Foxp3* в Трег приводит к потере клетками фенотипа и супрессорной активности *in vivo*, а также к приобретению свойств эффекторных Т-клеток, включая продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-17 и интерферона- γ (ИНФ- γ) [71].

Результаты данных исследований показали, что *FoxP3* необходим для дифференцировки, супрессорной функции и поддержания фенотипа Трег. Значительное влияние *FoxP3* на биологию Трег было показано в нескольких работах [6,72–74].

1.2.2. *FoxP3* как транскрипционный фактор

FoxP3 принадлежит к крупному эволюционно консервативному семейству факторов транскрипции Forkhead [6]. Белки данного семейства характеризуются наличием ДНК-связывающего домена Forkhead. Транскрипционные факторы семейства Forkhead вовлечены в регуляцию активности генов, ассоциированных с иммунным ответом, канцерогенезом, ангиогенезом, клеточными процессами, включающими дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность [75]. Полногеномный анализ генов-мишеней *FoxP3* выявил, что

FoxP3 способен связываться с примерно 700 генами и микроРНК, которые участвуют в необходимом для дифференцировки Трег сигнальном пути ТКР, клеточной коммуникации и регуляции транскрипции [6]. Помимо непосредственного взаимодействия с генами-мишенями, FoxP3 в значительной мере регулирует транскрипцию генов опосредованно, связываясь с многочисленными молекулами-партнёрами. В силу того, что FoxP3 взаимодействует как с коактиваторами, так и с корепрессорами транскрипции, он играет двойственную роль в регуляции экспрессии Трег-ассоциированных генов. Эта двойная функция присуща и другим членам семейства Forkhead, которые также являются как транскрипционными активаторами, так и репрессорами [6].

1.2.3. Структура FoxP3

Ген *FOXP3* человека расположен на коротком (p) плече X-хромосомы (Xp11.23) (рис. 3 А). Структурно ген *FOXP3* у человека содержит 1 некодирующий и 11 кодирующих экзонов. Расположение экзон-интронных стыков идентично в кодирующих областях генов человека и мыши [76]. Ключевые регуляторные области гена *FOXP3* включают несколько консервативных некодирующих последовательностей ДНК (англ. *conserved non-coding sequence* – CNS) 0 – 3. Данные цис-регуляторные последовательности определяют различные аспекты экспрессии FoxP3 в Трег. CNS 0 – 1 и 3 способствуют индукции экспрессии FoxP3. CNS0 находится выше промотора FoxP3 и участвует в ИЛ-2 индуцированной экспрессии FoxP3 в период развития Трег в тимусе [77,78]. CNS1 и CNS2 расположены в пределах первого интрона. CNS1 способствует пролиферации периферических Трег. CNS2 определяет поддержание высокого и стабильного уровня экспрессии FoxP3. Консервативный CpG-остров в составе CNS2 отвечает за метилирование. Высокая степень деметилирования CpG связана с повышенной экспрессией FoxP3. CNS3 расположен в пределах второго экзона *FOXP3* и регулирует индукцию экспрессии FoxP3 *de novo* в тимусных и периферических Трег [78]. Взаимодействие данных последовательностей с многочисленными транскрипционными факторами способствует дифференцировке предшественников Трег, а также активации, жизнеспособности, пролиферации и функциональной активности данных клеток [79].

Гену *FOXP3* соответствует белок, полноразмерный вариант которого состоит из 431 аминокислоты общей молекулярной массой 47,27 кДа. В структуре белка FoxP3 выделяют четыре консервативных функциональных домена: N-концевую репрессорную область с высоким содержанием пролина, цинковый палец, лейциновую молнию и домен Forkhead (рис. 3 Б). Следует отметить, что в доступных базах данных отсутствует валидированная 3D-структура цельного белка FoxP3 человека.

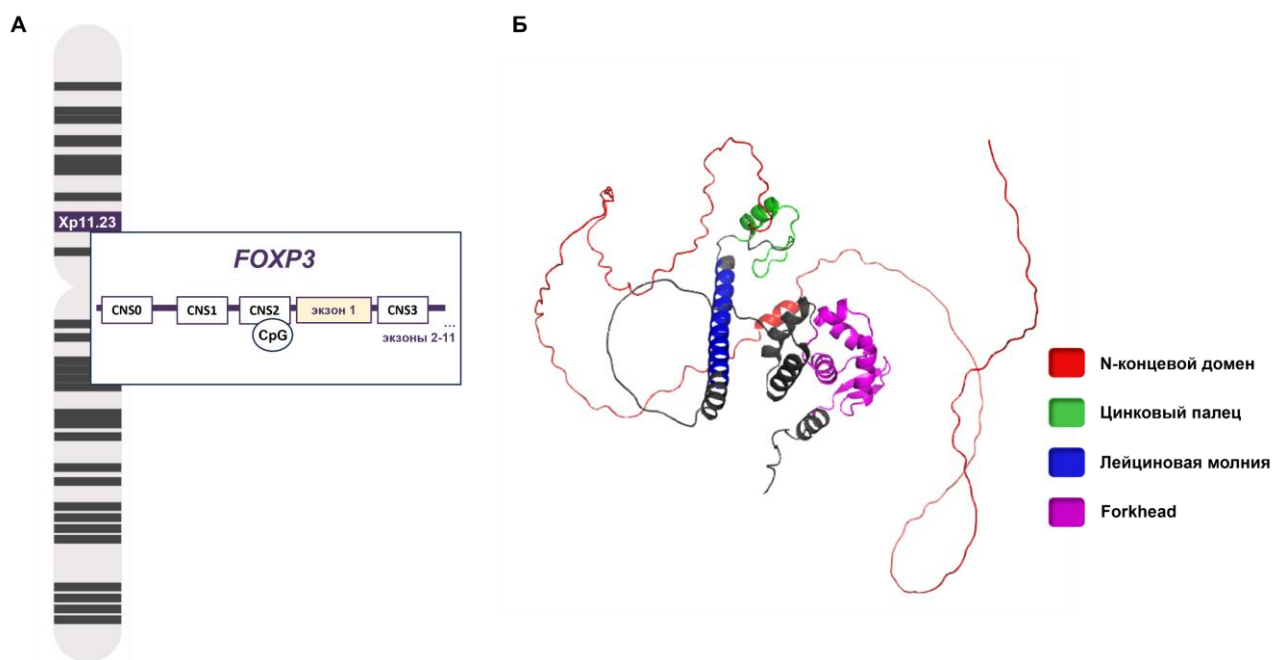


Рисунок 3. Локализация *FOXP3* на X-хромосоме и структура белка FoxP3. (А) Локализация и структура гена *FOXP3* на X-хромосоме. Схематично изображены ключевые регуляторные элементы гена *FOXP3*. CNS0 – 3, консервативные некодирующие последовательности ДНК 0 – 3. CpG, консервативный островок в составе CNS2. (Б) 3D-структура белка FoxP3 с цветовым обозначением функциональных доменов. Структура сгенерирована в программе AlphaFold3 и визуализирована в программе PyMOL 2.5.2.

Присутствуют лишь структуры домена лейциновой молнии FoxP3 мыши (PDB: 4I1L), ДНК-связывающего домена Forkhead мыши (PDB: 7TDW и 7TDX), а также структура димера, образованного доменами Forkhead человека (PDB: 4WK8, 3QRF). Структура N-концевого домена белка отсутствует. Структура полноразмерного белка FoxP3 человека, предсказанная программой AlphaFold3, также имеет низкую достоверность предсказания (наилучшая оценка 56,51 баллов, AF-Q9BZS1-F1-v4). Структура N-концевого домена белка не предсказывается достоверно программой AlphaFold3.

1.2.3.1. Домен N-концевой репрессорной области с высоким содержанием пролина

Домен N-концевой репрессорной области с высоким содержанием пролина (англ. *proline rich N-terminal domain*), кодируемый экзонами 1 – 5, соответствует аминокислотам ¹М...S¹⁹⁰ [80]. Наличие уникальной N-концевой области, богатой пролином (P², P⁴, P⁶, P⁹, P¹², P¹⁸, P²⁰, P²⁴, P³⁰, P⁴¹, P⁶³, P⁶⁵, P⁶⁶, P⁷², P⁷⁵, P⁸¹, P⁸⁸, P⁹⁰, P¹⁰⁰, P¹¹⁶, P¹²², P¹²⁶, P¹³³, P¹³⁴, P¹⁴⁷, P¹⁵⁰, P¹⁵¹, P¹⁶⁵, P¹⁷², P¹⁷⁴, P¹⁷⁷, P¹⁸⁷), отличает FoxP3 от других членов своего семейства, таких как FoxP1, FoxP2 и FoxP4. У перечисленных белков N-концевая область богата глутамином [81]. Данная область FoxP3 связывается с факторами ремоделирования хроматина, необходимыми для транскрипционной

репрессии генов-мишеней. В эпигенетической регуляции участие принимают расположенные на N-конце гистонов остатки лизина (K^8 , K^{31} , K^{44} , K^{179}), подвергающиеся процессам ацетилирования и деацетилирования [76]. Одним из факторов, связывающихся с N-концевой областью с высоким содержанием пролина, является ацетилтрансфераза гистонов TIP60, который связывается с гистондеацетилазой 7 (англ. *histone deacetylase 7* - HDAC7) [82]. Этот фермент удаляет ацетильные группы гистонов, что способствует их более сильному связыванию с ДНК и подавлению транскрипции. Взаимодействие последовательности $^{106}L...S^{190}$ N-концевой области с TIP60 и HDAC7 представляет собой важнейший механизм, посредством которого FoxP3 ингибирует транскрипцию гена *ИЛ-2*. В клетках с нокаутом TIP60 не происходит репрессии синтеза *ИЛ-2* [82]. Мотив $^{92}LQALL^{96}$ N-концевой области отвечает за взаимодействие с транскрипционными факторами - орфанными рецепторами, родственными рецепторам ретиноевой кислоты (англ. *RAR (retinoic acid receptor)-related orphan receptors α , γ* - *ROR α и ROR γ*), которые активируют экспрессию генов *ИЛ-17* и *ИЛ-22*, необходимых для дифференцировки T_H17. Взаимодействие FoxP3 с ROR α и ROR γ t подавляет экспрессию данных генов [83]. С N-концевой областью белка FoxP3, в частности, с последовательностью $^{148}G...V^{198}$ также взаимодействует Eos, что приводит к ингибированию транскрипции *ИЛ-2* и *ИНФ- γ* [83].

1.2.3.2. Домен цинкового пальца

Домен цинкового пальца (англ. *zinc finger*), кодируемый экзонами 5 – 6, соответствует аминокислотам $^{197}G...H^{222}$ [80]. Это структура, обнаруженная в ДНК-связывающих белках, которая напрямую взаимодействует с молекулой нуклеиновой кислоты. Важнейшая функция домена — это активация или ингибирование транскрипции таргетных генов [84]. В дополнение к регуляции транскрипции домен может индуцировать белок-белковые взаимодействия и связываться с РНК. В белке FoxP3 данный домен представлен наиболее распространенным типом цинкового пальца C2H2, где ион цинка связан координационными связями с двумя аминокислотными остатками гистидина и двумя остатками цитозина (рис. 4 А). В молекуле FoxP3 цинк связан с остатками C^{199} , C^{204} , H^{217} , H^{222} . Присутствие Zn^{2+} имеет решающее значение для стабильности всей структуры, и его отсутствие приводит к структурным и функциональным изменениям домена [76]. К элементам цинкового пальца относят два β -складчатых слоя и одну α -спираль. При связывании с ДНК α -спираль расположена в большой бороздке ДНК, в то время как антипараллельные β -слои и C2–Zn–H2 обращены кнаружи от ДНК [85]. N-концевая часть каждой спирали и предшествующий спирали аминокислотный остаток образуют контакты с тремя соседними парами оснований ДНК. Три пары данных оснований обозначены названием «триплет» на рис. 4.

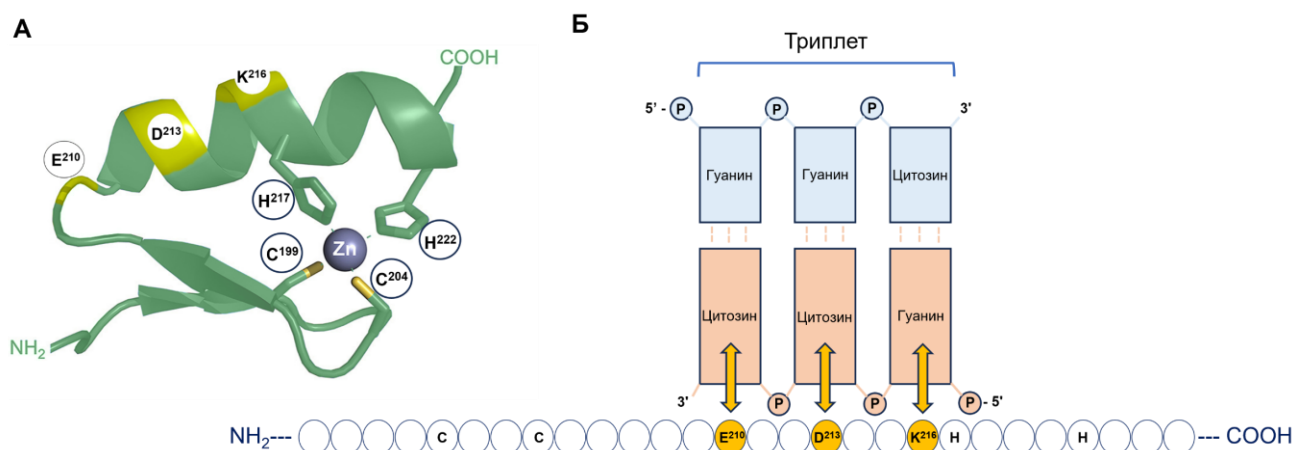


Рисунок 4. Домен цинкового пальца FoxP3 и его взаимодействие с ДНК. (А) Трёхмерная структура расположения Zn^{2+} в домене цинкового пальца. E²¹⁰, D²¹³, K²¹⁶ — аминокислоты в молекуле FoxP3, взаимодействующие с ДНК. (Б) Схематичное изображение взаимодействия E²¹⁰, D²¹³, K²¹⁶ в составе цинкового пальца с ДНК. Пояснения приведены в тексте.

Описаны два вида нумерации аминокислот цинкового пальца, взаимодействующих с ДНК. Первый и наиболее используемый вариант нумерации опирается на структуру α -спирали. Аминокислоты в положениях -1 (предшествует спирали), $+3$ и $+6$ (в составе спирали) взаимодействуют с тремя основаниями одной цепи ДНК. Кроме того, аминокислота в положении $+2$ в составе спирали взаимодействует с первой парой оснований следующего триплета на противоположной цепи ДНК. К недостаткам данной нумерации относят ее неоднозначность при изменении структуры α -спирали [85]. В связи с этим описан второй вид нумерации, где отсчёт производится от первого цинк-координирующего гистидина, которому соответствует позиция 0. Таким образом, аминокислотным остаткам $+6$, $+3$, $+2$ и -1 первого вида нумерации (относительно α -спирали) соответствуют остатки -1 , -4 , -5 и -7 второго вида (относительно первого цинк-координирующего гистидина) [85]. Определяющими для взаимодействия с ДНК являются аминокислоты в положениях -1 , -4 , и -7 ($+6$, $+3$ и -1). При исследовании 156 C2H2 цинковых пальцев было выявлено, что треть из них содержит взаимодействующие с нуклеотидами аминокислоты ВНХ, где В — это лизин или аргинин, Н — это гистидин, и Х — любая аминокислота [85]. В молекуле FoxP3 положению -1 соответствует лизин K²¹⁶, позиции -4 аспарагиновая кислота D²¹³, и положению -7 глутаминовая кислота E²¹⁰ (рис. 4 Б). Объемные и заряженные/полярные аминокислотные остатки в положениях -1 , -4 , и -7 специфичны к гуанину (аргинин, лизин или гистидин), аденину (аспарагин или глутамин) или цитозину (аспарагиновая или глутаминовая кислоты) [85]. Тимин и 5-метилцитозин содержат метильную группу, отходящую от пиримидинового кольца, и распознаются либо через взаимодействия типа C—H $\cdots$ O с глутаминовой кислотой, либо через метилспецифичные Ван-дер-Ваальсовы связи. В том

случае, когда позиции -1 , -4 и -7 , заняты небольшими (глицин, аланин, серин, треонин) или неароматическими гидрофобными аминокислотными остатками, соответствующая последовательность ДНК обычно является вариацией консенсусной последовательности [85]. Это означает, что в данном случае аминокислотные остатки домена цинкового пальца могут соответствовать нескольким различным последовательностям ДНК.

1.2.3.3. Домен лейциновой молнии

Домен лейциновой молнии (англ. *leucine zipper*), кодируемый экзонами 6 – 7, соответствует аминокислотам $^{229}\text{R}\dots\text{L}^{260}$ [80]. В некоторых источниках домен лейциновой молнии объединяют с доменом цинкового пальца под общим названием «coiled-coil». Домен лейциновой молнии опосредует межмолекулярные взаимодействия при образовании гомодимера с другой молекулой FoxP3 или гетеродимера с FoxP1 (рис. 5).

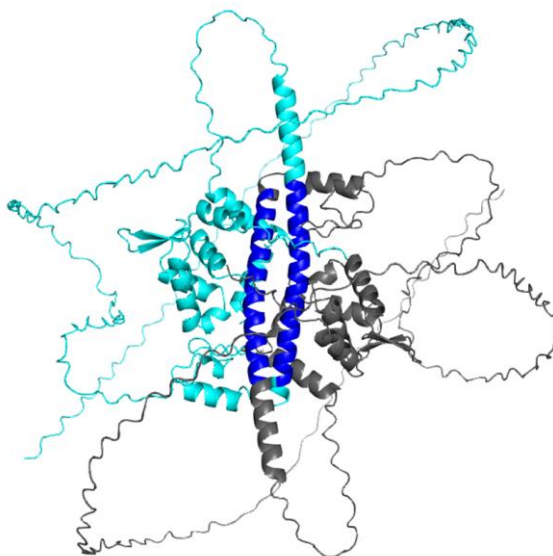


Рисунок 5. Гомодимер FoxP3, мономеры которого соединяются лейциновой молнией.

Каждый мономер выделен серым или голубым цветом. Лейциновая молния обоих мономеров выделена синим цветом. Структура сгенерирована в программе AlphaFold3 и визуализирована в программе PyMOL 2.5.2.

При образовании гомодимера FoxP3 α -спираль домена лейциновой молнии соединяется с антипараллельной α -спиралью идентичного домена второй молекулы FoxP3 [83]. При этом аминокислотные остатки $^{229}\text{R}\dots\text{Q}^{244}$ первой молекулы взаимодействуют с аминокислотными остатками $^{244}\text{Q}\dots\text{H}^{259}$ второй молекулы, и $^{244}\text{Q}\dots\text{H}^{259}$ первой молекулы взаимодействуют с $^{229}\text{R}\dots\text{Q}^{244}$ второй молекулы. Ядро каждой спирали составляют аминокислотные остатки $^{232}\text{C}\dots\text{M}^{256}$ (a-позиция), $^{235}\text{Q}\dots\text{L}^{253}$ (d-позиция), $^{239}\text{V}\dots\text{E}^{249}$ (a-позиция) и $^{242}\text{L}\dots\text{L}^{246}$ (d-позиция) [86]. Структура димера поддерживается гидрофобными и электростатическими взаимодействиями между аминокислотными остатками. Было выявлено, что для формирования

димера необходимо как минимум четыре гептадных повтора ²³²CLLQREM, VQSLEQQ, LVLEKEK и LSAMQAH²⁵⁹ [86]. Структурный анализ кристаллов FoxP3 и электронная микроскопия показали, что димер имеет тенденцию к образованию кластеров путем связывания нескольких α -спиралей из отдельных димеров. Соседние антипараллельные α -спирали двух димеров взаимодействуют с образованием структуры, в центре которой находится аминокислотный остаток A²³⁰ [86].

Мутации аминокислотных остатков, приводящие к нарушению гомодимеризации FoxP3, приводили к нарушению гетеродимеризации FoxP3-FoxP1 [86]. С другой стороны, мутации аминокислотных остатков, сохраняющие гомодимер FoxP3, не нарушали гетеродимеризацию между FoxP3 и FoxP1. Это позволяет предположить, что гетероассоциация FoxP3 и FoxP1 происходит по сходному с гомодимеризацией FoxP3 механизму [86]. Высказывается предположение, что спираль димера лейциновой молнии присуща некая пластичность. Она проявляется в ослаблении связи между ними, предшествующем ассоциации с FoxP1. Примечательно, что FoxP1 конкурирует за взаимодействие с FoxP3, и существование динамического баланса между гомо-, гетеродимером и кластерами FoxP3 оказывает влияние на транскрипционную активность FoxP3 [86].

Данный домен также опосредует взаимодействия между белком FoxP3 и гистонами (в первую очередь, с гистоном H1.5), что приводит к подавлению транскрипции *ИЛ-2* в Т-клетках [76]. Помимо этого, на супрессорную активность Трег влияние оказывают мутации входящих в состав лейциновой молнии лизинов K²⁵⁰ и K²⁵², приводящие к их заменам на аспартат или глутамин [86].

1.2.3.4. Домен Forkhead

Домен вилочной головки (англ. *forkhead*), кодируемый экзонами 9 – 11, соответствует аминокислотам ³³⁷R...R⁴²³ [80]. На С-конце домена расположен сигнал ядерной локализации ⁴¹⁴RKKR⁴¹⁷. Forkhead отвечает за взаимодействие с ДНК и с транскрипционным фактором Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) [83]. С NFAT взаимодействует Wing1 мотив домена Forkhead, аминокислотную последовательность которого составляет ³⁹⁹ESE⁴⁰¹ [87]. Комплекс FoxP3-NFAT необходим для подавления экспрессии ИЛ-2, повышения уровней экспрессии CTLA-4 и CD25 и для функциональной активности Трег [83]. При взаимодействии с ДНК данный домен принимает структуру димера (рис. 6) по принципу «голова к голове» (англ. *Head-to-head, H-H dimerization*) [88]. Это отличает Forkhead белка FoxP3 от FoxP1, 2, и 4, у которых данный домен взаимодействует с ДНК в форме мономера [89]. Димер Forkhead связывается с двумя инвертированными консенсусными последовательностями TGTTTAC одной молекулы ДНК с разрывом между последовательностями размером в четыре нуклеотида [88]. Поддержание структуры димера зависит от предшествующего домену Forkhead участка связывания RunX

(англ. *Runx1-binding region, RBR*), аминокислотные остатки которого формируют гидрофобную петлю ($^{321}\text{F}\dots\text{M}^{336}$). Гидрофобная структура RBR-RBR в димере служит местом связывания RunX [88].

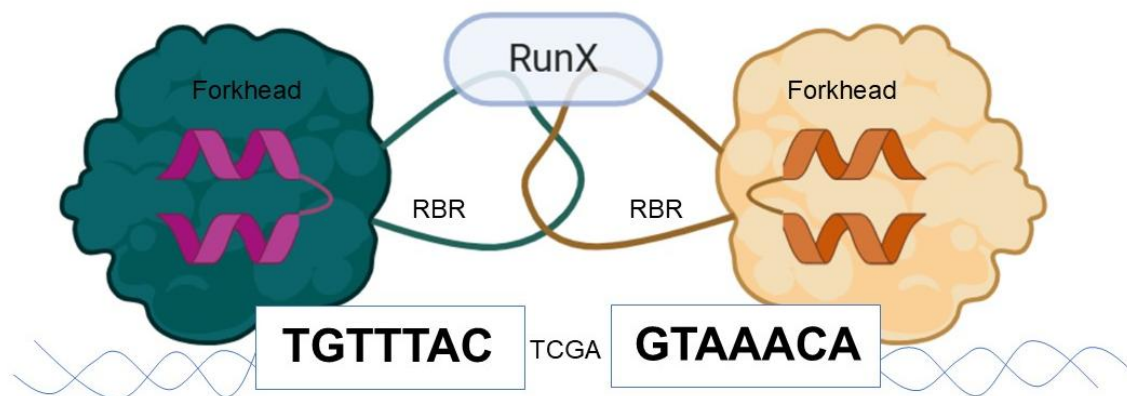


Рисунок 6. Взаимодействие домена Forkhead с ДНК и RunX. Домен Forkhead взаимодействует с ДНК в форме димера. Димер связывается с двумя инвертированными консенсусными последовательностями TGT TTAC одной молекулы ДНК с разрывом между последовательностями размером в четыре нуклеотида. Структура RBR-RBR в димере служит местом связывания RunX. Изображение было создано с использованием программы BioRender.

Взаимодействие FoxP3 с Runx1 влияет на супрессорную функцию Трег, т.к. комплекс FoxP3-Runx1 связывается с геном *ИЛ-2* и подавляет его экспрессию [83]. Считается, что Н-Н димер RBR-forkhead образует первичный контакт с ДНК, тогда как домены цинкового пальца образуют вторичные контакты с близлежащими участками ДНК [88]. Отсутствие RBR приводит к димеризации Forkhead по принципу «обмена доменами» (англ. *domain-swapping*) (PDB 4WK8). Данный тип димера FoxP3 не способен эффективно связываться с ДНК и Runx1 [88]. Интересно, что возникающая при IPЕХ-синдроме мутация R337Q способствует domain-swapping димеризации FoxP3, что нарушает связывание белком ДНК и Runx1, тем самым изменяя транскрипционную активность FoxP3. В связи с этим, Н-Н димер FoxP3 считают более физиологичным, транскрипционно активным, ассоциированным с поддержанием иммунного гомеостаза, тогда как domain-swapped димер является транскрипционно неактивным, ассоциированным с потерей иммунного гомеостаза [88].

Взаимодействия доменов FoxP3 с белками-партнерами приведены в таблице 3. Для идентифицированных сайтов связывания указаны номера аминокислот.

Таблица 3. Домены FoxP3, взаимодействующие с молекулами-партнёрами.

Домен или сайт в составе домена	Молекула-партнёр	Результат взаимодействия
<i>N-концевая репрессорная область</i>		
⁹² LQALL ⁹⁶	RORα и RORγt	Подавление транскрипции ИЛ-17 и ИЛ-22
¹⁰⁶ L...S ¹⁹⁰	TIP60 и HDAC7	Подавление транскрипции ИЛ-2
¹⁴⁸ G...V ¹⁹⁸	Eos	Подавление транскрипции ИЛ-2 и ИИФ-γ
<i>Цинковый палец</i>		
Аминокислоты E ²¹⁰ , D ²¹³ , K ²¹⁶	ДНК	Регуляция транскрипции таргетных генов FoxP3
<i>Лейциновая молния</i>	FoxP3	Образование гомодимера
	FoxP1	Образование гетеродимера
	Гистон H1.5	Подавление транскрипции ИЛ-2
<i>Forkhead</i>	ДНК	Регуляция транскрипции таргетных генов FoxP3
	Домен Forkhead	Образование димера для взаимодействия с ДНК и RunX
	RunX	Подавление транскрипции гена ИЛ-2
	NFAT	Подавление экспрессии ИЛ-2, повышение уровней экспрессии CTLA-4 и CD25

1.3. Виды альтернативного сплайсинга

В процессе созревания пре-мРНК подвергается стадийному созреванию – процессингу. К процессингу пре-мРНК относят присоединение кэп-структуры к 5'-концу молекулы (кэпирование), присоединение нескольких десятков остатков аденина к 3'-концу (полиаденилирование) и сплайсинг. Сплайсинг (от англ. splice – сращивание) — это процесс удаление интронов и лигирования экзонов пре-мРНК. АС — это процесс избирательного включения (инсерции) или исключения (делеции) кодирующих участков в конечный транскрипт мРНК. Известно, что пре-мРНК FoxP3 подвергается процессу АС. В ходе экспрессии гена при реализации АС на основе одного первичного транскрипта (пре-мРНК) происходит образование нескольких конечных транскриптов т.е. сплайс-вариантов. В результате АС одни экзоны включаются в конечный продукт, тогда как другие исключаются (удаляются, делетируются). Экзоны соединяются в различных комбинациях, что и приводит к формированию различных сплайс-вариантов.

Большинство экзонов генов человека являются конститутивными, т. е. в норме присутствующими во всех сплайс-вариантах. В случае белок-кодирующих генов белковые формы сплайс-вариантов могут содержать отличия в своей аминокислотной последовательности и, следовательно, характеризоваться различиями в биологических функциях. При делеции в результате АС функционального домена или сайта у белковой формы сплайс-варианта может изменяться способность к взаимодействию с лигандами, партнёрными белками и нуклеиновыми кислотами, что приводит к перестройке клеточных молекулярных сигнальных путей [90]. В случае белков, обладающих каталитической активностью, АС может приводить к появлению белковых форм, характеризующихся усиленной или ослабленной каталитической активностью, или полной её потерей. Кроме того, в результате АС возможно изменение внутриклеточной локализации белка [91]. Последствием АС также может являться образование не подлежащего трансляции мРНК-транскрипта, которые подвергаются деградации системой нонсенс-опосредованного распада (англ. *nonsense-mediated mRNA decay, NMD*) [92]. NMD избирательно подвергает деградации транскрипты, содержащие, как правило, нонсенс-мутации и мутации сдвига рамки считывания. Таким образом, АС выступает в роли механизма, обеспечивающего многообразие белков и их функций, а также способствующего изменению интерактома.

На данный момент известны следующие виды АС: пропуск экзона, взаимоисключающие экзоны, альтернативный донорный/акцепторный сайт, удержание интрона, альтернативный промотор и альтернативное полиаденилирование (рис. 7) [93].

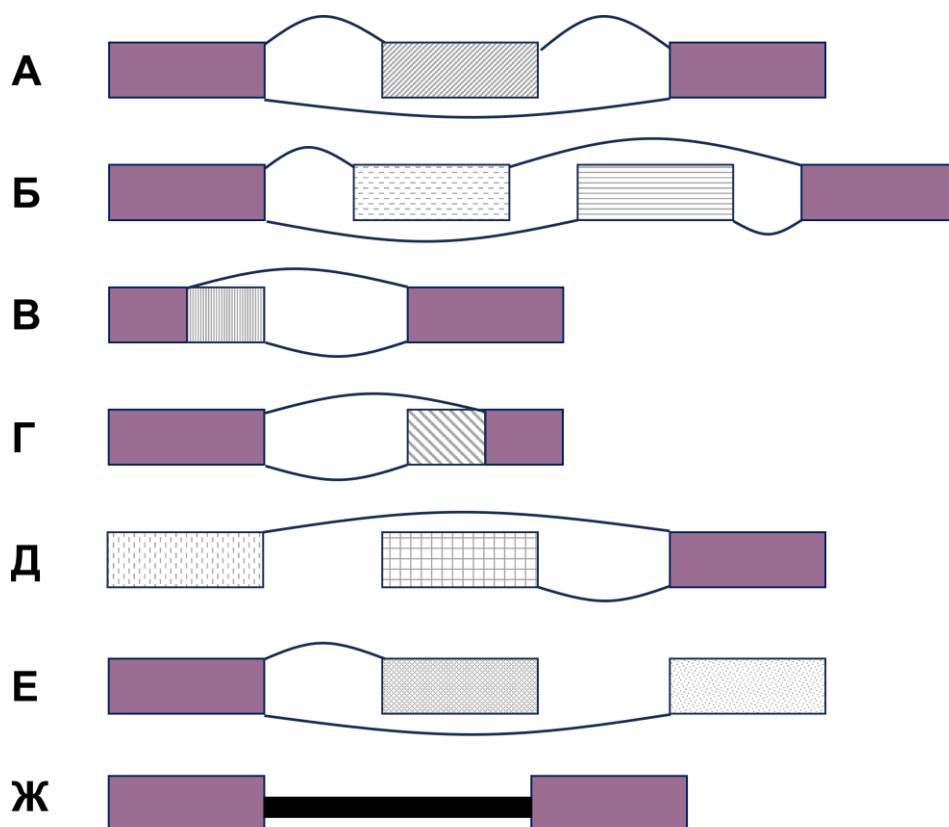


Рисунок 7. Виды альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Конститутивные экзоны обозначены в виде фиолетовых прямоугольников, альтернативные в виде прямоугольников с серой штриховкой. (А) Включение/пропуск экзона. (Б) Взаимоисключающие экзоны. (В) Альтернативный донорный (5') сайт. (Г) Альтернативный акцепторный (3') сайт. (Д) Альтернативный промотор. (Е) Альтернативное полиаденилирование. (Ж) Удержание интрона.

Самым распространенным видом АС пре-мРНК человека является делеция/включение экзона (рис. 7 А). В данном случае экзон вырезается из зрелого транскрипта мРНК или включается в него. При прохождении АС по типу взаимоисключающих экзонов из нескольких альтернативных экзонов в зрелую мРНК включается только один (рис. 7 Б). В случае альтернативного 5'- сайта или 3'- сайта (рис. 7 В, Г), изменяется длина кодирующего участка мРНК [94]. По этому же принципу в зрелый транскрипт мРНК может включаться альтернативный участок начала трансляции (старт-кодон) или альтернативный или участок окончания трансляции (рис. 7 Д, Е). АС по типу удержания интрона (рис. 7 Ж) редко встречается у млекопитающих. Часто сохраненный в транскрипте изначально некодирующий фрагмент может кодировать стоп-кодон или сдвигать рамку считывания нижележащей последовательности [95].

1.4. Механизм альтернативного сплайсинга

Включение в зрелый транскрипт мРНК альтернативного экзона определяется составом и особенностями функционирования аппарата сплайсинга. Вырезание интронов из пре-мРНК и соединение экзонов регулируется специальными последовательностями – сайтами сплайсинга, расположенными на стыках экзонов и интронов. Динуклеотид гуанин-урацил (GU), расположенный на 5'-конце интрона является консервативной последовательностью 5'-сайта сплайсинга. На 3'-конце интрона располагаются три консервативных последовательности: точка ветвления (A), полипиримидиновый ряд (PolyP) и динуклеотид аденин-гуанин (AG) [94]. Сплайсинг осуществляется мультибелковым комплексом сплайсосомой, которая состоит из шести основных субъединиц – малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП: U1, U2, U2AF, U4, U5 и U6) и около 300 других белков [96]. Первым этапом функционирования сплайсосомы является взаимодействие ее субъединиц с сайтами сплайсинга: U1 связывается с 5'-сайтом, U2 связывается с точкой ветвления, субъединица U2AF65 связывается с полипиримидиновым рядом, а субъединица U2AF35 взаимодействует с последовательностью AG 3'-сайта сплайсинга (рис. 8).

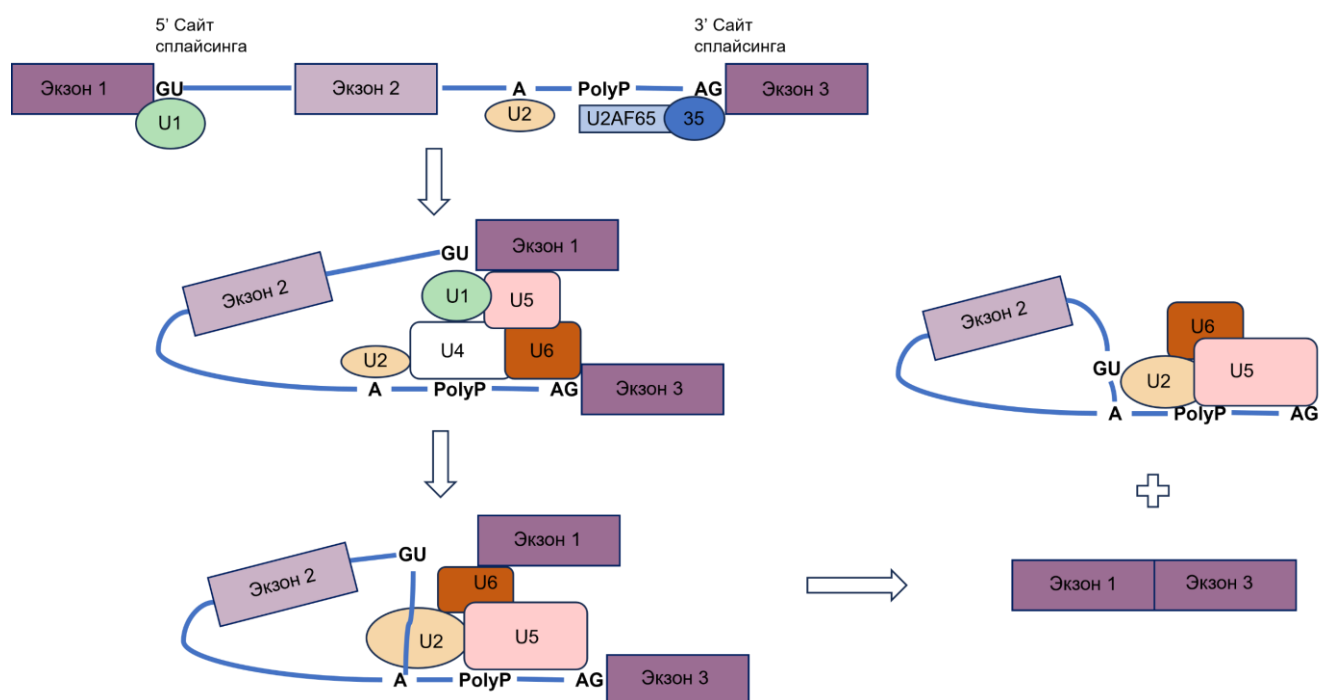


Рисунок 8. Функционирование сплайсосомы. Первым этапом в сборке сплайсосомы является взаимодействие ее субъединиц с консенсусными последовательностями 5' и 3' сайтов сплайсинга. U1 взаимодействует с GU, U2 с точкой ветвления, субъединицы U2AF с PolyP и AG. Вторым этапом присоединяются субъединицы U4, U5 и U6, что приводит к сближению 5'- и 3'-сайтов сплайсинга. На третьем этапе в ходе реакции перэтерификации аденозин точки ветвления связывается с гуанидином последовательности GU, что приводит к удалению интронов и лигированию экзонов.

Вторым шагом является присоединение субъединиц U4, U5 и U6 к U1 и U2AF, что приводит к сближению 5'- и 3'- сайтов сплайсинга. На третьей стадии интрон удаляется в два этапа. На первом этапе происходит реакция переэтерификации, в ходе которой аденозин точки ветвления связывается с гуанидином последовательности GU 5'- сайта. На втором этапе экзоны лигируются, а нуклеотиды разветвленного интрона удаляются в форме лассо [97].

На АС влияние оказывают цис-действующие элементы, представляющие собой расположенные на пре-мРНК последовательности, содержащие сайты связывания регуляторных транс-факторов. К цис-элементам относят экзонные энхансеры сплайсинга (англ. *exonic splicing enhancers* - ESE), экзонные сайленсеры сплайсинга (англ. *exonic splicing silencers* - ESS), интронные энхансеры сплайсинга (англ. *intronic splicing enhancers* - ISE) и интронные сайленсеры сплайсинга (англ. *intronic splicing silencers* - ISS) [93]. Другими, чаще всего белковыми молекулами, регулирующими сплайсинг, являются транс-действующие факторы. К ним относят РНК-связывающие белки (англ. *RNA-binding proteins* – RBP), среди которых можно выделить белки, богатые серином/аргинином (SR-белки), и гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины (англ. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* - hnRNP). SR-белки взаимодействуют с другими факторами сплайсинга, а также опосредуют взаимодействие между мРНК и сплайс-сайтами, к примеру между U1 и 5'- сплайс-сайтом, между U2 и 3'-сплайс-сайтом. ESE и ISE в основном привлекают SR-белки, действующие как активаторы сплайсинга, в то время как ESS и ISS обычно распознаются белками hnRNP, которые действуют как репрессоры сплайсинга [93].

Экзонные и интронные энхансеры/сайленсеры являются перспективными мишенями для антисмысловой генной терапии с применением переключающих сплайсинг олигонуклеотидов.

1.5. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды, их механизм действия и химические модификации

Антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой синтетические одноцепочечные последовательности нуклеотидов, которые могут связываться с пре-мРНК и/или мРНК по принципу комплементарности. Антисмысловые олигонуклеотиды, которые нацелены на модуляцию сплайсинга, называют переключающими сплайсинг олигонуклеотидами (ПСО) [98]. Обычно их длина составляет 15 – 40 нуклеотидов. ПСО предназначены для создания стерического блока, препятствующего связыванию факторов сплайсинга с пре-мРНК [98]. Связывание ПСО с целевой РНК изменяет распознавание сайтов сплайсинга сплайсосомой или регулирующими сплайсинг белков. Так, ПСО, который соединяется с последовательностью энхансера сплайсинга на цепи пре-мРНК, создает стерический блок для его связывания с соответствующим ему стимулирующим сплайсинг белком. Это, в свою очередь, приводит к делеции экзона (рис. 9). ПСО, который связывается с последовательностью сайленсера

сплайсинга на цепи пре-мРНК, создает стерический блок для его связывания с соответствующим ему ингибирующим сплайсинг белком. Это приводит к включению (инсерции) экзона.

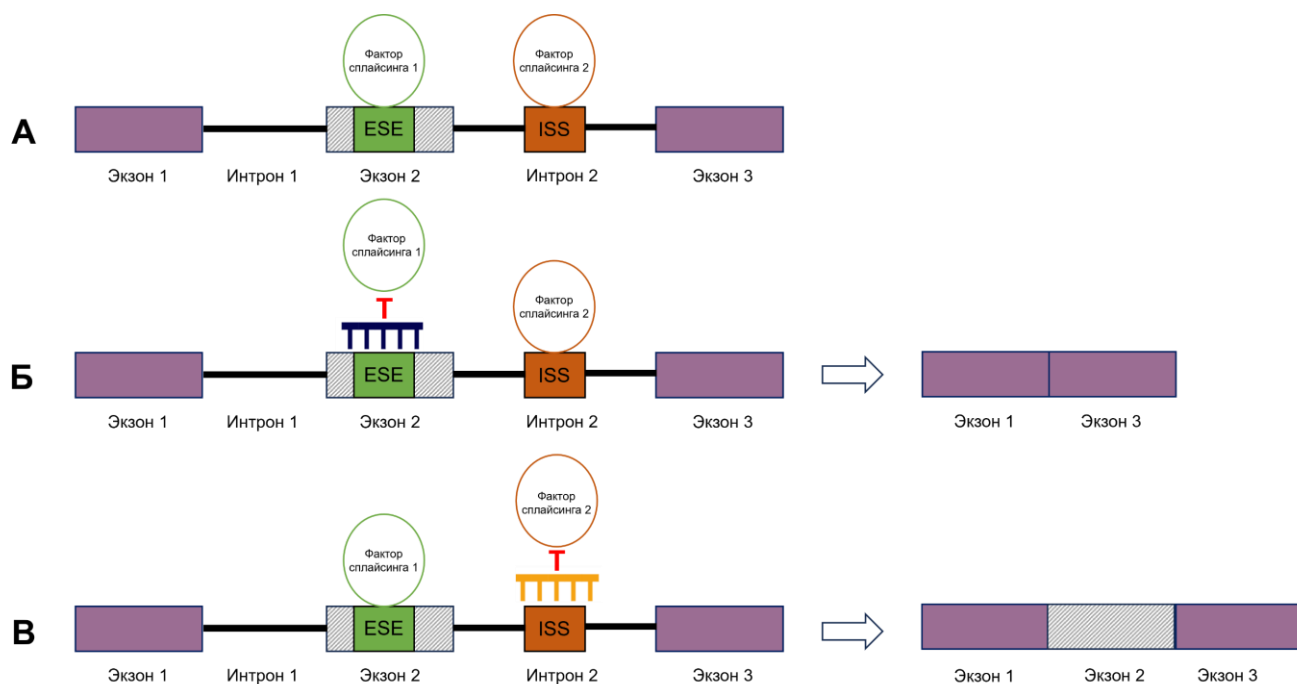


Рисунок 9. Механизм действия переключающих сплайсинг олигонуклеотидов. (А)

Распознавание цис-регуляторных последовательностей пре-мРНК регулирующими сплайсинг белками. Взаимодействие ESE со специфичным регулирующим сплайсинг белком (фактором сплайсинга 1) вызывает включение экзона. Взаимодействие ISS со специфичным регулирующим сплайсинг белком (фактором сплайсинга 2) вызывает делецию экзона. (Б) Взаимодействие ПСО с ESE препятствует связыванию фактора сплайсинга 1 со специфичной нуклеотидной последовательностью, что приводит к делеции экзона. (В) Взаимодействие ПСО с ISS препятствует взаимодействию фактора сплайсинга 2 со специфичной нуклеотидной последовательностью, что приводит к включению экзона в конечный транскрипт мРНК.

В качестве примера можно привести индуцированный ПСО пропуск экзона, содержащий стоп-кодон, вызванный мутацией при мышечной дистрофии Дюшенна [99]. Подход с использованием ПСО применяется для восстановления синтеза функциональной формы белка дистрофина. Так, взаимодействие ПСО с сайленсером ISS-N1 приводит к включению экзона 7 в мРНК SNM2, что способствует синтезу полноразмерной функциональной формы белка SNM (Survival Motor Neuron) при спинальной мышечной атрофии [17]. На данный момент одобрены 5 терапевтических препаратов на основе ПСО (этеплирсен, голодирсен, касимерсен, вилтоларсен – для лечения миодистрофии Дюшенна; нусинерсен – для лечения спинальной мышечной атрофии) [16].

Стоит учитывать, что использование химически немодифицированных ПСО приводит к возникновению нецелевых (off-target) эффектов из-за понижения специфичности в результате воздействия эндо- и экзонуклеаз. В связи с этим активно используются различные виды химической модификации ПСО [100]. Модификации могут затрагивать фосфатный остов, сахарный компонент, азотистое основание как по отдельности, так и комбинированно (рис. 10).

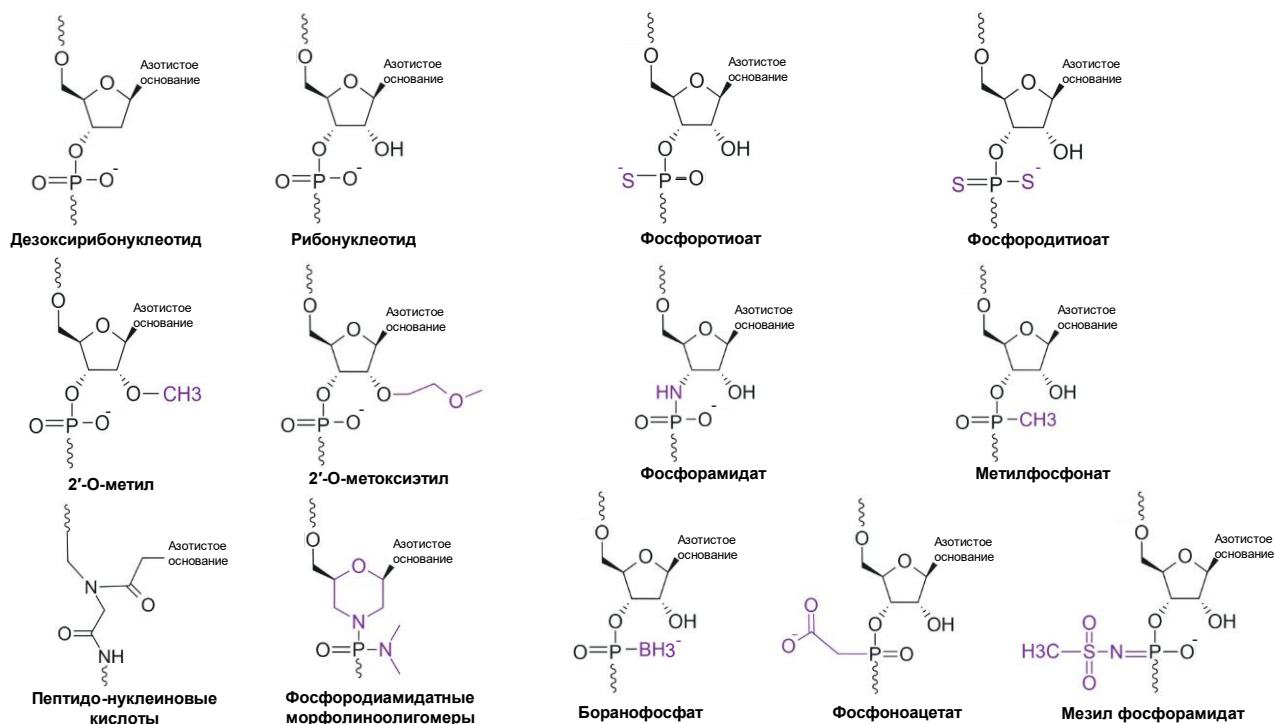


Рисунок 10. Химические модификации ПСО. Модификации фосфодиэфирной связи и сахарного компонента выделены фиолетовым цветом. Изображение было создано с использованием программы Marvin.

Учитывая подверженность фосфодиэфирной связи действию нуклеаз, модификации данной области значительно повышают устойчивость ПСО к деградации. К модификациям относят фосфоротиоат, фосфородитиоат, N3'→P5' фосфорамидат, метилфосфонат, боранофосфат, фосфоноацетат и мезил фосфорамидат. Наиболее часто применяющейся модификацией является фосфоротиоатная замена [100], где атом кислорода фосфатной группы заменяется атомом серы. Данная замена способствует устойчивости к действию нуклеаз и изменению полярности фосфодиэфирной связи. Изменение полярности влечёт за собой изменение липофильности и повышение способности к связыванию с белками плазмы, что приводит к улучшению распределения ПСО в тканях и поглощения ПСО клетками. Интернализация модифицированных ПСО упрощается также за счёт повышенного связывания с белками, сопряженными с клеточной поверхностью (к примеру, с сквэнджер рецепторами)

[101]. Дальнейшее взаимодействие с внутриклеточными белками (нуклеолином) способствует перемещению ПСО в ядро, что необходимо для взаимодействия с расположенными в ядре таргетными пре-мРНК [101]. При этом недостатками фосфоротиоатной-модификации является снижение способности ПСО к связыванию с пре-мРНК, а также токсичность, вызванная неспецифическим связыванием с белками [15].

Использование модификаций сахарного компонента также позволяет добиться улучшения описанных недостатков [16]. Произведено множество модификаций пентозы, среди которых наиболее распространенными являются замены атома водорода или гидроксильной группы в 2'-положении дезоксирибозо/рибозного фрагмента группами 2'-О-метил и 2'-метоксиэтил [102]. Данные модификации также повышают устойчивость ПСО к нуклеазам, улучшают способность к связыванию с целевой РНК и за счёт уменьшения неспецифического связывания с белками делают ПСО менее токсичными [102].

Кроме того, известны аналогичные природным аналоги соединения, в которых модификации затрагивают как фосфатный, так и сахарный компоненты. К ним относятся фосфородиамидатные морфолиноолигомеры и пептидо-нуклеиновые кислоты [103]. В морфоолигомерах рибоза заменена шестичленным морфолиновым гетероциклом, и вместо связей фосфора с кислородом используются фосфородиамидатные связи [16]. В пептидо-нуклеиновых кислотах весь сахарофосфатный остов заменен псевдопептидным полимером [104]. Несмотря на существенные отличия модифицированных кислот от природных нуклеиновых кислот, их способность связываться с целевой РНК не снижена по сравнению с немодифицированными ПСО [16]. Помимо этого, данные соединения гораздо более устойчивы к нуклеазам. Недостатком молекул данных групп является меньшее сродство к белкам плазмы, что способствует их быстрому выведению [102]. Для их эффективного действия *in vivo* необходимы высокие дозы или частое введение, что может увеличить риск побочных эффектов.

Помимо изменения структуры одного или нескольких фрагментов нуклеотида, оптимизация может быть достигнута путём конъюгации ПСО с различными биомолекулами, с такими как холестерин, пептиды, антитела и аптамеры, приводящими к улучшению тканевого распределения ПСО и усилению их захвата клетками [16].

ПСО для терапии спинальной мышечной атрофии и миодистрофии Дюшенна стали применяться в 2016 году. Клиническое применение в рамках персонализированной медицины нашли препараты на основе ПСО для лечения атаксии-телеангиэктазии и нейронального цероидного липофусциноза 7 типа [104]. ПСО Миласен для лечения нейронального цероидного липофусциноза 7 был разработан для пациента индивидуально и доказал свою эффективность [105]. В пилотном клиническом исследовании применение ПСО Атипексен для лечения ребенка с диагностированной атаксией-телеангиэктазией показало хорошую переносимость и отсутствие

серьезных побочных эффектов в ходе трехлетнего наблюдения [15]. На данный момент продолжаются разработка и проведение клинических испытаний ПСО для ряда моногенных и немноногенных заболеваний, таких как аутоиммунные и онкологические [104].

1.6. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК FoxP3

На данный момент у человека известны четыре основных сплайс-варианта пре-мРНК FoxP3. Двумя преимущественно экспрессирующимися в нормальных Трег периферической крови человека сплайс-вариантами являются полноразмерный, содержащий все 11 кодирующих экзонов (FoxP3FL, NM_014009.4), и укороченный сплайс-вариант с делецией экзона 2 (FoxP3Δ2, NM_001114377.2). Минорными вариантами экспрессии в нормальных Трег являются вариант с делецией экзона 7 (FoxP3Δ7) и сплайс-вариант с делециями обоих экзонов 2 и 7 (FoxP3Δ2Δ7). Хотя вариант FoxP3Δ2Δ7 не идентифицирован однозначно на белковом уровне, попытки изучения его свойств предприняты в ряде работ [106,107].

Кроме данных четырех вариантов в литературе имеется ограниченная информация об обнаружении сплайс-варианта с делециями кодирующих экзонов 2 и 3 в опухолевых клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека (линии Hep3B и 97H) [108], меланомы (линия LM-Mel-34) [109] и аденокарциномы молочной железы (линии MCF7, T47D, BT20) [110]. Примечательно, что в указанных работах сплайс-вариант с делециями экзонов 2 и 3 обозначается как FoxP3Δ3Δ4, поскольку в нумерации учитывается не кодирующий экзон (-1). В Трег человека данный сплайс-вариант, однако, не идентифицирован [111].

Учитывая сходство архитектуры гена *FoxP3* у человека и мыши, возникали предположения о наличии АС и у мышей [7]. Однако оказалось, что АС FoxP3 характеризуется видовой специфичностью, и на данный момент не известно ни одной животной модели, у которой была бы обнаружена экспрессия характерных для человека сплайс-вариантов FoxP3. Это ограничивает изучение механизма и биологических эффектов АС FoxP3. Точный механизм АС FoxP3 остается не изученным в полной мере. Известно, что распознавание сайтов сплайсинга сплайсосомой регулируется энхансерами и сайленсерами сплайсинга. Так, пре-мРНК FoxP3 в области экзона 2 содержит две последовательности ACAGG, с которыми связывается SR-белок SRp40. Данное взаимодействие приводит к ингибированию включения, т.е. к делеции, второго экзона [112]. В области интрона 2 расположена последовательность GGGAGGA, с которой связывается SR-белок SF2/ASF. Это приводит к ингибированию делеции, т.е. к включению, экзона 2 в мРНК. Что касается экзона 7, пре-мРНК в области экзона 7 содержит последовательности UGGAG и AAGGA. С первой из них взаимодействует SR-белок SC35, а со второй SR-белок SRp75. Взаимодействие с SR-белками приводит к ингибированию включения, т.е. к делеции, экзона 7 в мРНК. В области интрона 7 последовательность GGGAGGA

связывается с SF2/ASF, что приводит к ингибированию делеции, т.е. к включению, экзона 7 в зрелую мРНК [112].

К факторам, влияющим на АС FoxP3, относят стимуляцию ТКР, локализацию клеток, особенности метаболизма и цитокин-опосредованный сигналинг [113]. В тимоцитах человека преимущественно экспрессируется FoxP3FL, и в ТКР-стимулированных наивных CD4⁺ Т-клетках экспрессия FoxP3FL превышает индукцию экспрессии FoxP3Δ2 [114]. Также описано повышение соотношения FoxP3FL: FoxP3Δ2 в тимусе по сравнению с образцами периферической крови [114]. Данные наблюдения свидетельствуют о том, что при индукции тимусных Трег превалирующим сплайс-вариантом является FoxP3FL, тогда как развитие Трег за пределами тимуса сопряжено с повышением частоты возникновения АС. Кроме того, индукция Трег в среде, ингибирующей гликолиз, приводит к повышению экспрессии FoxP3Δ2 [115]. Индуцированные таким образом Трег характеризовались понижением уровней экспрессии маркёров CD25, PD-1, CD71 и CTLA-4 и понижением их супрессорной функции [118]. Описано влияние провоспалительного ИЛ-1β на Трег, приводящее к делеции экзона 7 *in vitro* [116]. Это демонстрирует значимость провоспалительных цитокинов в индукции экспрессии FoxP3Δ7. Помимо этого, было описано влияние РНК-хеликазы DDX39B (DEXD/H-Box Polypeptide 39B) на вырезание интронов FoxP3 [117]. Отсутствие в Трег DDX39B приводило к усиленному удержанию интронов 2, 4, 6, 7, 9 и 11. «Чувствительные» к наличию DDX39B интроны характеризовались особенностью в структуре полипиримидинового ряда. В ряду наблюдали пониженное содержание урацила и повышенное содержание цитозина. Это отличает данные интроны от структуры полипиримидинового ряда в других генах на X-хромосоме и от других интронов человека, подвергающихся сплайсингу основной (мажорной, зависимой от U2 snRNP) сплайсосомой, в полипиримидиновом ряду которых преобладает урацил [96]. Было показано, что DDX39B необходим для вырезания интронов, содержащих богатые цитозином полипиримидиновые ряды. DDX39B связывается с взаимодействующим с полипиримидиновым рядом U2AF2, что в дальнейшем позволяет U2 связаться с точкой ветвления для формирования пре-сплайсосомы. Этот процесс является зависимым от АТФазной активности. U2AF2 имеет большее сродство к полипиримидиновому ряду, богатому урацилом [96]. Предполагают, что DDX39B-опосредованное взаимодействие U2 с точкой ветвления повышает сродство U2AF2 к богатым цитозином полипиримидиновым рядам. Учитывая, что для формирования пре-сплайсосомы необходима АТФазная активность DDX39B, удержание интронов при отсутствии DDX39B можно объяснить недостатком АТФазной активности [117].

1.7. Белковые формы сплайс-вариантов FoxP3

В 2005 году методом вестерн-блоттинга в CD4⁺CD25⁺ Трег были детектированы белковые формы полноразмерного сплайс-варианта FoxP3FL (NP_054728.2) и сплайс-варианта с делецией второго экзона FoxP3Δ2 (NP_001107849.1) [8]. Белковая форма сплайс-варианта с делецией обоих экзонов FoxP3Δ2Δ7 была предположительно идентифицирована в CD4⁺CD25⁺ Трег в 2009 году [107]. В 2010 году в CD4⁺CD25⁺ Трег детектировали белковую форму FoxP3Δ7 [118]. Белковым формам FoxP3Δ2Δ7 и FoxP3Δ7 до сих пор не присвоены номера в Protein Data Base (таблица 4). Как было описано ранее, экзон 2 кодирует часть репрессорной области с высоким содержанием пролина, а экзон 7 – часть домена лейциновой молнии (рис. 11).

Таблица 4. Белковые формы сплайс-вариантов FoxP3.

Белковая форма	Обозначение в NCBI Protein database	Обозначение в UniProt	Количество аминокислот	Молекулярная масса, кДа
FoxP3FL	NP_054728.2	Q9BZS1-1	431	47,2
FoxP3Δ2	NP_001107849.1	Q9BZS1-2	396	43,4
FoxP3Δ7	-	Q9BZS1-4	404	44,4
FoxP3Δ2Δ7	-	-	369	40,6

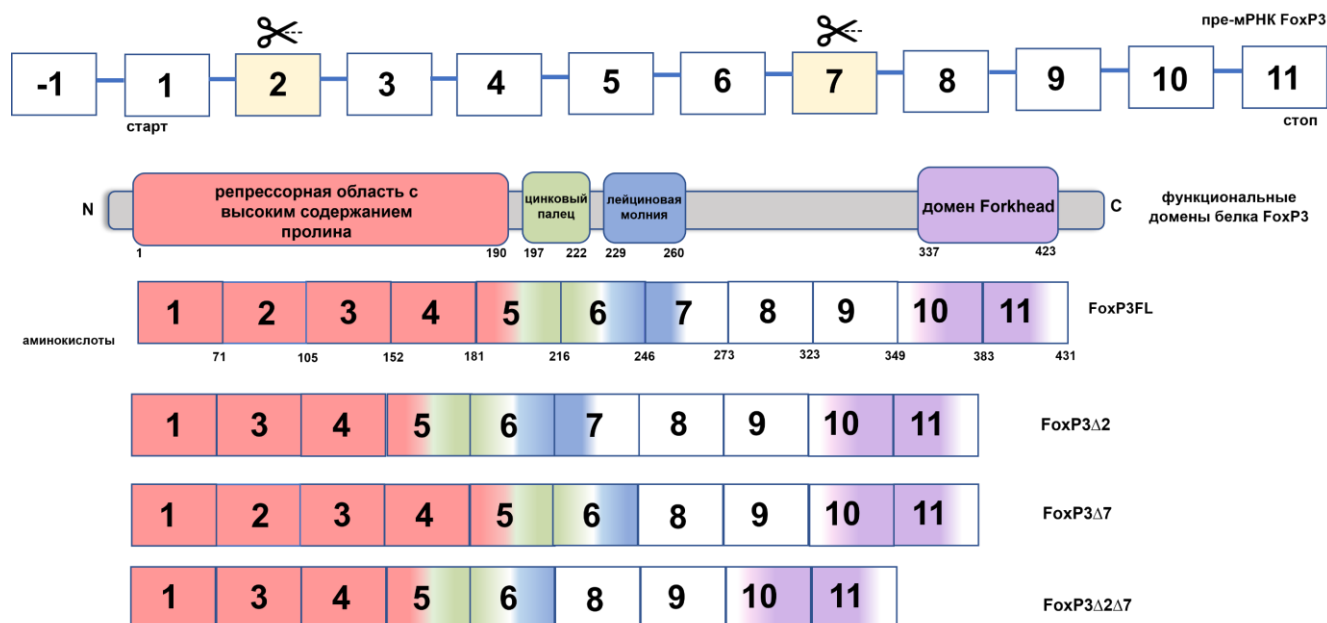


Рисунок 11. Белковые формы сплайс-вариантов FoxP3. Схематично приведено соответствие доменов белковых форм FoxP3 кодирующим им экзонам. При делеции второго экзона отсутствует часть N-концевой репрессорной области. При делеции седьмого экзона отсутствует часть домена лейциновой молнии.

Эти особенности обуславливают функциональные различия, характерные для белковых форм сплайс-вариантов FoxP3.

С частью N-концевого домена, кодируемого экзоном 2, связываются ROR γ t, ROR α и РНК-связывающий белок гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин F (hnRNPF). С Tх17-ассоциированными транскрипционными факторами ROR α и ROR γ t связывание происходит через мотив ⁹²LxxLL⁹⁶. Данное взаимодействие приводит к снижению экспрессии Tх17-ассоциированных генов *ИЛ-17* и *ИЛ-22*. hnRNPF контролирует АС пре-мРНК нескольких генов, одним из которых является *BCL-X*. Описаны два сплайс-варианта BCL-X: BCL-XS и BCL-XL, из которых BCL-XS связан с индукцией, а BCL-XL с ингибированием апоптоза [119]. hnRNPF способствует экспрессии проапоптотического сплайс-варианта BCL-XS. Взаимодействие FoxP3 с hnRNPF приводит к понижению соотношения BCL-XS/BCL-XL в клетках [119] и, следовательно, к торможению апоптотических процессов в Трег. Однако было показано, что сверхэкспрессия hnRNPF в дифференцированных *in vitro* Трег мыши снижает их супрессорную функцию [119].

В дополнение к сайтам связывания с белками аминокислотные последовательности в составе FoxP3 определяют его субклеточную локализацию. FoxP3 преимущественно локализуется в ядре, однако возможно перемещение белка в цитоплазму. Аминокислоты ⁴¹⁴RKKR⁴¹⁷ в домене Forkhead, кодируемом экзоном 11, образуют сигнал ядерного импорта (англ. *nuclear localization signal* - *NLS*), а на границах экзонов 1/2 и 6/7, соответствующих аминокислотам ⁶⁸QLQLPTLPL⁷⁶ и ²³⁹VQSLEQQLVL²⁴⁸, находятся сигналы ядерного экспорта (англ. *nuclear export signal* - *NES*) [113]. Следовательно, сигналы ядерного экспорта отсутствуют у FoxP3 Δ 2, FoxP3 Δ 7 и FoxP3 Δ 2 Δ 7, что приводит к различиям в субклеточной локализации белковых форм сплайс-вариантов [113]. FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 7 демонстрируют повышенную тенденцию к ядерной локализации по сравнению с FoxP3FL, в то время как FoxP3 Δ 2 Δ 7 почти полностью локализуется в ядре. Субклеточная локализация оказывает влияние на транскрипционную активность FoxP3. Избирательная локализация FoxP3 в ядре приводила к индукции экспрессии Трег-ассоциированных генов *CD25*, *CCR4*, *гранзима В* (англ. *granzyme В* – *GZMB*) и ингибированию экспрессии генов провоспалительных цитокинов *ИЛ-2*, *ИЛ-4* и *лимфотоксина- α* (*ЛТ- α* , ранее известный как *TNF- β*) [120]. Таким образом, ядерная локализация способствует поддержанию фенотипа Трег. Можно сделать предположение, что перемещение FoxP3 в цитоплазму необходимо для его специфичных взаимодействий с белками-партнерами в участках, кодируемых экзонами 2 и 7. В качестве предполагаемой причины наличия ядерно-цитоплазматического транспорта у FoxP3 рассматривают именно АС. Примечательно, что были выявлены различия в локализации белковой формы FoxP3FL в CD4⁺CD25⁻ Т-клетках и Трег, несмотря на присутствие у FoxP3FL обоих NES [120]. Данные наблюдения свидетельствуют о

существовании дополнительных клеточно-специфичных механизмов, регулирующих субклеточное распределение FoxP3, которые на данный момент не изучены в полной мере. Несмотря на то, что функциональные свойства локализованного в цитоплазме FoxP3 остаются неизученными, одним из последствий ядерно-цитоплазматического транспорта может являться инактивация транскрипционной активности FoxP3. Транскрипционная инактивация путем ядерно-цитоплазматической релокализации была описана для других членов семейства факторов транскрипции Forkhead [121].

Для выявления фенотипических и функциональных различий между белковыми формами FoxP3FL и FoxP3Δ2 CD4⁺ Т-клетки человека трансдуцировали FoxP3FL и/или FoxP3Δ2. Во всех случаях трансдукция привела к приобретению CD4⁺ Т-лимфоцитами фенотипа Трег (CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺) и способности ингибировать пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов *in vitro* [122]. Примечательно, что клетки, экспрессирующие как FoxP3FL, так и FoxP3Δ2, подавляли пролиферацию таргетных клеток. При этом фенотипически Трег, экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3Δ2, характеризовались более высоким уровнем экспрессии GARP – маркера супрессорной активности Трег. Применительно к атеросклерозу высказывалось предположение о том, что FoxP3Δ2-индуцированная экспрессия GARP способствует взаимодействию TGF-β с поверхностью Трег и приводит к стабилизации атеросклеротической бляшки [122]. В другом исследовании была использована система CRISPR/Cas9 для нокаута эндогенного FoxP3 в CD4⁺ Т-клетках человека (FoxP3KO^{GFP} CD4⁺ Т-клетки), после чего клетки трансдуцировали FoxP3FL, FoxP3Δ2 и обеими конструкциями [123]. Одновременная трансдукция FoxP3FL и FoxP3Δ2 привела к более активному развитию FoxP3KO^{GFP}CD4⁺ Т-клетками фенотипа Трег и появлению супрессорной активности *in vitro*, по сравнению с клетками, трансдуцированными FoxP3FL или FoxP3Δ2 по отдельности [123]. Различия эффектов между FoxP3FL и FoxP3Δ2 также выявляли на мышинных моделях. Несмотря на то, что у мышей естественным образом не экспрессируется FoxP3Δ2, кодируемая экзон 2 аминокислотная последовательность у мыши на 94% гомологична таковой у человека. Используя модель, где экзон 2 гена *Foxp3* мыши был вырезан системой CRISPR/Cas9, было показано, что избирательная делеция второго экзона приводит к понижению уровней экспрессии CD25 и CTLA-4. Также делеция второго экзона приводила к повышенной активности фолликулярных Т-хэлперов и клеток герминальных центров в лимфатических узлах, продукции антинуклеарных аутоантител и антител к двуцепочечной ДНК, что является свидетельством активации системного аутоиммунного процесса [9]. Гиперактивность герминальных центров связывают с влиянием делеции экзона 2 FoxP3 на фолликулярные Трег [113]. У человека при избирательной экспрессии Foxp3Δ2 развивается IPЕХ-синдром [9]. Дальнейшие исследования показали, что у мышей с селективной экспрессией Foxp3Δ2 повышен уровень IgE к аутоантигенам кожи [113]. У

пациентов с IPeX также был выявлен повышенный титр IgE и антикератиновых антител [124]. На другой мышинной модели было показано, что тимические Трег с Foxp3Δ2 были менее восприимчивы к ИЛ-2-опосредованному сигналингу [125]. У данных клеток была понижена экспрессия маркёров ICOS, KLRG, CTLA-4 и CD44. Помимо этого, для предсказания структурных различий между белковыми формами Foxp3FL и Foxp3Δ2 использовали программу предсказания третичной структуры белков AlphaFold2. Было выявлено, что N-концевая область Foxp3 препятствует связыванию домена Forkhead с ДНК. Делеция второго экзона приводит к значительному изменению конформации белка, позволяя домену Forkhead связываться с целевой ДНК [125]. Это свидетельствует о повышенной способности белковой формы Foxp3Δ2 взаимодействовать с ДНК по сравнению с Foxp3FL, что также указывает на возможные различия в транскрипционной активности Foxp3FL и Foxp3Δ2.

Делеция экзона 7 приводит к уменьшению супрессорной активности Трег в отношении CD4⁺ Т-лимфоцитов. CD4⁺ Т-клетки, трансдуцированные FoxP3Δ2Δ7, не были способны активно синтезировать CD25 и CTLA-4 и не могли подавлять пролиферацию таргетных CD4⁺ Т-клеток *in vitro* [107]. В экспериментах на мышинной модели было показано, что Трег с избирательной экспрессией FoxP3Δ2Δ7 не обладали супрессорной активностью [106]. У мышей наблюдали полиорганное воспаление, повышенную продукцию провоспалительных цитокинов, гиперактивацию эффекторных Т-клеток, активацию АПК и нарушение развития В-клеток, т.е. признаки, характерные для полного отсутствия экспрессии FoxP3 [106]. В исследовании, посвященном влиянию провоспалительного цитокина ИЛ-1β на АС FoxP3 при болезни Крона у человека, выявили, что ИЛ-1β индуцирует делецию экзона 7, что приводит к усилению дифференцировки наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в Th17 и повышению уровня экспрессии ИЛ-17A [116].

1.8. Регуляторные Т-клетки и аутоиммунные заболевания

Поскольку Трег занимают центральное место в регуляции и поддержании периферической иммунологической толерантности, особенностям функционирования данных клеток при АИЗ и их вовлеченности в патогенез посвящено множество исследований. К аутоиммунным относят заболевания, определяющей характеристикой которых является срыв иммунологической толерантности. АИЗ развиваются в результате вызванной иммунологическими нарушениями чрезмерной аутоактивации лимфоцитов, приводящей к патологической выработке аутоиммунных антител. Выработка аутоантител к компонентам нормальных тканей организма приводит к их повреждению и разрушению, что запускает дальнейшее развитие хронической воспалительной реакции. На данный момент к аутоиммунным причисляют свыше 150 болезней [126]. Предрасполагающими к развитию АИЗ являются генетические особенности (выявлена взаимосвязь между определенными аллелями ГКГ и

повышенным риском возникновения АИЗ), инфекции (например, вирус Эпштейн-Барр), некоторые факторы внешней среды (воздействие ультрафиолета и др.) и молекулярная мимикрия между чужеродными и ауто-антигенами [127]. При этом для многих заболеваний природа запускающих аутоиммунный процесс факторов остается неясной. Общими звеньями патогенеза АИЗ являются аутоактивация Т-лимфоцитов, последующая активация В-лимфоцитов и гиперпродукция аутоантител. Основными Т-клеточными популяциями, вовлеченными в поддержание хронического воспалительного процесса при АИЗ, являются Th1, Th17 и Th1-подобные Th17 [128]. Из них особая роль в продукции провоспалительных цитокинов отведена Th17, секретирующим ИЛ-17, ИЛ-21, ИЛ-22 и ИФН- γ . При многих АИЗ количество Th17 повышено в периферической крови и в очагах воспаления. Активность данных клеток и уровень секретируемого ими ИЛ-17 соотносятся с выраженностью клинических симптомов [128]. Необходимо подчеркнуть, что для дифференцировки из CD4⁺ Т-клеток как Th17, так и для Трег необходим TGF- β . При этом присутствие провоспалительных цитокинов ИЛ-6 или ИЛ-21 приводит к развитию Th17, а их отсутствие – к образованию Трег. В связи с этим повышенное содержание Th17 сопровождается понижением количества Трег [129]. Было показано, что при таких АИЗ как БАС [5], РС [130,131], БШ [132], ревматоидный артрит [133], системная красная волчанка [134], диабет первого типа [135], миастения гравис [136] и др. в периферической крови больных снижено количество Трег, а также нарушена их супрессорная активность [137]. БШ характеризуется появлением неконтролируемой лимфогистиоцитарной инфильтрации в железистых тканях с последующим развитием инфильтрации в легких, почках, стенках сосудов и других органах [138]. Первичным событием патогенеза БШ является поражение и гибель клеток эпителиальной ткани экзокринных желез в результате действия различных внешних стимулов, следствием чего является аутоактивация иммунных клеток [139]. Примечательно, что на начальных стадиях развития заболевания доминирующими являются именно Т-лимфоциты, что подтверждается клеточным составом образующихся в экзокринных железах лимфогистиоцитарных инфильтратов, преимущественно состоящих из CD4⁺ Т-клеток [140]. РС и БАС относят к нейродегенеративным заболеваниям, возникновение нейровоспаления при которых ассоциировано с несколькими механизмами, одним из которых является аутоиммунный. Ключевыми компонентами аутоиммунного механизма при развитии нейродегенерации являются активация микроглии и астроцитов, повышенный уровень секреции провоспалительных цитокинов и инфильтрация CD4⁺ Т-лимфоцитами центральной нервной системы [141]. Учитывая описанные особенности развития АИЗ, понижение пролиферативной и супрессорной активности Трег приводит к потере контроля над иммунным ответом на собственные аутоантигены и дальнейшему прогрессированию аутоиммунного процесса. На развитие АИЗ также влияет AC FoxP3. При индивидуальной экспрессии FoxP3 Δ 2 в Трег человека развивается IPeX-синдром [9].

В литературе имеются сведения об увеличении уровня экспрессии FoxP3Δ2 в Трег периферической крови при таких АИЗ, как васкулит, характеризующийся определением антинейтрофильных цитоплазматических антител (АНЦА-ассоциированный васкулит) [10], гигантоклеточный артериит [12], рассеянный склероз [13]. Помимо этого, экспрессия FoxP3Δ2 также была увеличена среди CD4⁺ Т-клеток периферической крови при тиреоидите Хашимото [11] и среди CD4⁺ Т-клеток, полученных из тонкого кишечника пациентов с целиакией [142]. Интересно, что при таких АИЗ как системная красная волчанка и ревматоидный артрит экспрессия FoxP3Δ2 в CD4⁺ Т-клетках периферической крови была понижена по сравнению с экспрессией данного сплайс-варианта у здоровых доноров [143]. Аналогичным образом, у пациентов с язвенным колитом или болезнью Крона не изменялось соотношение уровней экспрессии FoxP3Δ2 к FoxP3FL среди CD4⁺Т-клеток ткани кишечника по сравнению с контрольной группой [144]. При болезни Крона отмечали повышения уровня экспрессии сплайс-варианта FoxP3Δ7 [116]. Результаты данных исследований подчеркивают, что характер изменения уровней экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 является специфичным для определенного АИЗ.

1.9. Возможности регенеративной терапии аутоиммунных заболеваний на основе регуляторных Т-клеток

С целью восстановления иммунологической толерантности при АИЗ были разработаны несколько направлений, основанные на применении Трег в качестве клеток для регенеративной терапии. К основным подходам относят антигеннеспецифическую стимуляцию Трег *in vivo* и размножение поликлональных Трег *ex vivo*, а также антигенспецифические модификации ТКР Трег и конструирование химерного антигенного рецептора (англ. *chimeric antigen receptor* – CAR) CAR-Трег [145]. Для стимуляции Трег *in vivo* используют ИЛ-2 или рапамицин [146]. Культивирование Трег *ex vivo* проводят с добавлением моноклональных антител к CD3/CD28, ИЛ-2, TGF-β. Особенности применения перечисленных подходов приведены в таблице 5.

Таблица 5. Подходы к терапии на основе Трег.

Подход	Механизм действия	Преимущества	Недостатки	Источник
Стимуляция эндогенных Трег ИЛ-2	Стимуляция дифференцировки тТрег и пТрег, улучшает стабильность Трег	Доступность	Неспецифичность, проявляющаяся в активации CD4 ⁺ Т-клеток	[145]

Стимуляция эндогенных Трег рапамицином	Ингибитор серин/треониновой киназы-мишени рапамицина у млекопитающих (англ. <i>mammalian target of rapamycin, mTOR</i>), задействованной в передаче активирующего сигнала от рецептора ИЛ-2 и CD28 Т- клеткам	Избирательно увеличивает количество Трег. Вызывает повышение уровня экспрессии GITR, что приводит к улучшению супрессорной активности Трег у пациентов с IPEX	Является мощным иммунодепрессант ом	[147]
Трансплантация микробиома кишечника	Вырабатываемый бактериями бутират снижает уровень ИЛ- 17, повышает количество Трег в периферической крови и повышает концентрацию противовоспалительны х ИЛ-10 и ИЛ-12, повышает ацетилирование FoxP3	Стимулирует дифференциро вку пТрег, стабилизирует экспрессию FoxP3	Данные получены только на мышинных моделях	[145]
Размножение поликлональных Трег ex vivo с использованием моноклональных	Стимулируют дифференцировку и активацию Трег	Доказанная безопасность	Недостаточная эффективность, обусловленная неспецифичностью ; трудность в получении	[145]

антител к CD3/CD28; ИЛ-2 и TGF- β			большого количества стабильных клеток. Необходимость нескольких инфузий для достижения эффекта	
CAR-Трег	Сконструированные рецепторы состоят из внеклеточного домена для распознавания и связывания антигена и внутриклеточных доменов CD3 и CD28 для активации Трег при связывании антигена без участия ГКГ	Независимое от ГКГ распознавание специфическог о антигена	Высокая стоимость, проблема подбора специфичного аутоантигена	[148]
ТКР-Трег	Модифицированный ТКР, ГКГ- опосредованное связывание с антигеном	Специфичност ь, более высокая стабильность и необходимость в меньшем количестве клеток	Высокая стоимость, проблема подбора антиген- специфичных ТКР и аффинности ТКР	[148]

Клинические испытания с использованием адоптивного переноса поликлональных Трег проводились с участием пациентов с болезнью Крона, с диабетом первого типа, системной красной волчанкой, вульгарной пузырчаткой и аутоиммунным гепатитом [149]. Внутривенное введение аутологичных Трег при болезни Крона способствовало уменьшению выраженности симптомов. Однократное введение Трег при диабете первого типа не оказалось эффективным [150]. При системной красной волчанке применение инфузии Трег дало лишь временное улучшение [151]. Клиническое исследование с участием пациентов с вульгарной пузырчаткой

было завершено преждевременно, результаты данного исследования и исследования с применением Трег при аутоиммунном гепатите отсутствуют. Остается неясным, какая стратегия стимуляции клеток будет оптимальной для конкретного заболевания и какое количество и частота введений необходимы для достижения результата.

Клинические испытания с использованием ТКР- и CAR-Трег для лечения АИЗ пока не проводятся. Тем не менее данные клетки доказали свою эффективность в результате доклинических исследований на мышинных моделях при РС, диабете первого типа, колите и системной красной волчанке [145]. Считается, что использование генетической инженерии для придания Трег специфичности к аутоантигену может оказаться более эффективным при лечении АИЗ [145]. Однако это является справедливым только для тех АИЗ, характерные аутоантигены которых определены. В связи с этим другим потенциальным терапевтическим подходом для восстановления иммунологической толерантности при АИЗ может являться прямое воздействие на определенные Трег-ассоциированные молекулы, функция которых у пациентов нарушена.

В заключение следует подчеркнуть, что АС пре-мРНК FoxP3 приводит к изменению третичной структуры белка, что влияет на функционирование Трег. Роль белковых форм сплайс-вариантов в биологии этих клеток не изучена в полной мере. Изменение количества и нарушение функциональной активности Трег, наблюдаемое при АИЗ, позволяет рассматривать данную популяцию клеток в качестве потенциальной мишени для терапии. Модуляция АС пре-мРНК FoxP3 в Трег может стать перспективным подходом в рамках регенеративной медицины.

2. Материалы и методы

2.1. Соблюдение этических стандартов и характеристика пациентов с аутоиммунными заболеваниями и здоровых доноров

Пациенты с РС, БАС и здоровые доноры (ЗД), принимающие участие в исследовании, были набраны в амбулаторном отделении Научного центра неврологии (Москва, Россия), а пациенты с БШ в «Центре лечения суставов и сердца», а также в клинике «ДДМ» (Москва, Россия). Все исследования с участием пациентов или ЗД проводили в соответствии с этическими стандартами локальных комитетов, а также Хельсинским заявлением 1964 года и его более поздними обновлениями. Исследование с участием пациентов с РС, БАС и ЗД одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии (протокол № 12-3 от 28 декабря 2020 г.). Исследование с участием пациентов с БШ одобрено этической группой АНО «Шегрену – нет» (протокол № 1/1 от 18 апреля 2021 г.). Все пациенты и ЗД дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В исследование были включены только взрослые пациенты (в возрасте 18 лет и старше). Из исследования были исключены пациенты с острыми и хроническими инфекционными заболеваниями и/или нейроинфекционными заболеваниями в анамнезе, лица с сердечно-сосудистыми заболеваниями в анамнезе, сахарным диабетом, злокачественными новообразованиями и активные курильщики. Демографические, эпидемиологические и клинические данные были собраны путем опроса участников исследования и с помощью электронных медицинских карт. Три группы по 20 человек составили пациенты с диагнозами РС, БАС или БШ, соответственно. Контрольную группу ЗД составили 20 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу с группами пациентов. Образцы крови были получены путем венепункции в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K₂EDTA (Greiner Bio-One, Австрия). Основные демографические характеристики групп пациентов и ЗД представлены в таблице 6. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение с 95%-ым доверительным интервалом.

Таблица 6. Демографическая характеристика здоровых доноров и пациентов с РС, БАС и БШ.

Параметр	ЗД	РС	БАС	БШ
Количество пациентов женского пола	12 (62,8%)	15 (75%)	2 (10%)	17 (85%)
Возраст на момент включения в исследование	36,2 $\pm$ 12,2	37,1 $\pm$ 11,1	53,2 $\pm$ 12,2	45,8 $\pm$ 14,0
Возрастной диапазон	21 – 58	20 – 59	27 – 70	21 – 72

2.2. Детекция регуляторных Т-клеток в образцах периферической крови

Для анализа методом проточной цитометрии использовали проточный цитофлуориметр MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Германия). Детекцию Трег в образцах периферической крови проводили путем иммунофлуоресцентного окрашивания клеточных маркёров Трег. Клетки метили при помощи набора Treg Surface Marker Analysis Cocktail (CD45-VioBlue, CD4-Fluorescein isothiocyanate (FITC); CD25-allophycocyanin (APC), CD127-phycoerythrin (PE); Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Стратегия гейтирования при определении Трег в периферической крови представлена на рис. 12.

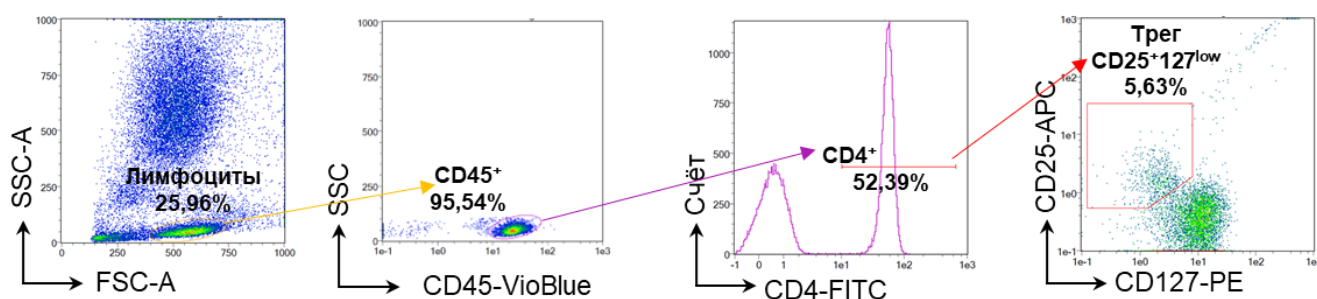


Рисунок 12. Стратегия гейтирования для определения Трег в периферической крови пациентов с АИЗ или ЗД. Пример диаграмм проточной цитометрии с последовательной детекцией лимфоцитов, лейкоцитов по маркёру CD45, CD4⁺ Т-лимфоцитов и Трег с маркёрами CD25⁺ и CD127^{low}.

Для анализа экспрессии Трег-ассоциированных поверхностных маркёров клетки метили одним из следующих антител: anti-human CD4–FITC, anti-human CD25–APC, anti-human CD127–FITC, anti-human CD152–APC, anti-human CD39–FITC, или anti-human CD223–APC, (все от Miltenyi Biotec, Германия), и анализировали методом проточной цитометрии.

Для обнаружения ядерных маркёров FoxP3 и Helios клетки фиксировали и мембраны пермеабилizировали с помощью набора Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmingen, США), и метили антителами anti-human FoxP3-PE и anti-human Helios-PE (Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали на проточном цитометре. Экспрессию внутриклеточного FoxP3 и Helios определяли по средней интенсивности флуоресценции (СИФ). Для измерения количества гранзимов Трег стимулировали с помощью набора Stimulation Cocktail + Protein Transport Inhibitor (eBioscience Inc., США) в течение 4 часов в CO₂-инкубаторе. Контрольные клетки инкубировали только с Protein Transport Inhibitor (eBioscience Inc., США). После стимуляции клетки фиксировали и пермеабилizировали, как описано выше, и метили anti-human granzyme A-PE, anti-human/mouse/rat granzyme B-PE, или anti-human perforin-FITC (все от Miltenyi Biotec, Германия) и анализировали методом проточной цитометрии.

2.3. Выделение регуляторных Т-клеток и размножение *ex vivo*

Свежие мононуклеарные клетки периферической крови выделяли с использованием Lympholite-H (Cedarlane, Канада) центрифугированием в градиенте плотности. Трег выделяли с использованием набора CD4⁺CD25⁺ Regulatory T-Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Чистоту полученных Трег контролировали методом проточной цитометрии с использованием набора Treg Detection Kit, как описано выше. Затем проводили размножение Трег *ex vivo*. Для этого клетки высевали в концентрации 5×10^4 клеток/мл и культивировали во флаконах площадью 25 см² в клеточной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), 2 мкг/мл антител анти-CD28 (eBiosciences, США), 5 мкг/мл моноклональных антител анти-CD3 (МедБиоСпектр, Россия), 5 нг/мл TGF- β (R&D Systems, США) и 100 ЕД/мл rHu IL-2 (R&D Systems, США). Каждые 3 – 4 суток производили замену среды. Клетки культивировали в течение 15 дней.

Стратегия гейтирования, позволяющая определить чистоту выделенных и размноженных Трег, представлена на рис. 13.

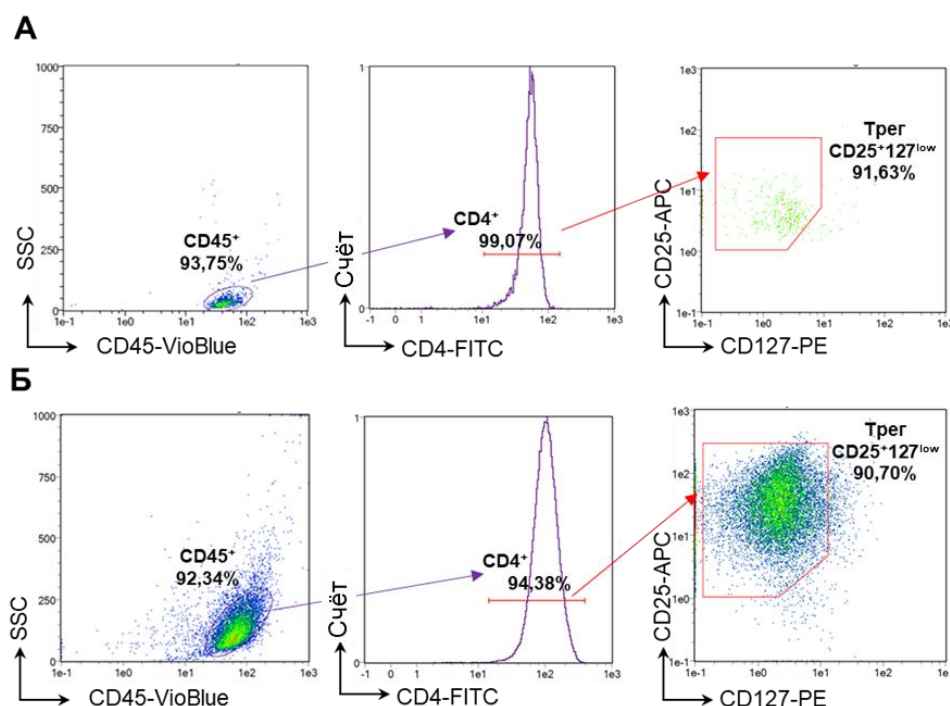


Рисунок 13. Стратегия гейтирования проточной цитометрии, позволяющая определить чистоту Трег. (А) Трег, выделенные из периферической крови. (Б) Трег, размноженные *ex vivo* в течение 15 дней.

2.4. Выделение РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени

Общую РНК выделяли из клеток с использованием набора RUplus (БиоЛабМикс, Россия). 5 мкг РНК подвергали процедуре обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). Амплификацию и детекцию накопления амплификата проводили в реальном времени при помощи системы DTprime5 (ДНК-Технология, Россия). Реакционную смесь готовили с использованием qPCR mix-HS SYBR (Евроген, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя и праймерами, указанными в таблице 7. Использовали двухтемпературные циклы отжига/элонгации.

Таблица 7. Список праймеров, используемых для ОТ-ПЦР в реальном времени.

Мишень	Смысловая последовательность 5' – 3'	Антисмысловая последовательность 5' – 3'	Размер продукта, п.о.	t отжига, °C
FoxP3 общая	agagagcctgcctcagtaca	tgacgctgcttctgtgtagg	178	60
FoxP3FL	ctagtcattgggtggcaccctc	gatgaagccttggtcagtgcc	587	59
FoxP3Δ2	cagctgcagctctcaacgggtg	gatgaagccttggtcagtgcc	506	61
FoxP3Δ7	ctagtcattgggtggcaccctc	gtcggatgatgcctgtgctc	546	60
FoxP3Δ2Δ7	cagctgcagctctcaacgggtg	gtcggatgatgcctgtgctc	441	62
CTLA4	agggtgactgaagtctgtgcg	aagtcagaatctgggcacgg	247	59
LGALS9	tccagctgtccccttttctg	agcagagggtcaaagggtcatc	272	60
NRP1	ctccacgcgattcatcagga	ccacctgtgagctggaagtc	198	60
18S	ggatccattggagggaagt	acgagcttttaactgcagcaa	91	62
Бета-актин	cctgggcatggagtcctgt	atctccttctgcatcctgtcg	153	60
GAPDH	gaagggtgaagggtcggagtc	gaagatggtgatgggatttc	226	57

Флуоресценцию измеряли после цикла элонгации. Для оценки качества конечных продуктов ПЦР анализ кривой плавления проводили в конце реакции между 60°C и 95°C (после 35-го цикла). Пороговые циклы C(t) рассчитывали при базовой флуоресценции на уровне 300 единиц. Серии разведений (1:40, 1:80, 1:160, 1:320 и 1:640) готовили в двух повторах для всех экспериментальных образцов для построения стандартной кривой эффективности ПЦР. С помощью программного обеспечения DTPrime5 рассчитывали относительную концентрацию мРНК амплификата. Данные полученного уровня мРНК нормализовали по отношению к средним уровням РНК генов 18S, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (англ. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - *GAPDH*) и бета-актина, которые использовали в качестве референсных РНК с постоянным уровнем экспрессии.

2.5. Трансфекция клеток переключающими сплайсинг олигонуклеотидами

ПСО размером 24, 30, 36 или 42 нуклеотида (таблица 8), специфически взаимодействующие с регулируемыми сплайсинг сайтами на молекуле пре-мРНК FoxP3, были синтезированы на заказ (Синтол, Россия). Нуклеотиды содержали следующие модификации: 2'-О-метоксиэтил (2'МОЭ) сахар, фосфоротиоатный остов и 5'-метилцитозин для предотвращения внутриклеточной деградации [16] и конъюгированы с флуоресцентным красителем. ПСО #Инс2, способный селективно индуцировать включение экзона 2, и #Дел2, способный селективно индуцировать делецию экзона 2, были мечены флуоресцентным красителем Cy5.5. ПСО #Инс7, способный селективно индуцировать включение экзона 7 и #Дел7, способный селективно индуцировать делецию экзона 7, были мечены флуоресцентным красителем Cy3. Поиск в BLAST не выявил других последовательностей-мишеней ПСО в геноме человека

Таблица 8. Последовательности ПСО, используемые для трансфекции.

#Инс2	
24 нук.	aatgtccgtgaggaggacctgtcc
30 нук.	gtgaatgtccgtgaggaggacctgtccggt
36 нук.	gggggtgaatgtccgtgaggaggacctgtccggtgta
42 нук.	aacgggggtgaatgtccgtgaggaggacctgtccggtgtaaag
#Дел2	
24 нук.	cttaccgcgtccctcctccctcgtc
30 нук.	ccacttaccgcgtccctcctccctcgtccac
36 нук.	ctgccacttaccgcgtccctcctccctcgtccaccct
42 нук.	tacctgccacttaccgcgtccctcctccctcgtccaccctett
#Инс7	
24 нук.	gaccacgacctcttctcttgacac
30 нук.	gtcgaccacgacctcttctcttgacactca
36 нук.	agtgtcgaccacgacctcttctcttgactcacgg
42 нук.	taaagtgtcgaccacgacctcttctcttgactcacggtac
#Дел7	
24 нук.	cccccgctccctcctccagacgtgc
30 нук.	gaccccccgctccctcctccagacgtgccac
36 нук.	gacgaccccccgctccctcctccagacgtgccacgtc
42 нук.	tctgacgaccccccgctccctcctccagacgtgccacgtccct

Трансфекцию размноженных Трег проводили с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Трансфицированные Трег культивировали 24 ч по описанному выше протоколу.

Для индукции селективной экспрессии индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 проводили подбор комбинации 36-членных ПСО (таблица 9) и трансфицировали ими Трег четырех здоровых доноров или пациентов с БАС.

Таблица 9. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды, используемые для селективной экспрессии индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3.

ПСО	Последовательность (5' – 3')	Метка
#Кон1	a*t*g*t*g*ccgtaggtgaggcctcacgttcgtta*a*a*c*g*g	Cy5.5
#Кон2	g*t*g*a*g*gcctcacgttcgttaaacggatgtgc*c*g*t*a*g	Cy3
#Инс2	a*t*g*t*g*gcctgtccaggaggagtgccgtgaag*t*g*g*g*g	Cy5.5
#Инс7	g*g*c*a*c*tcacgttctccttccagcaccagc*t*g*t*g*a	Cy3
#Дел2	t*c*c*c*a*cctgctccctcctccctgcccattca*c*c*g*t*c	Cy5.5
#Дел7	c*t*g*c*a*ccgtgcagacctcctccctgcccccc*a*g*c*a*g	Cy3

* - положения 2'МОЭ-модифицированных олигонуклеотидов

Трансфицированные клетки культивировали 96 ч. Для определения эффективности трансфекции Cy3- и Cy5.5-позитивные клетки подсчитывали методом проточной цитометрии. Эффективность трансфекции определялась по СИФ Cy3-положительных и/или Cy5.5-положительных клеток.

Количество пролиферирующих клеток, их жизнеспособность, размер и округлость измеряли каждые 3 дня с использованием красителя трипанового синего на анализаторе жизнеспособности клеток Vi-CELL XR (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом производителя. Частоту клеточных циклов в сутки (f) определяли из уравнения $N_t = N_0 2^{ft}$, где N_t — количество клеток в момент времени t (измеряется в сутках), а N_0 — исходное количество клеток [152].

Визуализацию клеток проводил с помощью инвертированного микроскопа Биомед 3И (Биомед-Сервис, Россия) в ходе культивирования.

2.5. Определение доли пролиферирующих регуляторных Т-клеток и мониторинг клеточной гибели

Для оценки доли пролиферирующих Трег трансфицированные клетки метили витальным красителем сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (англ. *carboxyfluorescein succinimidyl ester* - CFSE, Life Technologies, США) по протоколу производителя и культивировали по описанной выше методике. Интенсивность пролиферации оценивали по снижению сигнала CFSE [153], который измеряли каждые 24 часа при помощи проточной цитометрии.

Для определения клеточной гибели каждые 24 часа клетки инкубировали 10 мин в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, Na_2HPO_4 - 10 мМ, KH_2PO_4 – 1,8 мМ, NaCl - 137 мМ, и KCl - 2,7 мМ) в присутствии ядерного красителя йодида пропидия (англ. *propidium iodide* - PI, Хеликон, Россия) в концентрации 10 мкг/мл. Долю PI-положительных клеток определяли методом проточной цитометрии [154]. Каждый эксперимент проводили в четырех независимых повторах.

2.6. Вестерн-блоттинг

Детекцию белковых форм сплайс-вариантов FoxP3 проводили методом вестерн-блоттинга. Клетки лизировали в 1 мл буфера TBE (англ. *Tris/Borate/EDTA* - TBE, 89 мМ Трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), pH 8,3) путем ультразвукового разрушения (50 Вт, 2 мин) с использованием гомогенизатора Sonic Dismembrator (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Клеточный лизат центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 g для удаления клеточного дебриса. Содержание белка в образце измеряли по методу Брэдфорда (Pierce Biotechnology, США). Бычий сывороточный альбумин использовали для серийных разведений для построения калибровочной кривой. Экстракт общего белка (50 мг) растворяли в 50 мМ Трис-HCl, pH 6,8, 1% додецилсульфата натрия, 2 мМ ЭДТА, 1% 2-меркаптоэтанола и 7,5% глицерина и денатурировали путем нагревания при 100 °C в течение 10 мин. Белки разделяли в полиакриламидном геле с градиентом плотности NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein (Life Technologies, США) при 100 В в течение 2 ч. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны в буфере для переноса Novex (Invitrogen, США) при 40 В в течение 3 ч. Мембраны окрашивали Ponceau S (Sigma-Aldrich, США). После замачивания в блокирующем растворе Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, США) мембраны инкубировали с первичными антителами. Использовали антитела anti-mouse/rat/human FoxP3 (клон 150D, BioLegend, США), которые специфичны к экзону 2, и антитела anti-human FoxP3 (клон 259D, BioLegend, США), которые специфичны к эпипептиду после экзона 2, общему для всех белковых форм сплайс-вариантов. GAPDH использовали в качестве контрольного белка с постоянным уровнем синтеза, поскольку данные об изменении уровня синтеза данного белка в клетках здоровых людей и пациентов с БАС отсутствуют. Детекцию осуществляли с помощью анти-GAPDH (клон 6C5, Abcam, США). Мембраны промывали в буфере TBE с 0,1% Твин-20 (Invitrogen, США) и

инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Cell Signaling, США). Мембраны визуализированы с помощью набора хемилюминесцентных реагентов Super Signal (Pierce Biotechnology, США).

2.7. Анализ супрессорной активности регуляторных Т-клеток

Для изучения контакт-зависимой супрессорной активности Трег проводили реакцию смешанных лимфоцитов (тест смешанной культуры лимфоцитов) в 96-луночных планшетах с круглым дном (Nest, Китай) в конечном объеме 200 мкл/лунку. Респондерные клетки-мишени $CD4^+CD25^-$ Т-клетки получали из негативной фракции во время выделения $CD4^+CD25^+$ клеток и метили витальным красителем CFSE, как описано выше. Меченые клетки выращивали в трех повторах из расчёта 5×10^4 клеток на лунку с обработанными митомицином С (Kyowa Hakko Kirin, Япония) аллогенными моноклеарными клетками периферической крови, применяемыми в качестве фидерных клеток без и в присутствии Трег. Культивирование проводили в присутствии 5 мкг/мл анти-CD3-антител в течение 5 дней при 37°C и 5% CO₂. Соотношение Трег и клеток-мишеней находилось в диапазоне от 1:2 до 1:96. Для выявления супрессии клетки-мишени, меченные CFSE, анализировали на проточном цитометре MACS Quant 10. Долю пролиферирующих клеток определяли по количеству клеток со сниженным сигналом CFSE.

2.8. Подавление активности теломеразы

Способность Трег подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях оценивали после совместного культивирования через полупроницаемую мембрану. Трансфицированные Трег культивировали с аутологичными $CD4^+CD25^-$ Т-клетками-мишенями в соотношении 1:1 в системе пористых мембранных вставок (Millicell Culture Inserts, диаметр 8 мм; Millipore, США) в 24-луночных плоскодонных планшетах (Nunc, Дания) в объеме 10000 клеток в 1 мл среды в течение 9 ч. Культуры готовили в четырех повторах для всех образцов. Активность теломеразы измеряли с помощью протокола амплификации теломерных повторов (англ. *telomeric repeat amplification protocol - TRAP*) [155]. Клетки-мишени лизировали в 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоте (ЭГТА), 0,1 мМ фенилметилсульфонилфториде, 5 мМ 2-меркаптоэтаноле, 0,5% детергенте холамидопропилдиметиламмонийпропансульфонат (ХАПС) и 10% глицерине (все от Sigma-Aldrich, США) и центрифугировали 30 минут при 12 000g. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата TS-праймера (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3') и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl (pH 8,8), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Твин-20, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭГТА (все от Sigma-Aldrich, США), по 0,25 мМ каждого dNTP (Синтол, Россия) и 2 мкл клеточного лизата (что эквивалентно 2000 клеток). Элонгацию проводили при 37°C в течение 30 мин и при 96°C в течение 10 мин для инактивации теломеразы. Затем к смеси для элонгации добавляли 0,1 мкл CX-праймера (Copy Extended Primer)

(5'- CCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA -3') и пять единиц Taq-полимеразы с последующей ПЦР: 94°C в течение 5 мин; затем 30 циклов: 94°C в течение 30 с, 50°C в течение 30 с и 72°C в течение 40 с; а затем 72°C в течение 5 мин. Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле и буфера TBE. В каждую лунку геля добавляли десять микролитров образца. Гели окрашивали SYBR Green I (Invitrogen, США), фотографировали под УФ-излучением в системе визуализации ChemiDoc™ XRS и анализировали с помощью GelAnalyzer 2010a.

2.9. Определение концентрации цитокинов

Определение концентрации ИЛ-10, ИЛ-12 (p40), ИЛ-12 (p70), ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-22, ИЛ-26, ИЛ-27 (p28), ИЛ-28А/ИФН- λ 2, ИЛ-29/ИФН- λ 1 и ИЛ-35 в культуральной среде Трег проводили мультиплексным методом с использованием стандартной панели 12-Plex Bio-Plex Pro™ Human Treg Cytokine Panel (Bio-Rad, США) на иммуноанализаторе Bio-Plex 200 System (Bio-Rad, США) и последующей обработкой полученных результатов с помощью приложения Bio-Plex Manager 6.0 Properties (Bio-Rad, Hercules, США).

2.10. Статистическая обработка результатов

Статистические расчёты проводили при помощи следующих программ: MS Office Excel 2016 software (Microsoft Inc., США), SPSS 25 (IBM SPSS Statistics, США) или Prism 6 software (GraphPad, США). Статистические различия анализировали с помощью U-критерия Манна-Уитни или критерия Краскала-Уоллиса. При необходимости использовали t-критерий Стьюдента и его модификацию Бонферрони. Результаты представлялись как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SE) индивидуальных определений по меньшей мере с тремя повторами. Значения p, которые считали значимыми: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

3. Результаты

3.1. Уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в регуляторных Т-клетках периферической крови здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными заболеваниями

Уровни экспрессии мРНК сплайс-вариантов FoxP3FL, FoxP3Δ2, FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7 определены в Трег периферической крови ЗД, а также пациентов с РС, БАС и БШ методом ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 14).

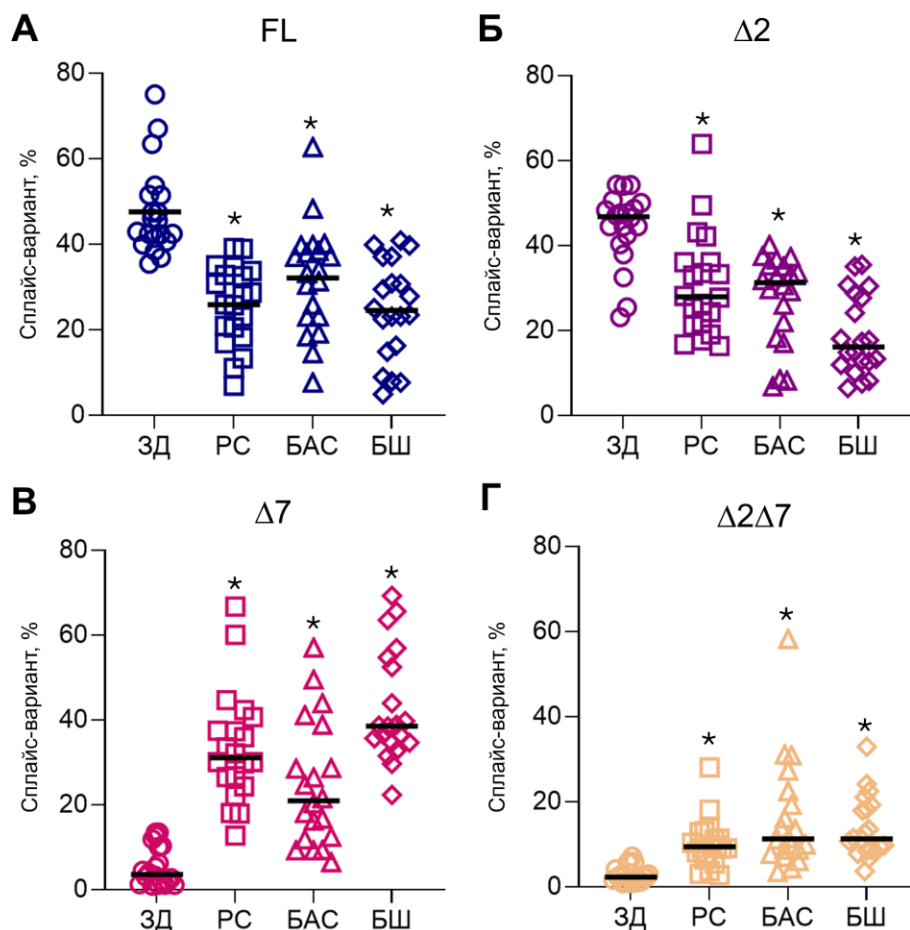


Рисунок 14. Уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 у ЗД и пациентов с РС, БАС и БШ. (А) Полноразмерный вариант FoxP3FL. (Б) Сплайс-вариант Δ2. (В) Сплайс-вариант Δ7. (Г) Сплайс-вариант Δ2Δ7. Показана доля (в процентах) мРНК сплайс-варианта от общей мРНК FoxP3. ЗД, здоровые доноры. РС, рассеянный склероз. БАС, боковой амиотрофический склероз. БШ, болезнь Шегрена. Черные горизонтальные линии отображают медиану. * – $p < 0,05$ по отношению к Трег ЗД по критерию Манна-Уитни.

Выявлено, что в Трег периферической крови ЗД преобладает экспрессия полноразмерного сплайс-варианта FoxP3FL (среднее значение $47,6 \pm 10,4\%$; медиана 44,2%) и сплайс-варианта FoxP3Δ2 (среднее значение $44,2 \pm 8,7\%$; медиана 46,7%). Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3Δ7 (среднее значение $5,5 \pm 4,6\%$; медиана 3,6%) и FoxP3Δ2Δ7 (среднее значение $2,8 \pm 1,9\%$; медиана

2,2%) менее выражена. Уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 у здоровых доноров приведены в таблице 1 в Приложении.

В Трег периферической крови пациентов с РС преобладает FoxP3Δ2 (среднее значение $30,7 \pm 12,1\%$; медиана 27,9%) и FoxP3Δ7 (среднее значение $33,4 \pm 13,3\%$; медиана 31,05%). Экспрессия FoxP3FL снижена ($25,8 \pm 9,3\%$, медиана 27,0%), тогда как уровень экспрессии FoxP3Δ2Δ7 повышен (среднее значение $10,1 \pm 5,7\%$; медиана 9,4%) по сравнению с Трег ЗД (таблица 2 в Приложении).

В группе пациентов с БАС в Трег преобладает экспрессия FoxP3FL (среднее значение $32,1 \pm 12,5\%$; медиана 33,6%) и FoxP3Δ2 (среднее значение $27,5 \pm 10,5\%$; медиана 31,2%), однако уровень их экспрессии снижен по сравнению с Трег ЗД, и значительно повышены уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3Δ7 (среднее значение $24,5 \pm 14,7\%$; медиана 20,9%) и FoxP3Δ2Δ7 (среднее значение $16,0 \pm 13,0\%$; медиана 11,3%) (таблица 3 в Приложении).

В Трег пациентов с БШ преобладает экспрессия сплайс-варианта FoxP3Δ7 (среднее значение $42,8 \pm 13,0\%$; медиана 38,5%). По сравнению с Трег ЗД значительно снижен уровень экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL ($24,5 \pm 11,5\%$; медиана 24,2%) и FoxP3Δ2 ($18,9 \pm 9,4\%$; медиана 16,1%), повышена экспрессия FoxP3Δ2Δ7 ($13,9 \pm 7,3\%$; медиана 11,3) (таблица 4 в Приложении).

Пациенты были клинически гетерогенны, поэтому не было выявлено соответствия между сплайс-вариантами FoxP3 и клиническими проявлениями. Изменение уровней экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови в группах пациентов сопровождалось общим понижением уровня мРНК FoxP3 в данных клетках по сравнению с группой ЗД (рис. 15 А, таблица 5 в Приложении), а также с понижением содержания Трег в периферической крови (рис. 15 Б, а также таблица 6 в Приложении).

В группе ЗД среднее значение уровня экспрессии общей мРНК FoxP3 составило $0,6 \pm 0,1$ (медиана 0,5). В группе пациентов с РС среднее значение экспрессии общей мРНК FoxP3 составило $0,3 \pm 0,1$ (медиана 0,3). В группе пациентов с БАС среднее значение экспрессии общей мРНК FoxP3 составило $0,3 \pm 0,1$ (медиана 0,3). В группе пациентов с БШ среднее значение экспрессии общей мРНК FoxP3 составило $0,4 \pm 0,1$ (медиана 0,4).

Среднее значение содержания Трег в периферической крови, выраженное в % от CD4⁺ Т-лимфоцитов, у ЗД составило $8,5 \pm 1,6\%$, медиана 8,3%. В группе пациентов с РС содержание Трег составило $4,8 \pm 1,7\%$, медиана 4,9%; в группе пациентов с БАС $4,1 \pm 0,9\%$, медиана 4%; в группе пациентов с БШ $4,4 \pm 1\%$, медиана 4,6%.

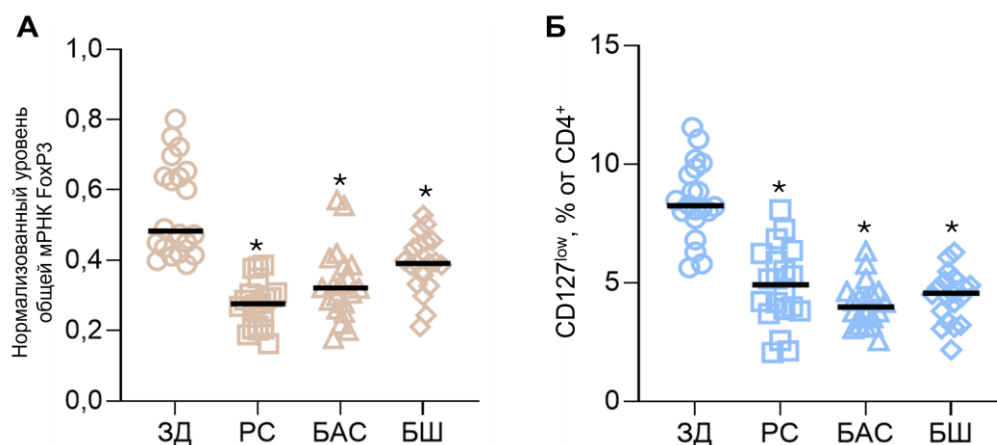


Рисунок 15. Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 в Трег и содержание Трег в периферической крови. (А) Снижение уровня общей мРНК FoxP3 в Трег пациентов с АИЗ. (Б) Понижение содержания Трег в периферической крови, выраженного в % от CD4⁺ Т-лимфоцитов, у пациентов с АИЗ. ЗД, здоровые доноры. РС, рассеянный склероз. БАС, боковой амиотрофический склероз. БШ, болезнь Шегрена. Черные горизонтальные линии отображают медиану. * – $p < 0,05$ по отношению к Трег ЗД по критерию Манна-Уитни.

3.2. Гомогенность и скорость пролиферации размноженных *ex vivo* регуляторных Т-клеток

Количество Трег, выделенных из периферической крови, недостаточно для проведения дальнейших экспериментов. Для получения большего количества клеток периферические Трег от четырех ЗД и четырех пациентов с РС размножали *ex vivo* в течение 15 дней и оценивали их соответствие выделенным клеткам. Чистота Трег, выделенных из периферической крови, составила 89,1 – 93,6%.

Размноженные *ex vivo* клетки обладали иммунофенотипом Трег: 88,6 – 92,1% клеток имели иммунофенотип CD127^{low} (рис. 16 А, Б), и 96,6 – 97,7% из них были FoxP3-положительными (рис. 16 В, Г) как в группах пациентов, так и в группе ЗД.

Данные результаты демонстрируют гомогенность популяции Трег, размноженных *ex vivo*. Каждые три дня проводили подсчёт общего количества культивированных клеток. Была выявлена разница в скорости пролиферации Трег из группы ЗД и пациентов с РС (рис. 16 Д). Среднее значение количества Трег на третий день культивирования у ЗД составило $(0,56 \pm 0,1) \times 10^6$, у пациентов с РС $(0,41 \pm 0,1) \times 10^6$. На пятнадцатый день культивирования среднее значение количества Трег у ЗД составило $(13,3 \pm 2,5) \times 10^6$, у пациентов с РС $(8,8 \pm 1) \times 10^6$. Таким образом, пониженная пролиферация Трег, характерная для пациентов с РС [2], сохранилась и у

размноженных клеток, что указывает на их соответствие по данному параметру свежесыведенным.

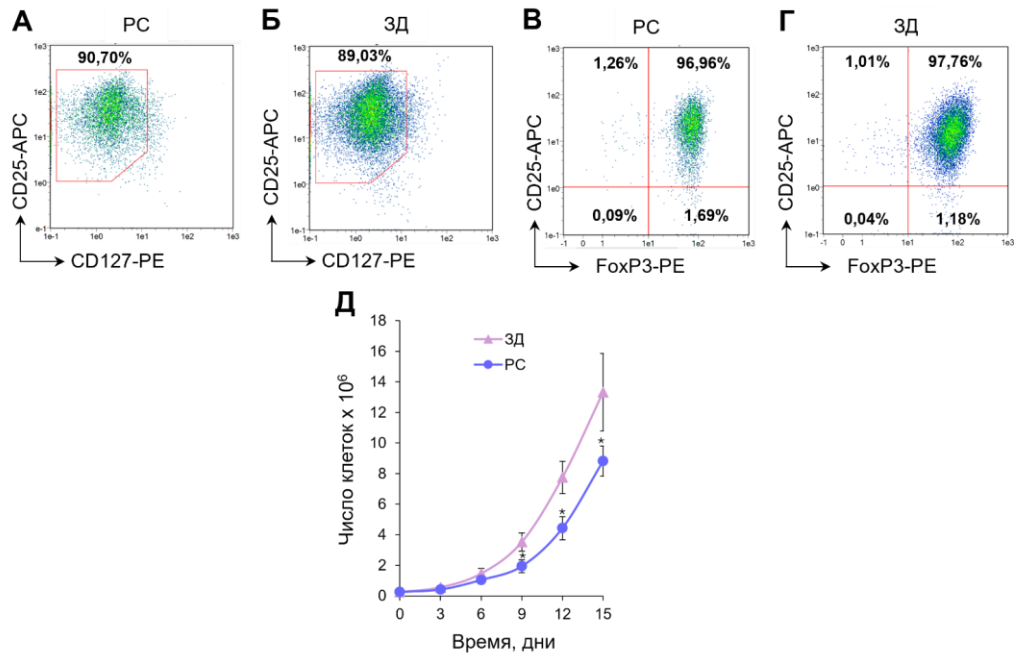


Рисунок 16. Диаграммы проточной цитометрии, демонстрирующие гомогенность размноженных *ex vivo* Трег, полученных от пациентов с РС (А, В) и ЗД (Б, Г). Гомогенность определена путем подсчёта CD127^{low}- и FoxP3 – положительных CD25⁺-клеток. (Д) Общее количество Трег в течение 15 дней культивирования *ex vivo*. N = 4. * – p < 0,05 по отношению к клеткам ЗД по критерию Манна-Уитни.

Культивирование *ex vivo* позволило увеличить количество Трег в 40,4 – 63,2 раза от их первоначального числа для группы ЗД и в 31,2 – 39,9 раза для группы пациентов с РС.

3.3. Отсутствие изменений уровней экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в размноженных *ex vivo* регуляторных Т-клетках

Для доказательства идентичности профилей сплайс-вариантов FoxP3 размноженных Трег исходным клеткам проведено исследование уровней их мРНК. Уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в размноженных *ex vivo* Трег не изменились по сравнению с исходными клетками (рис. 17). Наблюдали преобладание полноразмерного варианта и варианта Δ2 у размноженных Трег здоровых доноров и преобладание делеционных вариантов Δ7 и Δ2Δ7 у Трег пациентов, что согласуется с полученными ранее данными (рис. 14). Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 также был выше среди размноженных Трег из группы ЗД (рис. 17 В), что соответствует данным до *ex vivo* размножения (рис. 15).

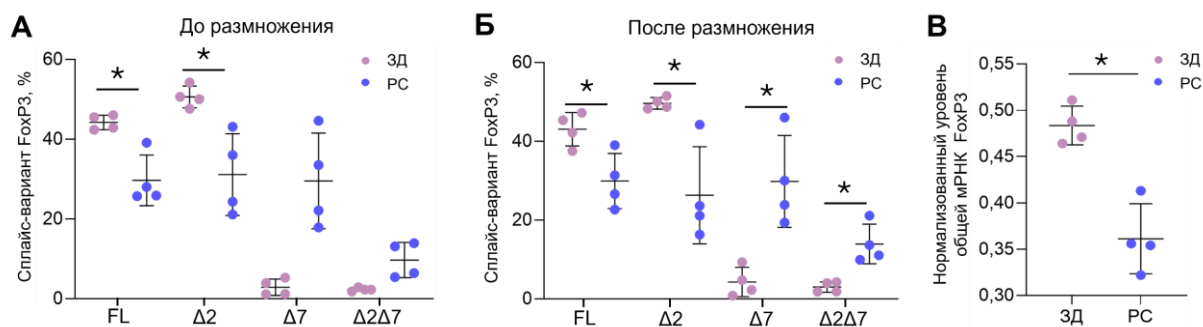


Рисунок 17. Отсутствие изменений уровней экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в размноженных *ex vivo* Трег. Показаны уровни мРНК в клетках до размножения (А) и после (Б) в группе ЗД и в группе пациентов с РС. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни. (В) Пониженная экспрессия общей мРНК FoxP3 в размноженных Трег пациентов с РС по сравнению со ЗД.

Полученные данные выявили отсутствие существенных различий в уровнях экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 между группами клеток до или после размножения *ex vivo*. Размноженные клетки были использованы в дальнейших экспериментах.

3.4. Супрессорная активность размноженных регуляторных Т-клеток

Известно, что супрессорная активность Трег пациентов с РС понижена. Для изучения супрессорной активности размноженных Трег проводили реакцию смешанных лимфоцитов. Трег ЗД подавляли пролиферацию аутологичных $CD4^+CD25^-$ Т-клеток-мишеней в соотношении 1:32 (рис. 18 А, Б).

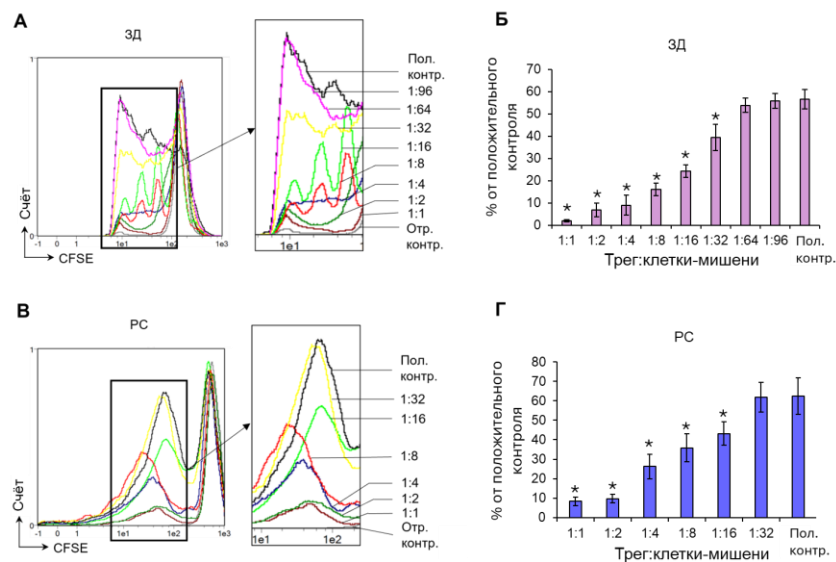


Рисунок 18. Результаты реакции смешанных лимфоцитов размноженных Трег ЗД и пациентов с РС. Показаны (А, В) пролиферативные диаграммы и (Б, Г) гистограммы пролиферативной активности таргетных клеток. Отр. контр. — отрицательный контроль, клетки $CD4^+CD25^-$. Пол. контр. — положительный контроль, клетки $CD4^+CD25^-$, культивируемые совместно с фидерными клетками. N = 4. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Трег пациентов с РС подавляли пролиферацию $CD4^+CD25^-$ Т-клеток-мишеней в соотношении 1:16 (рис. 18 В, Г) и, соответственно, были в два раза менее активными. Таким образом, размноженные Трег у пациентов с РС характеризуются понижением супрессорной активности.

3.5. Подбор размера переключающих сплайсинг олигонуклеотидов

Данное исследование направлено на определение последовательности ПСО, способных наиболее эффективно индуцировать АС пре-мРНК FoxP3 при наибольшей эффективности трансфекции клеток. Трансфекцию размноженных Трег, полученных от четырех ЗД, осуществляли ПСО длиной 24, 30, 36 или 42 нуклеотидов (рис. 19), комплементарными регуляторным последовательностям пре-мРНК FoxP3, а также контрольными (неспецифическими) олигонуклеотидами.

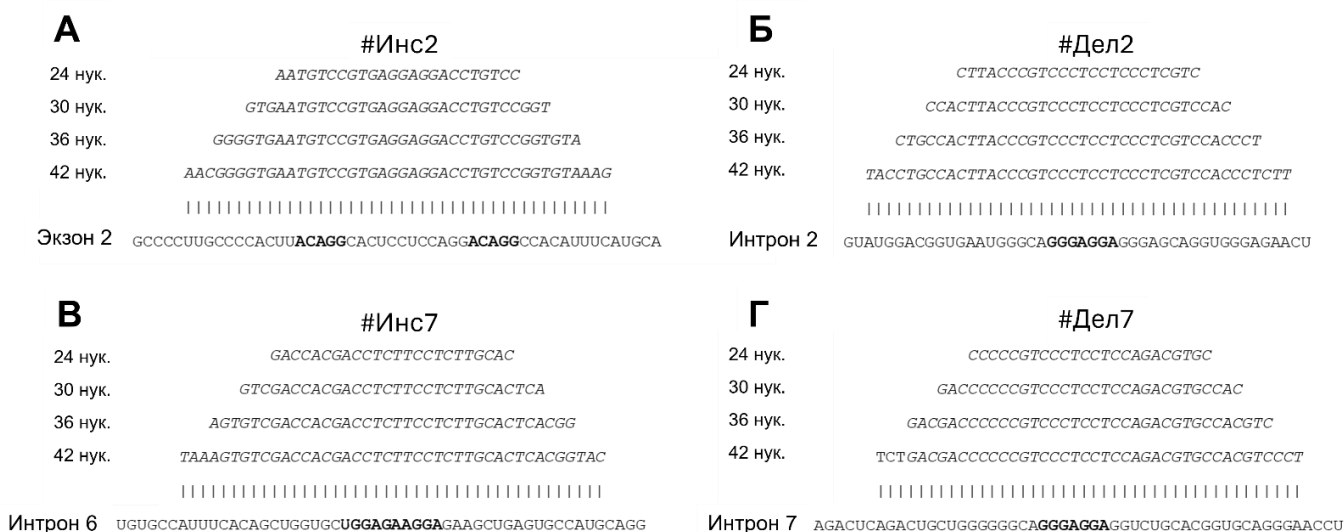


Рисунок 19. Нуклеотидные последовательности ПСО, применяемые для трансфекции Трег. Представлены последовательности из 24, 30, 36 или 42 нуклеотидов, комплементарные сплайс-регулирующим участкам (показаны жирным шрифтом). (А) Последовательности #Инс2, способного индуцировать включение экзона 2. (Б) Последовательности #Дел2, способного индуцировать делецию экзона 2. (В) Последовательности #Инс7, способного индуцировать включение (инсерцию) экзона 7. (Г) Последовательности #Дел7, способного индуцировать делецию экзона 7. Нук. – нуклеотиды.

Наблюдали уменьшение эффективности трансфекции при увеличении размера ПСО #Инс2 (рис. 20 А). Эффективность трансфекции упала до $52,12 \pm 8,32\%$ при увеличении размера ПСО до 42 нуклеотидов. При этом уровень мРНК участка со вставкой экзона 2 (обозначен как + экзон 2 на рис. 20 А) увеличивался с увеличением размера ПСО, и достигал максимальных

значений при использовании ПСО размером 36 и 42 нуклеотида. Это указывает на более высокую специфичность и способность индуцировать сплайсинг у ПСО большего размера.

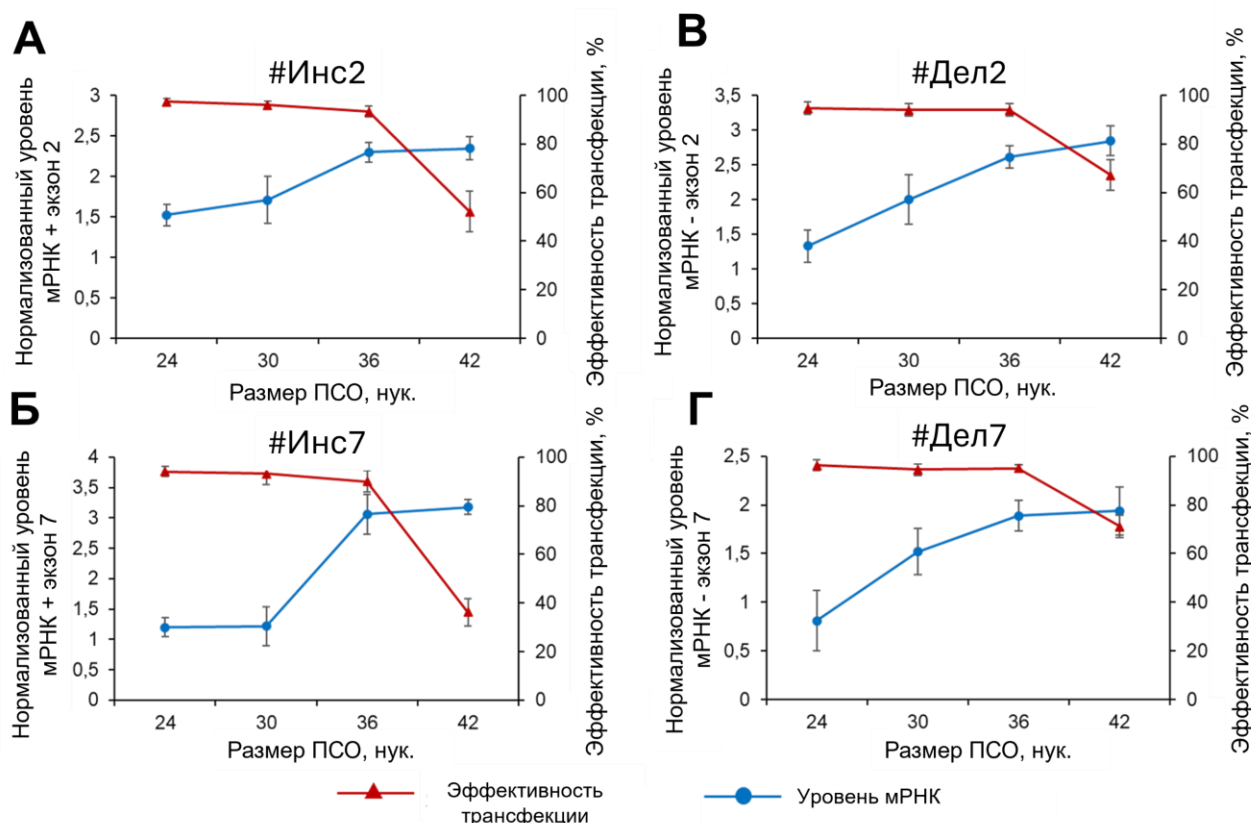


Рисунок 20. Нормализованные уровни мРНК сайтов сплайсинга FoxP3 и эффективность трансфекции клеток. Уровни мРНК и эффективность трансфекции определены через 24 часа после трансфекции клеток ПСО различной длины (А) ПСО #Инс2, (Б) ПСО #Инс7, (В) ПСО #Дел2 и (Г) ПСО #Дел7.

Аналогично с трансфекцией #Инс2 наблюдали резкое падение эффективности трансфекции до $36,25 \pm 5,63\%$ при использовании ПСО #Инс7 размером 42 нуклеотида (рис. 20 Б). Уровень мРНК участка со вставкой экзона 7 (обозначен как + экзон 7 на рис. 20 Б) был максимальный у Трег, трансфицированных ПСО размером 36 и 42 нуклеотида. Наименьшая эффективность трансфекции ($67,18 \pm 6,32\%$) была у клеток, трансфицированных ПСО #Дел2 размером 42 нуклеотида (рис. 20 В). Уровень мРНК участка с делецией экзона 2 (обозначен как – экзон 2 на рис. 20 В) был максимальный у Трег, трансфицированных #Дел2 размером 36 и 42 нуклеотида. Наименьшая эффективность трансфекции ($71,06 \pm 4,58\%$) была у клеток, трансфицированных ПСО #Дел7 размером 42 нуклеотида (рис. 20 Г). Уровень мРНК участка с делецией экзона 7 (обозначен как – экзон 7 на рис. 20 Г) был максимальный у Трег, трансфицированных #Дел7 размером 36 и 42 нуклеотида. Таким образом, наиболее

оптимальными ПСО для модуляции АС на всех исследуемых участках пре-мРНК FoxP3 были таковые размером 36 нуклеотидов.

3.6. Подбор комбинации переключающих сплайсинг олигонуклеотидов для селективной экспрессии индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3

3.6.1. Трансфекция регуляторных Т-клеток одиночным переключающим сплайсинг олигонуклеотидом, модулирующим альтернативный сплайсинг экзона 2 или 7

Трег четырех 3Д трансфицировали одиночным ПСО размером 36 нуклеотидов и исследовали экспрессию сплайс-вариантов FoxP3 через четыре дня после трансфекции.

На рисунках 21 и 22 приведены схемы модуляции АС экзонов 2 и 7 с помощью ПСО размером 36 нуклеотидов.

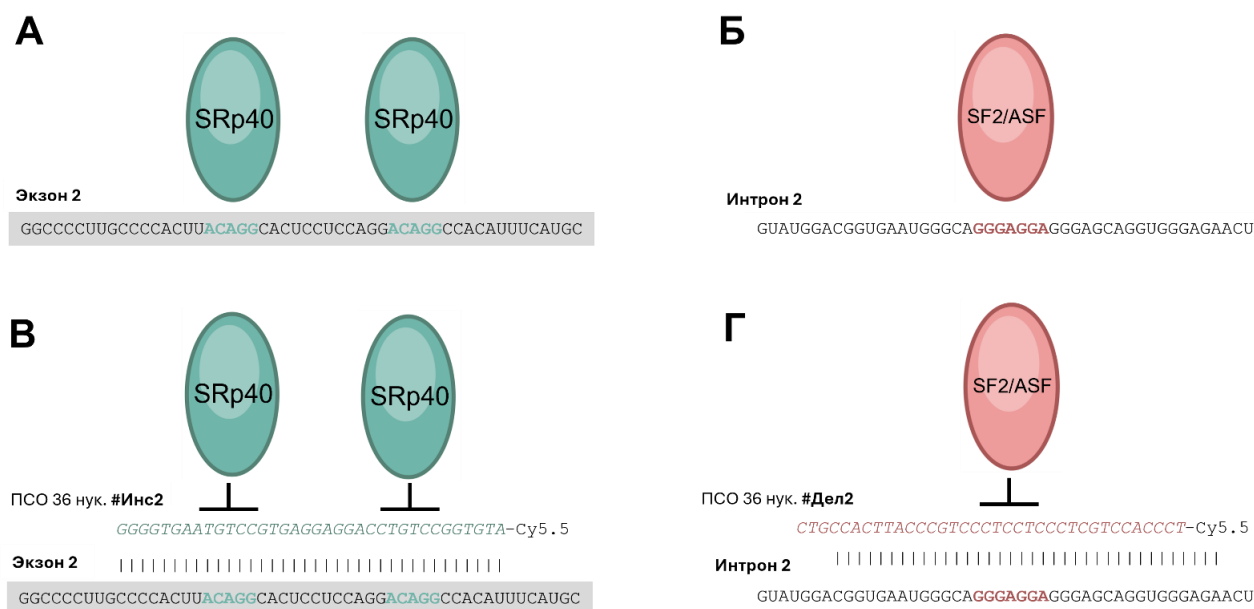


Рисунок 21. Модуляция АС экзона 2 пре-мРНК FoxP3 ПСО. (А) Белки-регуляторы сплайсинга SRp40 (показаны зелеными эллипсами) взаимодействуют с сайтами связывания (показаны зеленым шрифтом) в участке экзона 2 и отвечают за ингибирование включения (инсерции) экзона 2. (Б) Белки-регуляторы сплайсинга SF2/ASF (показаны красным эллипсом) взаимодействуют с сайтом связывания (показан бордовым шрифтом) в участке интрона 2 и отвечают за ингибирование делеции экзона 2. (В) Трансфекция Трег 36-нуклеотидным ПСО #Инс2 (показан зеленым курсивом) блокирует связывание SRp40 с чувствительными цис-элементами на пре-мРНК и индуцирует инсерцию экзона 2. (Г) Трансфекция Трег 36-нуклеотидным ПСО #Дел2 (показан бордовым курсивом) блокирует связывание SF2/ASF с чувствительным цис-элементом на пре-мРНК и вызывает делецию экзона 2.

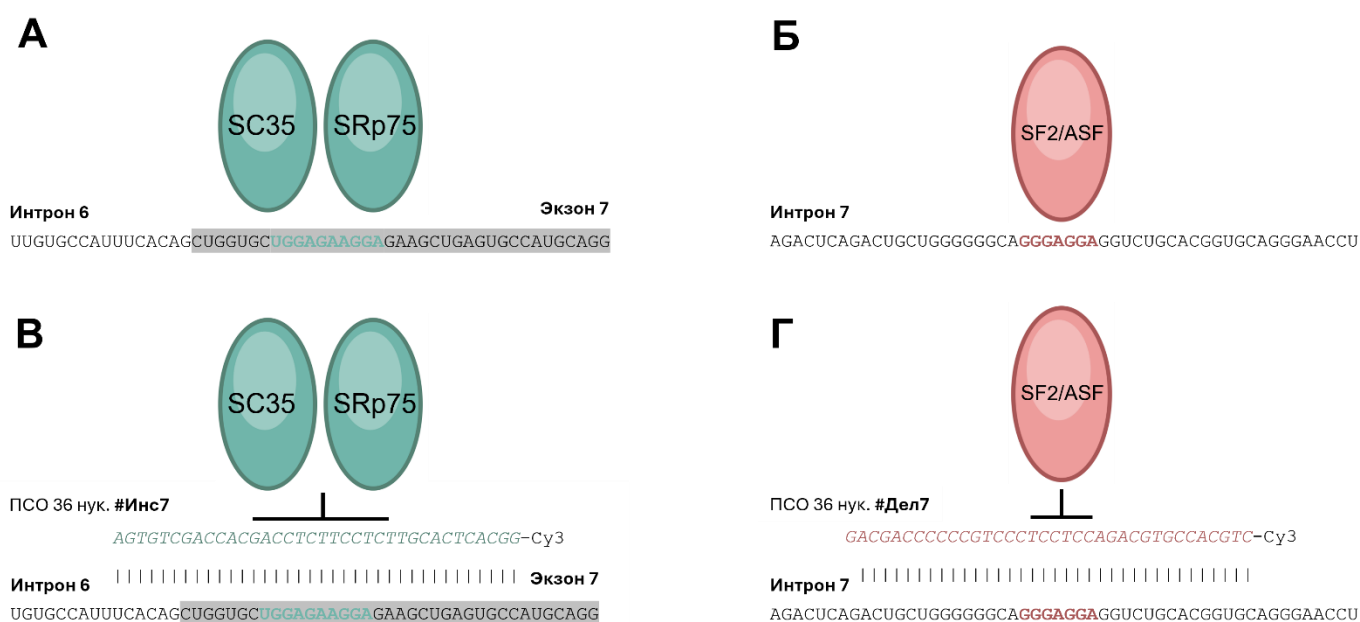


Рисунок 22. Модуляция АС экзона 7 пре-мРНК FoxP3 ПСО. (А) Белки-регуляторы сплайсинга SC35 и SRp75 (показаны зелеными эллипсами) взаимодействуют с сайтами связывания (показаны зеленым шрифтом) в участке экзона 7 и отвечают за ингибирование включения (инсерции) экзона 7. (Б) Белки-регуляторы сплайсинга SF2/ASF (показаны красным эллипсом) взаимодействуют с сайтом связывания (показан бордовым шрифтом) в участке интрона 7 и отвечают за ингибирование делеции экзона 7. (В) Трансфекция Трег 36-нуклеотидным ПСО #Инс7 (показан зеленым курсивом) блокирует связывание SC35 и SRp75 с чувствительными цис-элементами на пре-мРНК и индуцирует вставку экзона 7. (Г) Трансфекция Трег 36-нуклеотидным ПСО #Дел7 (показан бордовым курсивом) блокирует связывание SF2/ASF с чувствительным цис-элементом на пре-мРНК и вызывает делецию экзона 7.

Эффективность трансфекции контролировали каждые 24 часа (рис. 23).

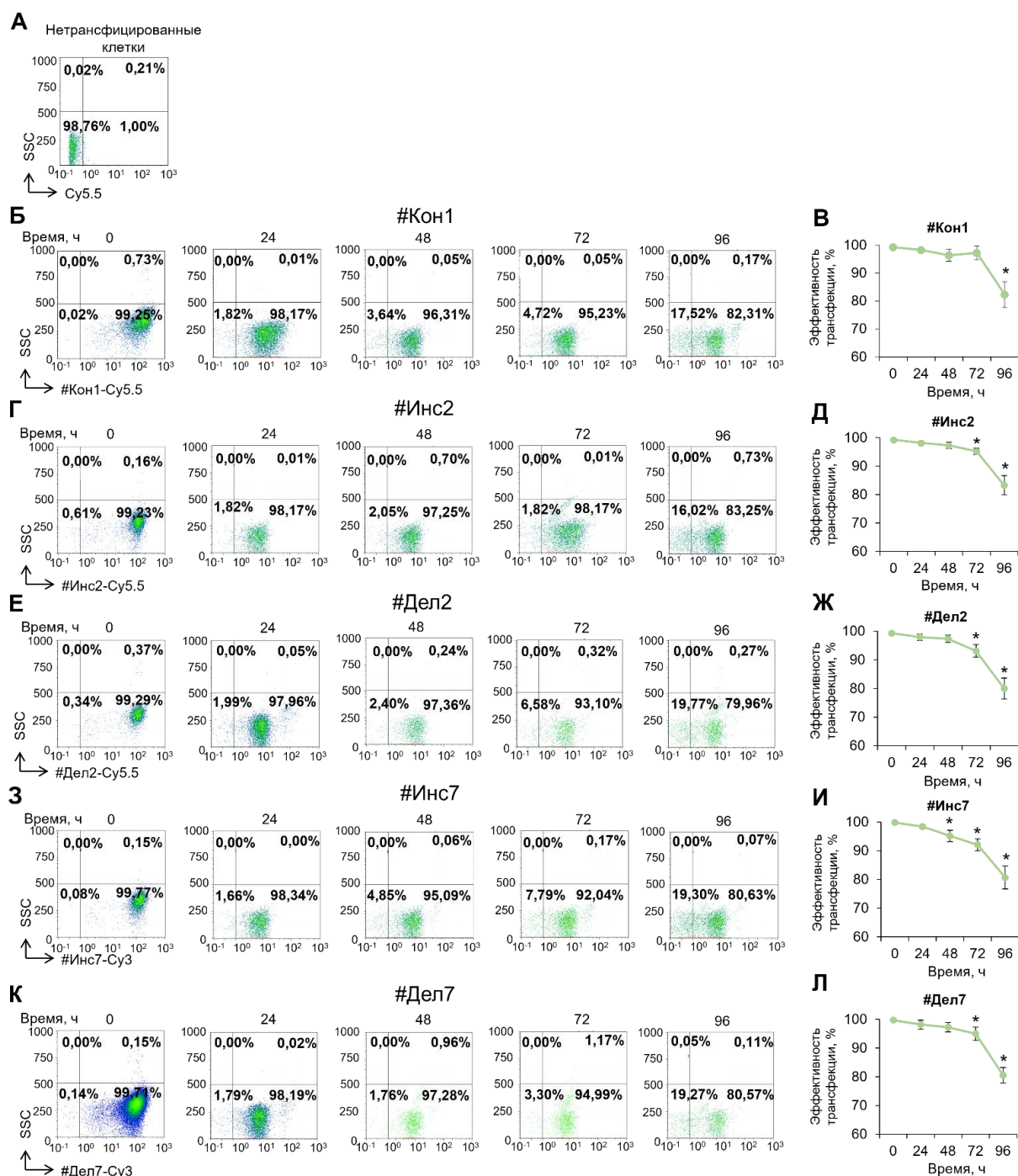


Рисунок 23. Эффективность трансфекции Трег отдельными ПСО, модулирующими АС экзона 2 или 7. Диаграммы проточной цитометрии клеток, трансфицированных ПСО, мечеными Су3 или Су5.5, в течение 96 ч после трансфекции: (А) нетрансфицированные клетки; (Б) клетки, трансфицированные контрольным неспецифическим олигонуклеотидом #Кон1; (Г) клетки, трансфицированные олигонуклеотидом #Инс2, индуцирующим включение экзона 2; (Е) клетки, трансфицированные олигонуклеотидом #Дел2, индуцирующим делецию экзона 2; (З) клетки, трансфицированные олигонуклеотидом #Инс7, индуцирующим включение экзона 7; (К) клетки, трансфицированные олигонуклеотидом #Дел7, индуцирующим делецию экзона 7. (В, Д, Ж, И, Л) Эффективность трансфекции. N = 4. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Использование одиночного ПСО оказало влияние на сплайсинг целевого экзона. ПСО #Инс2 индуцировал включение экзона 2, и преобладающим сплайс-вариантом был FoxP3FL (рис. 24 В), в то время как сплайс-вариант FoxP3Δ2 был обнаружен на очень низком уровне. Сплайс-вариант FoxP3Δ2Δ7 не был обнаружен. ПСО #Дел2 индуцировал делецию экзона 2, и преобладающим сплайс-вариантом был FoxP3Δ2 (рис. 24 Г). Сплайс-варианты FoxP3FL и FoxP3Δ7 экспрессировались на очень низких уровнях. ПСО #Дел2 не оказал влияния на уровень мРНК сплайс-варианта FoxP3Δ2Δ7. ПСО #Инс7 индуцировал включение экзона 7, и преобладающими сплайс-вариантами были FoxP3FL и FoxP3Δ2 (рис. 24 Д), в то время как варианты с делециями экзона 7 (FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7) не были обнаружены. ПСО #Дел7 индуцировал делецию экзона 7, в результате чего повысился уровень экспрессии сплайс-варианта FoxP3Δ7. Сплайс-вариант FoxP3FL был обнаружен в незначительном количестве (рис. 24 Е). Трансфекция ПСО #Дел7 не оказала влияния на уровень мРНК сплайс-вариантов с делецией экзона 2 (FoxP3Δ2 и FoxP3Δ2Δ7), экспрессия которых не изменилась по сравнению с нетрансфицированными клетками. Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 в нетрансфицированных Трег и Трег, трансфицированных контрольным ПСО, представлена на рис. 24 (А, Б).

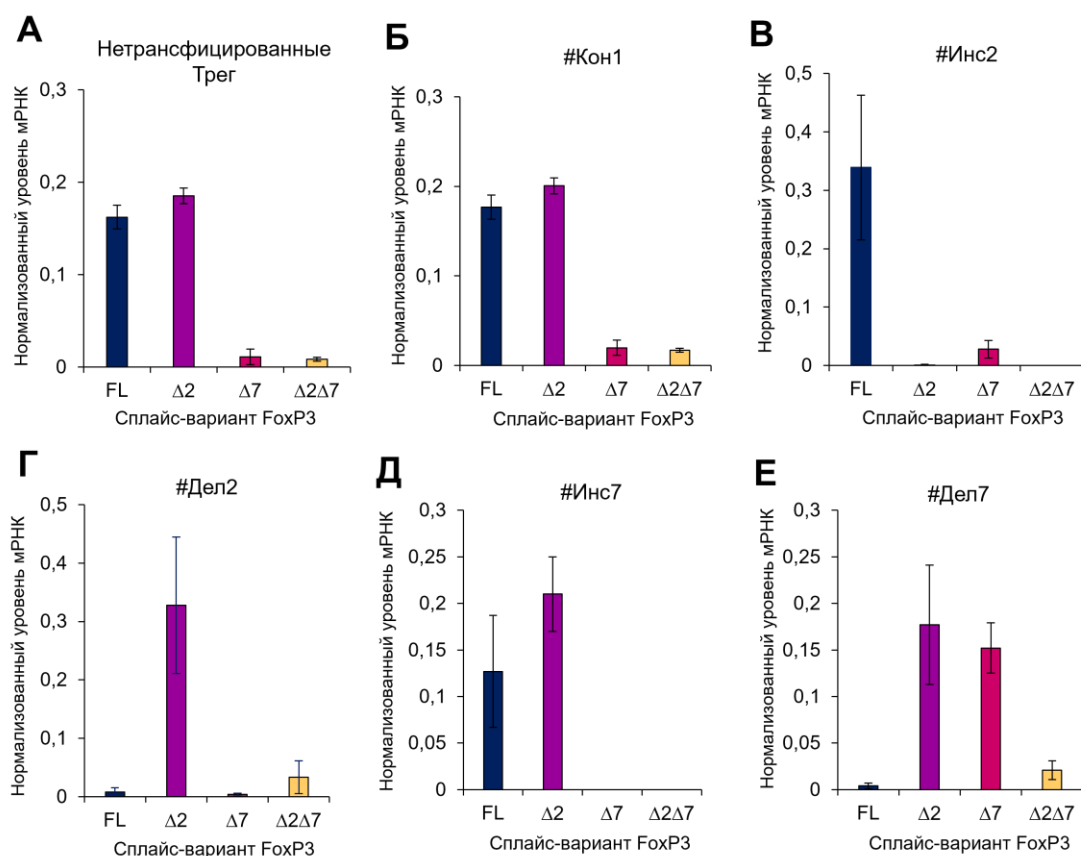


Рисунок 24. Уровень мРНК сплайс-вариантов FoxP3 в (А) нетрансфицированных Трег; Трег, трансфицированных (Б) контрольным неспецифическим олигонуклеотидом #Кон1, (В) ПСО #Инс2, (Г) ПСО #Дел2, (Д) ПСО #Инс7, (Е) ПСО #Дел7 через 96 ч после трансфекции. N = 4.

Данные результаты показали, что использование одиночного ПСО, модулирующего АС 2 или 7 экзона пре-мРНК FoxP3, не позволяет получить линию Трег, селективно экспрессирующих индивидуальный сплайс-вариант.

3.6.2. Селективная экспрессия индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 в регуляторных Т-клетках после трансфекции парой переключающих сплайсинг олигонуклеотидов

Учитывая результаты предыдущих экспериментов, было решено провести трансфекцию Трег двумя ПСО, модулирующими АС как 2, так и 7 экзона. Эффективность трансфекции оценивали каждые 24 часа (рис. 25).

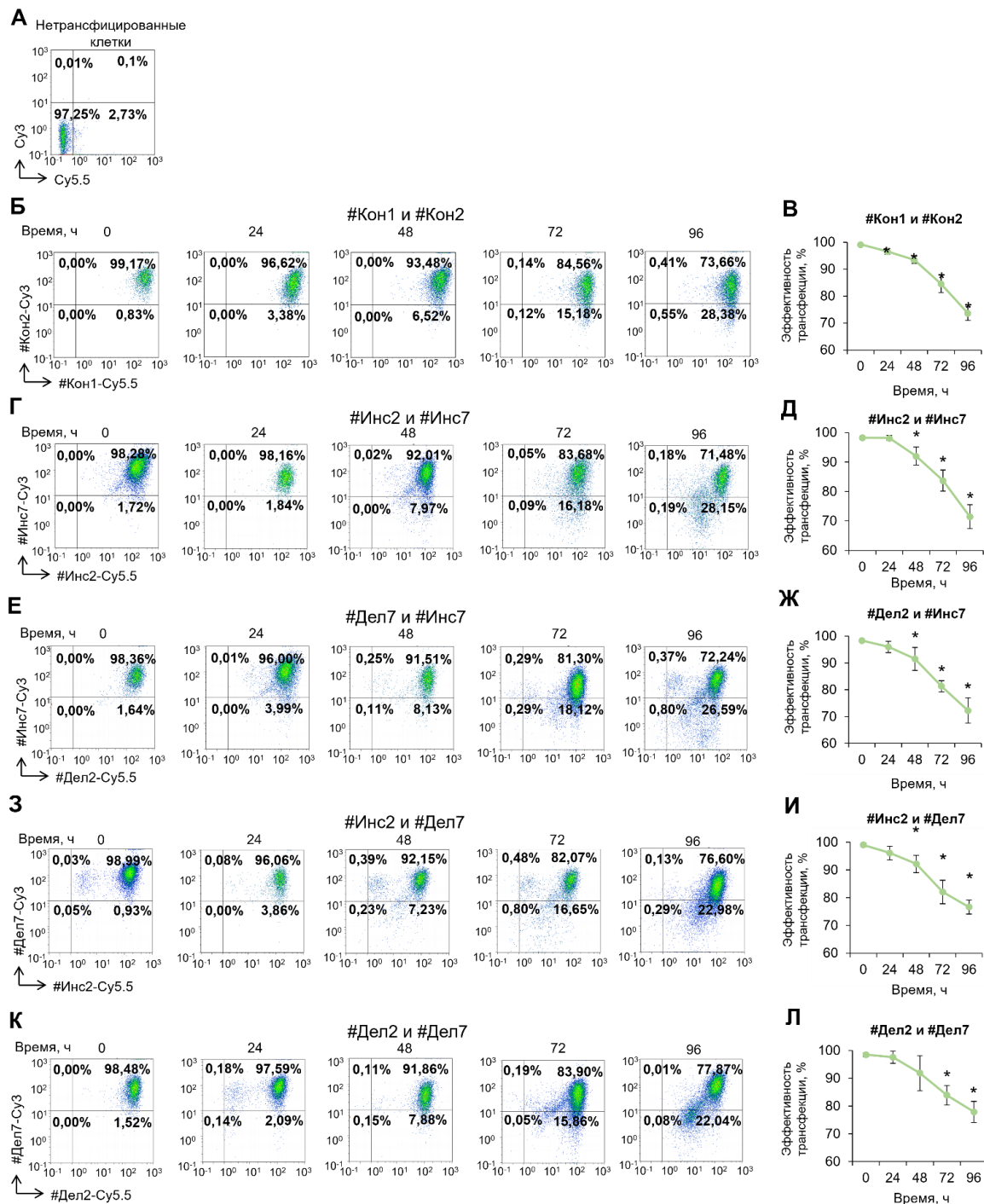


Рисунок 25. Эффективность трансфекции Трег двумя ПСО, модулирующими АС экзонов 2 и 7. Графики проточной цитометрии клеток, трансфицированных ПСО, мечеными Су3 или Су5.5, в течение 96 ч после трансфекции: (А) нетрансфицированные клетки; клетки, трансфицированные (Б) контрольными неспецифическими олигонуклеотидами #Кон1 и #Кон2; (Г) #Инс2, индуцирующим инсерцию экзона 2 и #Инс7, индуцирующим включение экзона 7 (Е) #Дел2, индуцирующим делецию экзона 2 и #Инс7, индуцирующим включение экзона 7; (З) #Инс2, индуцирующим инсерцию экзона 2 и #Дел7, индуцирующим делецию экзона 7; (К) #Дел2, индуцирующим делецию экзона 2 и #Дел7, индуцирующим делецию экзона 7; (В, Д, Ж, И, Л) Эффективность трансфекции. N = 4. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни по отношению ко клеткам в 0 ч.

Трансфекция клеток двумя ПСО, индуцирующими включение экзона 2 (#Инс2) и экзона 7 (#Инс7), привела к селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL, в то время как варианты с делециями экзонов экспрессировались на очень низком уровне или не были обнаружены вообще (рис. 26 Б).

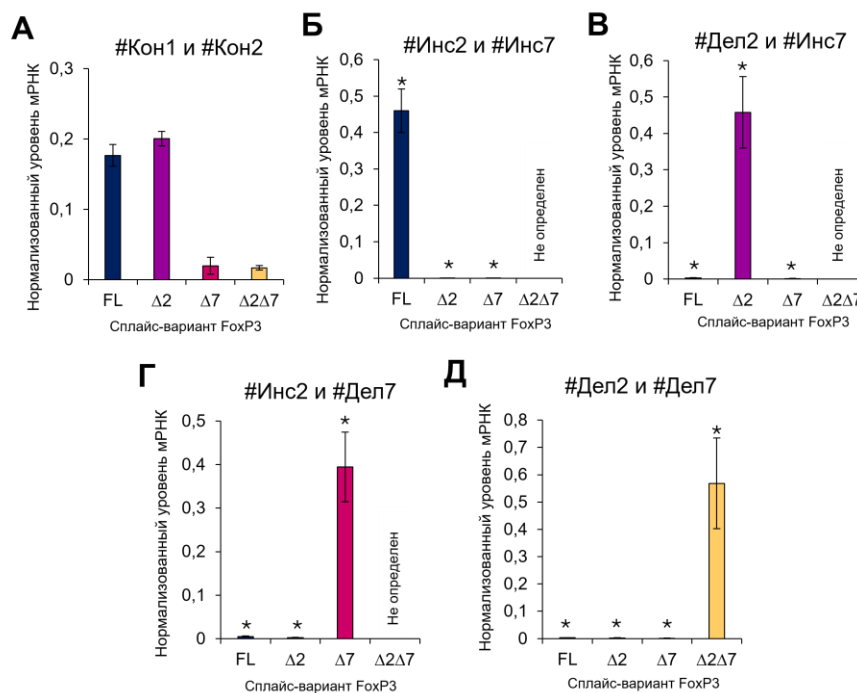


Рисунок 26. Модуляция сплайсинга пре-мРНК FoxP3 двумя ПСО, регулируемыми АС экзонов 2 и 7. Уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 в Трег через 96 ч после трансфекции (А) контрольными неспецифическими нуклеотидами #Кон1 и #Кон2; (Б) ПСО #Инс2 и #Инс7, индуцирующими экспрессию FoxP3FL; (В) ПСО #Дел2 и #Инс7, индуцирующими экспрессию FoxP3Δ2; (Г) ПСО #Инс2 и #Дел7, индуцирующими экспрессию FoxP3Δ7; (Д) ПСО #Дел2 и #Дел7, индуцирующими экспрессию FoxP3Δ2Δ7. N = 4. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

В Трег, трансфицированных ПСО, индуцирующим делецию экзона 2 (#Дел2) и ПСО #Инс7, был селективно экспрессирован сплайс-вариант FoxP3 Δ 2 (рис. 26 В). Трансфекция Трег ПСО #Инс2 и ПСО #Дел7, способным индуцировать делецию экзона 7, позволила добиться селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3 Δ 7 (рис. 26 Г). Трансфекция клеток двумя ПСО, индуцирующими делецию обоих экзонов (#Дел2 и #Дел7), привела к селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3 Δ 2 Δ 7 (рис. 26 Д).

На рисунке 27 приведены результаты экспрессии общей мРНК FoxP3 в трансфицированных Трег, демонстрирующие отсутствие изменений уровня общей мРНК FoxP3 после трансфекции двумя ПСО.

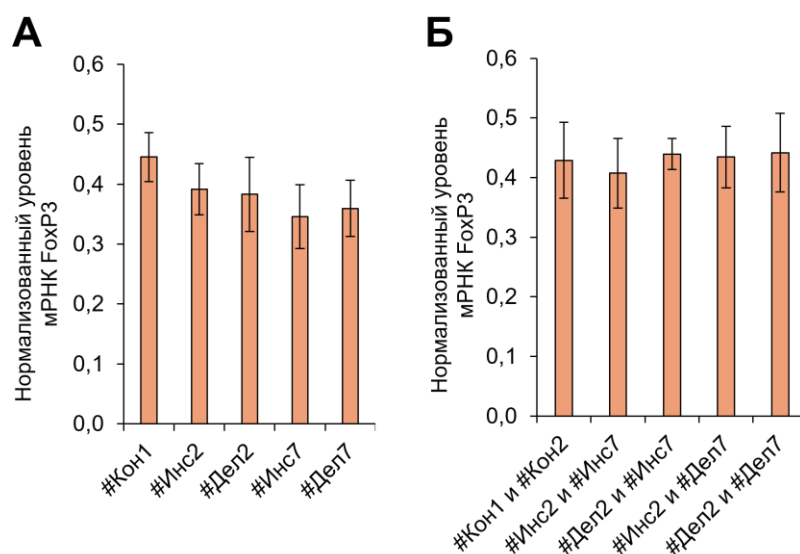


Рисунок 27. Экспрессия общей мРНК FoxP3 в Трег, трансфицированных ПСО или контрольными олигонуклеотидами. Трег трансфицированные (А) одиночным ПСО, модулирующим АС экзона 2 или экзона 7, или (Б) парой ПСО, модулирующими АС обоих экзонов. N = 4.

Результаты оценки экспрессии мРНК сплайс-вариантов FoxP3 были подтверждены с помощью вестерн-блоттинга (рис. 28). Используя антитела к FoxP3 (клон 259D, распознающий общий для всех сплайс-вариантов эпитоп после экзона 2, и клон 150D, специфичный экзону 2), было показано отсутствие белковых форм сплайс-вариантов FoxP3 с делецией экзона 2 (FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 2 Δ 7) в клетках, трансфицированных соответствующими ПСО.

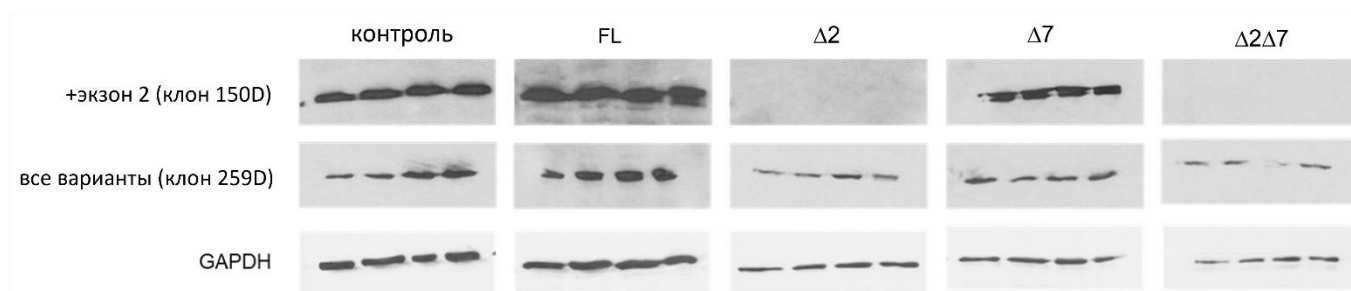


Рисунок 28. Результаты вестерн-блоттинга белковых форм сплайс вариантов FoxP3 в Трег, трансфицированных ПСО.

Результаты данного эксперимента показали, что подход, основанный на использовании двух ПСО, модулирующих АС 2 и 7 экзонов, позволяет получить Трег, селективно экспрессирующие индивидуальный сплайс-вариант FoxP3.

3.7. Пролиферативная активность регуляторных Т-клеток с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3

Пролиферативную активность Трег, трансфицированных двумя ПСО и экспрессирующих индивидуальный сплайс-вариант FoxP3, контролировали каждые 24 ч.

Подсчёт общего количества клеток в процессе пролиферации показал, что Трег, селективно экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3^{FL}, имели повышенную интенсивность пролиферации, и через 96 ч после трансфекции количество клеток составило $(5,05 \pm 0,39) \times 10^7$ по сравнению с $(3,05 \pm 0,20) \times 10^7$ контрольных клеток (рис. 29 А).

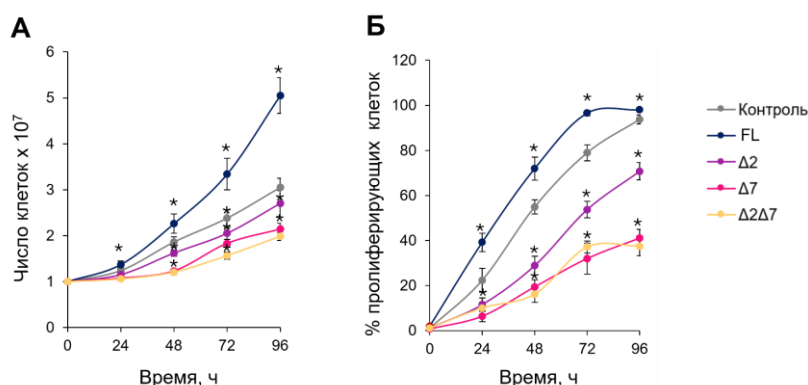


Рисунок 29. Пролиферативная активность Трег, селективно экспрессирующих индивидуальный сплайс-вариант FoxP3. (А) Пролиферативная активность (количество клеток) в течение четырёх дней культивирования после трансфекции, демонстрирующая повышенную пролиферативную активность клеток, с экспрессией FoxP3^{FL}, и пониженную пролиферативную активность клеток с делециями экзонов. (Б) Процент пролиферирующих клеток в течение четырех дней культивирования после трансфекции. N = 4. * – $p < 0,05$ по отношению к контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Клетки, селективно экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3 Δ 2, обладали более низкой способностью к пролиферации, и через 96 ч их количество не отличалось от количества контрольных клеток ($2,70 \pm 0,28 \times 10^7$). Трансфекция Трег #Инс2 и #Дел7 и #Дел2 и #Дел7 привела к значительному снижению интенсивности пролиферации; количество Трег, селективно экспрессирующих FoxP3 Δ 7 составило $(2,14 \pm 0,13) \times 10^7$ клеток, а количество Трег, селективно экспрессирующих FoxP3 Δ 2 Δ 7 составило $(1,98 \pm 0,09) \times 10^7$ клеток.

На основе данных о количестве клеток в процессе пролиферации был сделан расчёт частоты деления Трег с индивидуальными сплайс-вариантами FoxP3 (таблица 10).

Интенсивность пролиферации клеток в популяции и деление отдельных клеток могут не совпадать, поскольку популяция может содержать определенное количество клеток, не способных к делению или медленно делящихся клеток. Трансфицированные Трег метили витальным красителем CFSE и измерили процент пролиферирующих клеток методом проточной цитометрии. Индукция экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL привела к значительному увеличению доли пролиферирующих клеток. Через 96 ч после трансфекции $98,04 \pm 1,02\%$ клеток (рис. 30 Б) прошли циклы деления по сравнению с $93,83 \pm 2,02\%$ контрольных клеток (рис. 30 А). Индукция экспрессии сплайс-варианта FoxP3 Δ 2 привела к подавлению пролиферации клеток через 96 ч, и $70,78 \pm 3,87\%$ популяции клеток делились (рис. 30 В). Делеция экзона 7 приводила к резкому снижению доли пролиферирующих клеток: $41,14 \pm 3,86\%$ Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 7 (рис. 30 Г) и $37,15 \pm 4,34\%$ Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 2 Δ 7 (рис. 30 Д) прошли циклы деления.

Таблица 10. Частота делений Трег, экспрессирующих индивидуальный сплайс-вариант FoxP3.

Трег	Частота деления в сутки
Контрольные	0,40
FL	0,58
Δ 2	0,36
Δ 7	0,27
Δ 2 Δ 7	0,25

Графики проточной цитометрии пролиферации меченых клеток, трансфицированных ПСО, представлены на рисунке 30.

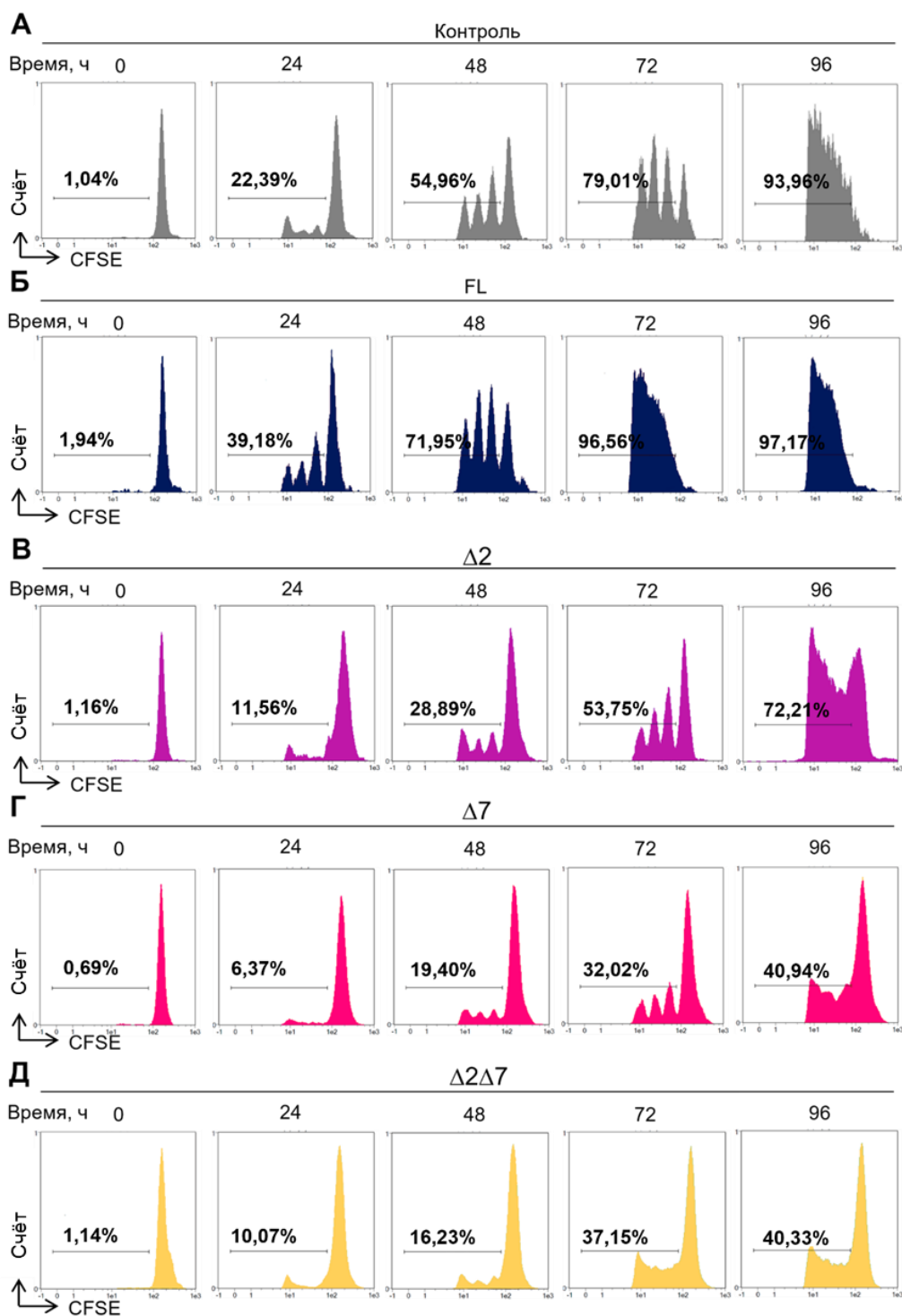


Рисунок 30. Проплиферация трансфицированных Трег. Графики проточной цитометрии пролиферирующих Трег (А) контрольных; экспрессирующих (Б) FoxP3FL; (В) FoxP3 $\Delta 2$; (Г) FoxP3 $\Delta 7$; (Д) FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$.

Процедура трансфекции и/или селективная экспрессия индивидуального сплайс-варианта FoxP3 может вызывать гибель клеток. Жизнеспособность клеток в течение 96 ч после трансфекции отслеживали с помощью окрашивания PI. Наблюдали значительную индукцию гибели клеток только через 24 ч (до 10,12%) и через 48 ч (до 6,46%, рис. 31).

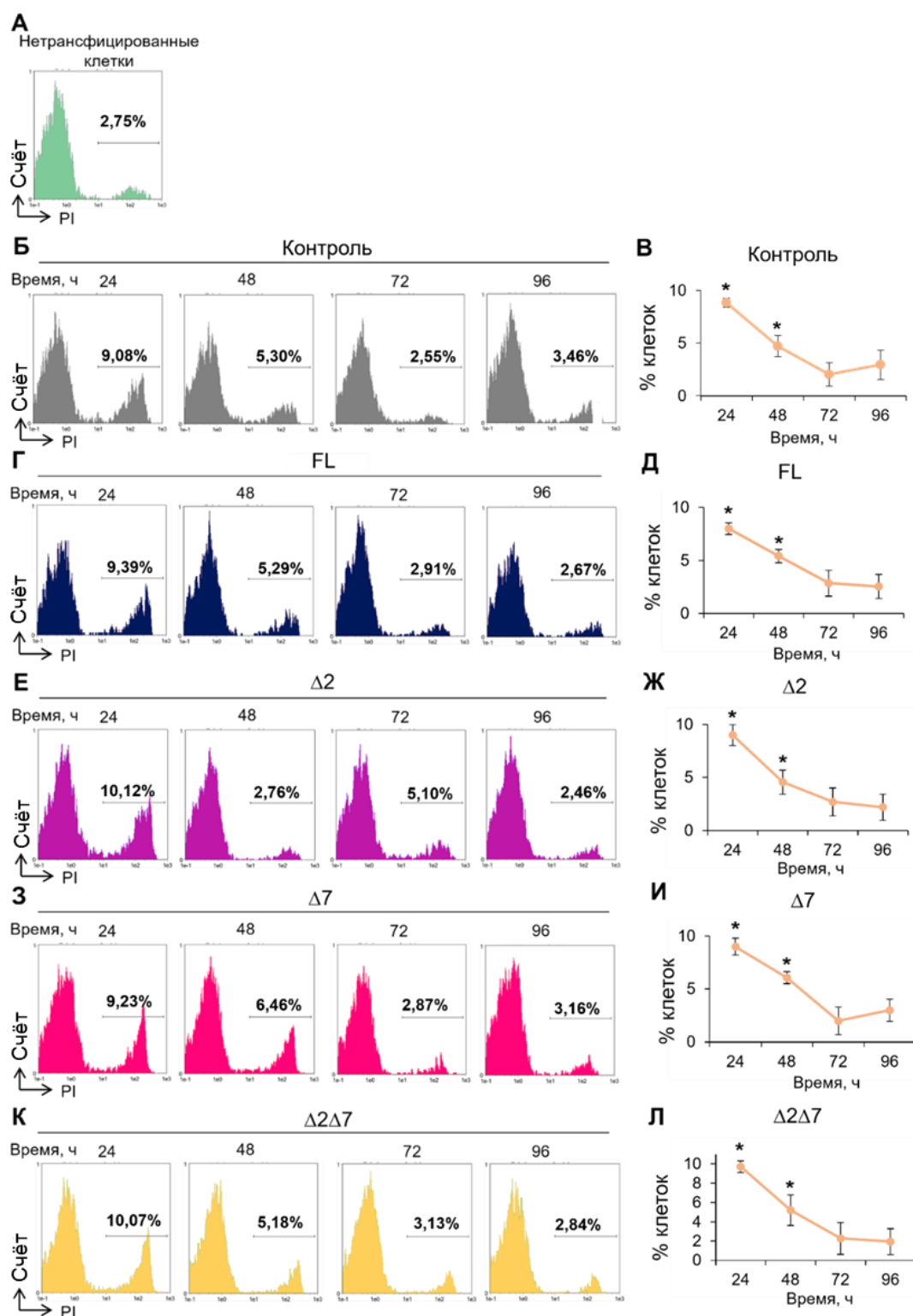


Рисунок 31. Мониторинг клеточной гибели с помощью окрашивания PI. Графики проточной цитометрии, отображающие процент PI-положительных клеток в течение 96 ч после трансфекции. (А): нетрансфицированные Трег; (Б) контрольные Трег; Трег, экспрессирующие (Г) FoxP3FL; (Е) FoxP3 $\Delta 2$; (З) FoxP3 $\Delta 7$; (К) FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$; (В, Д, Ж, И, Л) процент PI-положительных клеток. N = 4. * – $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни по отношению к нетрансфицированным клеткам.

Процент PI-положительных клеток через 72 или 96 ч не отличался от нетрансфицированных клеток. Этот результат отображает токсичность процедуры трансфекции, но не влияние селективной экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 на клеточную гибель.

Морфологию клеток изучали с помощью инвертированного микроскопа. Были обнаружены различия в особенностях пролиферации трансфицированных Трег. Контрольные клетки образовывали клеточные агрегаты размером 60 – 80 мкм (рис. 32). Трег, экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3FL образовывали больше агрегатов размером до 120 мкм. Делеция экзона 2 приводила к образованию меньшего количества агрегатов с меньшими размерами, примерно 50 мкм и менее. Трег с делециями экзона 7 (экспрессирующие FoxP3 Δ 7 и FoxP3 Δ 2 Δ 7) не были способны образовывать агрегаты.

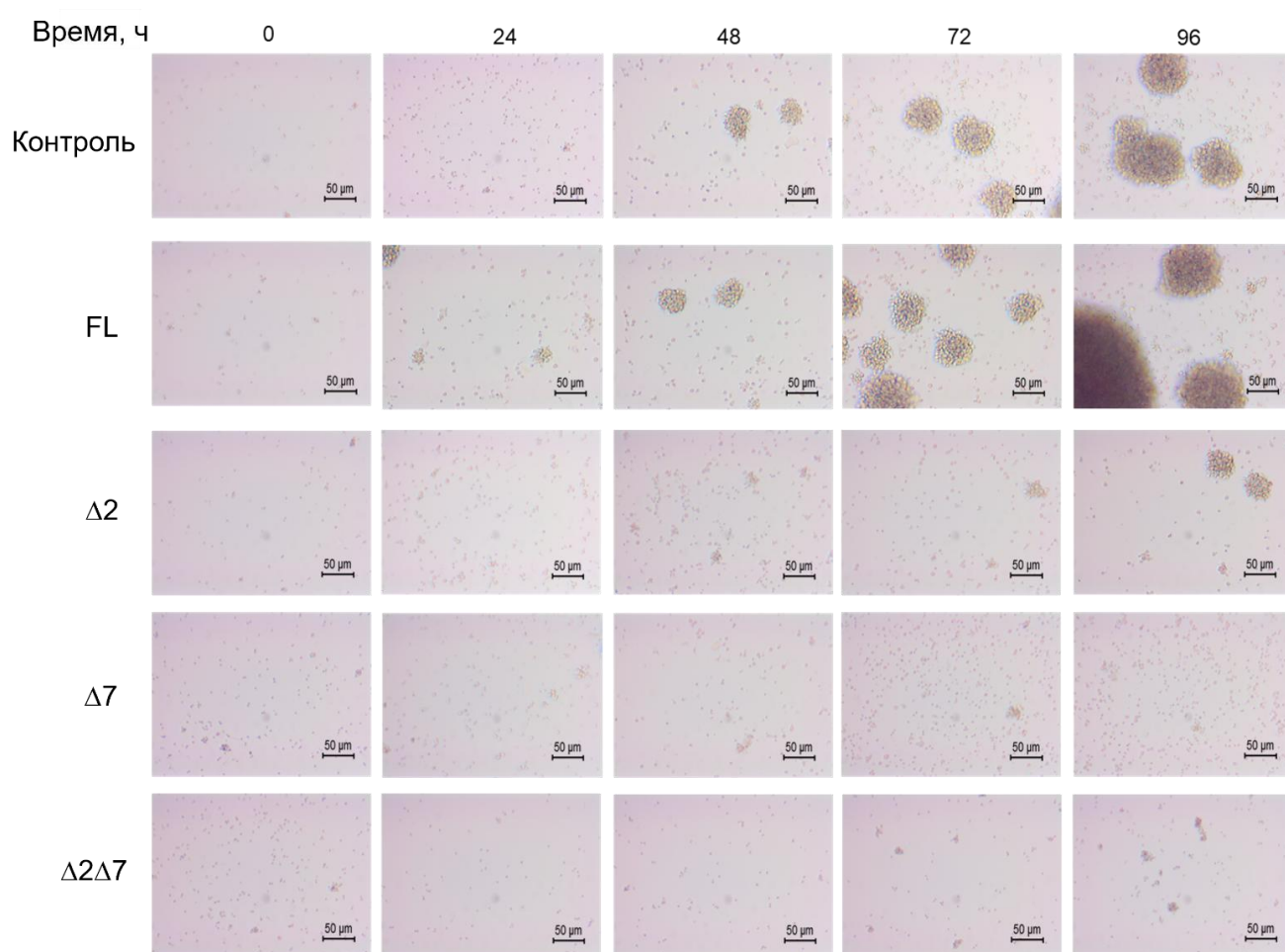


Рисунок 32. Динамика пролиферации Трег, трансфицированных олигонуклеотидами, в течение 96 ч культивирования. Микрофотографии пролиферирующих клеток при 200-кратном увеличении.

Измерение размера отдельных клеток с помощью клеточного анализатора показало, что Трег с делециями обоих экзонов 2 и 7 имели меньший диаметр, чем клетки, трансфицированные другими нуклеотидами (таблица 11), в то время как средняя округлость отдельных клеток не изменилась.

Таблица 11. Средний диаметр и округлость Трег через 96 ч после трансфекции.

Трег	Средний диаметр, мкм	Средняя округлость
Контроль	10,65	0,89
FL	10,64	0,88
$\Delta 2$	10,84	0,86
$\Delta 7$	10,24	0,85
$\Delta 2\Delta 7$	7,76	0,86

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о повышении пролиферативной активности Трег при индукции селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL.

3.8. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3

Супрессорную активность Трег с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 оценивали с помощью реакции смешанных лимфоцитов. Контрольные клетки подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:32 (рис. 33 А). Супрессорная активность Трег, экспрессирующих FoxP3FL, была в три раза выше, поскольку они могли подавлять клетки-мишени в соотношении 1:96 (рис. 33 Б). Понижение супрессорной активности наблюдалось при делеции экзонов. Трег, экспрессирующие FoxP3 $\Delta 2$ подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:16 (рис. 33 В). Трег, экспрессирующие FoxP3 $\Delta 7$ подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:8 (рис. 33 Г). Наиболее выраженное понижение супрессорной активности наблюдали при делеции обоих экзонов 2 и 7. Трег, экспрессирующие FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$ подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:1 (рис. 33 Д).

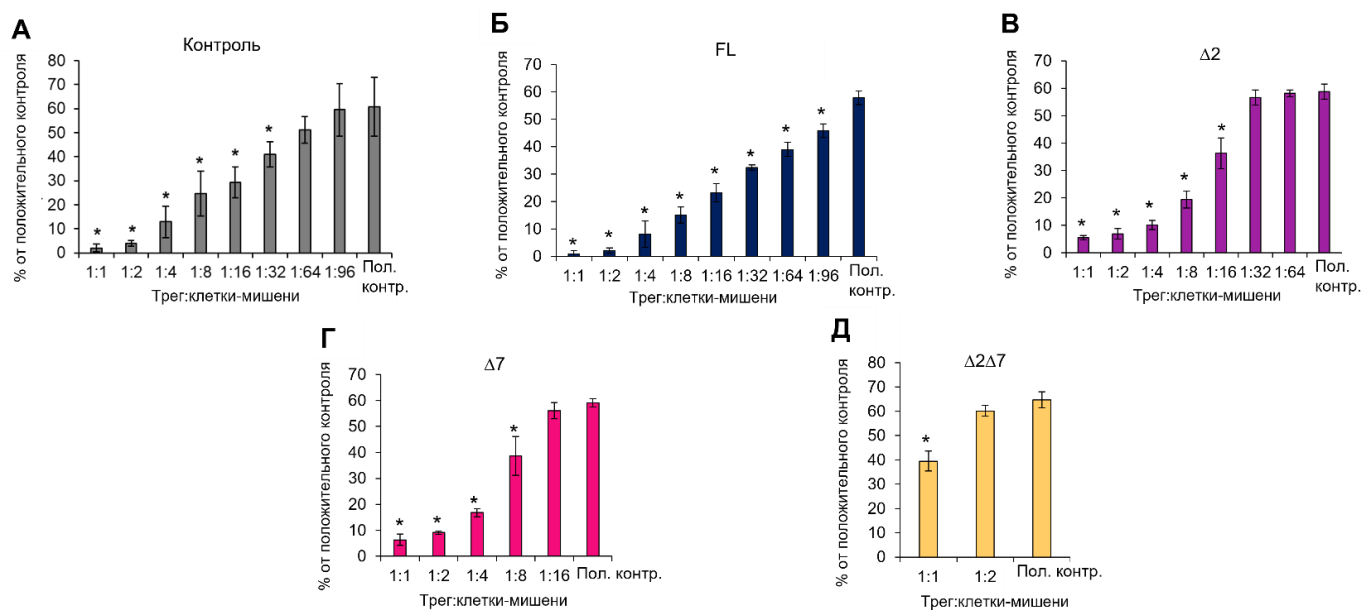


Рисунок 33. Результаты реакции смешанных лимфоцитов. Повышенная супрессорная активность Трег, экспрессирующих FoxP3FL, и пониженная супрессорная активность Трег с делециями экзонов. Пол. контр. — положительный контроль, клетки CD4⁺CD25⁻, культивируемые совместно с фидерными клетками. N = 4. * — $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Результаты данного эксперимента показали, что Трег, экспрессирующие сплайс-варианты FoxP3 с делецией экзонов, обладают пониженной супрессорной активностью.

На рисунке 34 отображены пролиферативные диаграммы реакции смешанных лимфоцитов.

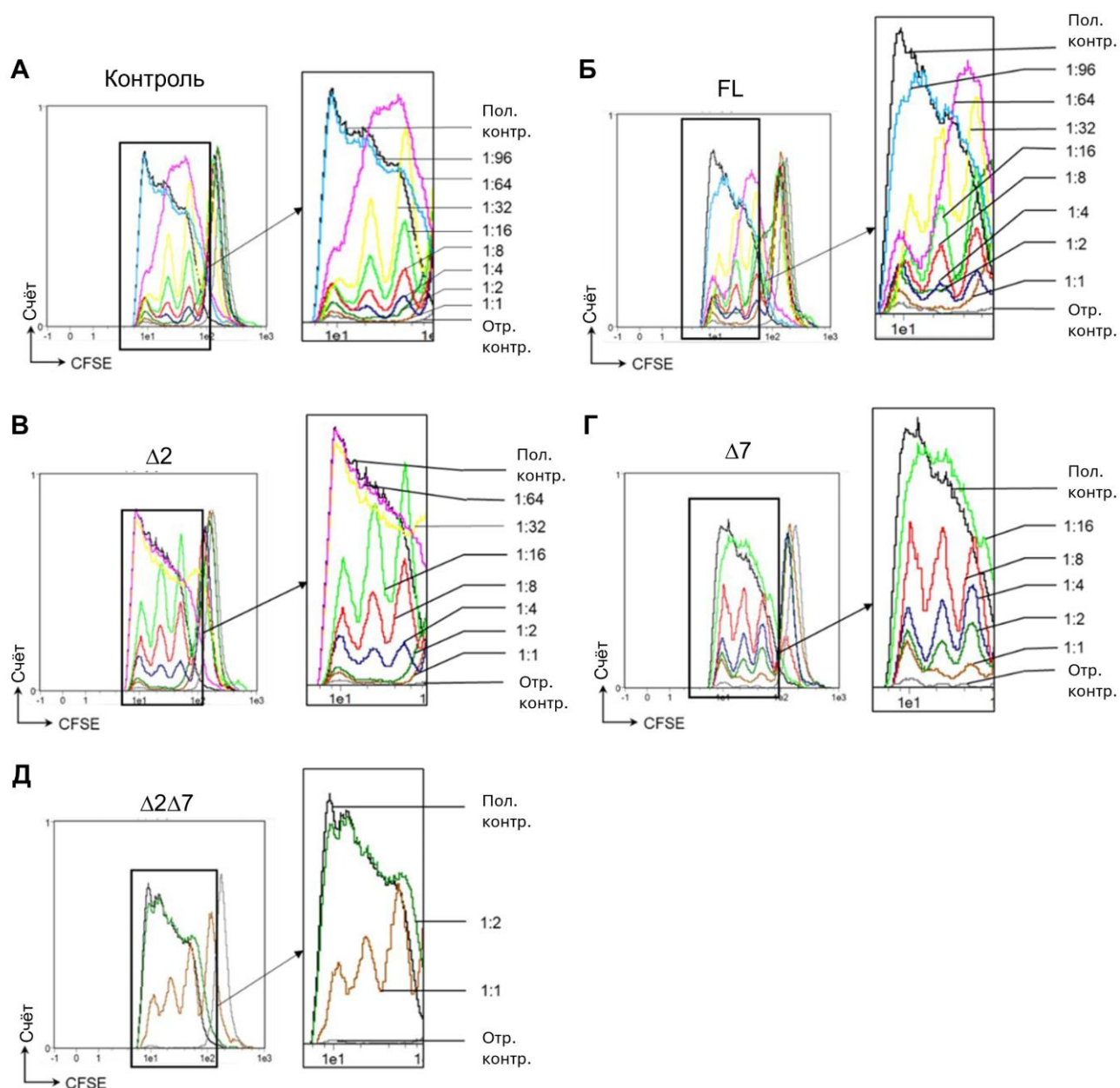


Рисунок 34. Проллиферативные диаграммы реакции смешанных лимфоцитов. Трег (А) контрольные; экспрессирующие (Б) FoxP3FL; (В) FoxP3Δ2; (Г) FoxP3Δ7; (Д) FoxP3Δ2Δ7. Отр. контр. — отрицательный контроль, клетки CD4⁺CD25⁻. Пол. контр. — положительный контроль, клетки CD4⁺CD25⁻, культивируемые совместно с фидерными клетками.

3.9. Уровень синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности регуляторных Т-клеток

Оценивали способность Трег, экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, синтезировать молекулы, вовлеченные в реализацию супрессорной активности. Сериновые протеазы гранзим А, гранзим В и связанный с гранзимами перфорин вовлечены в

механизмы контакт-зависимой супрессорной активности Трег. Наблюдали снижение количества клеток, синтезирующих данные молекулы, при делеции экзона 2, но не экзона 7 (рис. 35). Почти все клетки, экспрессирующие FoxP3FL ($90,6 \pm 6,9\%$) или FoxP3 Δ 7 ($90,9 \pm 2,5\%$) были гранзим А-положительными (рис. 35 А) по сравнению с контрольными клетками ($64,9 \pm 9,6\%$).

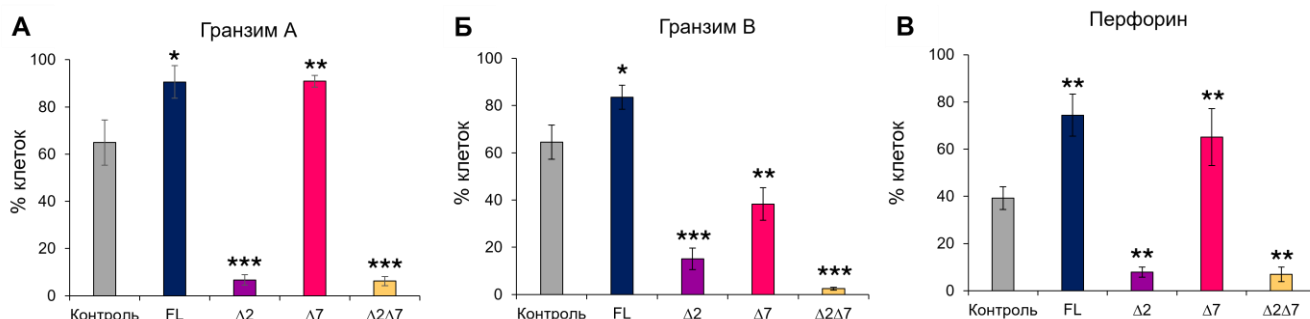


Рисунок 35. Способность Трег с экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 продуцировать молекулы, вовлеченные в реализацию супрессорной активности: (А) гранзим А, (Б) гранзим В и (В) перфорин. N = 4. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p \leq 0,005$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.**

Большинство Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делецией экзона 2, т. е. FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 2 Δ 7, были гранзим А-отрицательными ($6,7 \pm 2,2\%$ из Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 2 и $6,2 \pm 1,9\%$ из Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 2 Δ 7 были гранзим А-положительными). Доля гранзим В-положительных клеток также увеличилась при индукции сплайс-варианта FoxP3FL ($83,5 \pm 5,1\%$) по сравнению с контрольными клетками ($64,5 \pm 7,2\%$) (рис. 35 Б). Делеция экзона 7 была связана с небольшим уменьшением гранзим В-положительных ($38,3 \pm 6,9\%$). Доля гранзим В-положительных клеток была наименьшей среди Трег с делецией экзона 2 ($15,1 \pm 4,6\%$ гранзим В-положительных клеток с экспрессией FoxP3 Δ 2 и $2,5 \pm 0,6\%$ с экспрессией FoxP3 Δ 2 Δ 7). Доля перфорин-положительных контрольных клеток составила $39,2 \pm 4,8\%$ и увеличилась до $74,4 \pm 8,9\%$ при индукции FoxP3FL и до $65,1 \pm 12,1\%$ при индукции FoxP3 Δ 7 (рис. 35 В). Доля перфорин-положительных клеток была наименьшей среди Трег с делецией экзона 2 ($7,9 \pm 2,1\%$ перфорин-положительных клеток с экспрессией FoxP3 Δ 2 и $7,0 \pm 3,1\%$ с экспрессией FoxP3 Δ 2 Δ 7). На рисунке 36 изображены графики проточной цитометрии, отображающие гранзим А, В- и перфорин-положительные Трег, экспрессирующие индивидуальные сплайс-варианты FoxP3.

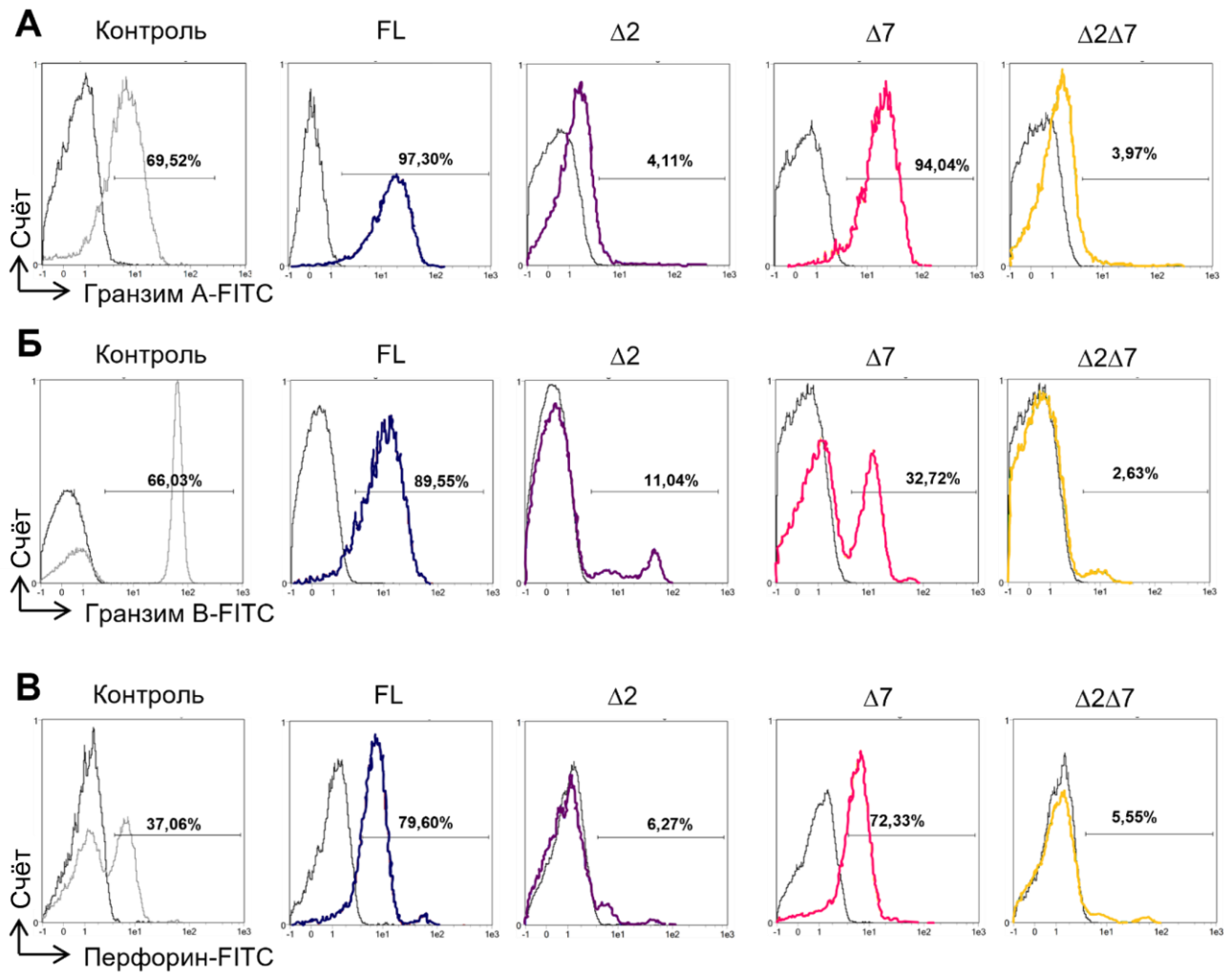


Рисунок 36. Способность Трег с экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 синтезировать (А) гранзим А, (Б) гранзим В и (В) перфорин. Показаны результаты проточной цитометрии. Черные линии обозначают контрольные клетки, инкубированные с ингибитором транспорта белка. Цветные линии обозначают инкубированные с ингибитором транспорта белка стимулированные клетки.

Оценивали также экспрессию таких молекул, задействованных в супрессорной активности Трег, как CTLA-4, галектин 9 (LGALS9) и NRP1. В Трег с делециями экзонов наблюдалось понижение уровня экспрессии мРНК CTLA-4 (рис. 37 А). В Трег, экспрессирующих FoxP3^{FL}, уровень мРНК CTLA-4 не отличался от контрольных клеток, тогда как в клетках с экспрессией FoxP3 $\Delta 2$ или FoxP3 $\Delta 7$ уровень экспрессии был в два раза ниже. Трег, экспрессирующие FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$ имели десятикратное понижение уровня экспрессии CTLA-4. При анализе экспрессии LGALS9 выявили, что понижение уровня экспрессии наблюдалось среди Трег, экспрессирующих FoxP3 $\Delta 2$ или FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$ (рис. 37 Б). Индукция сплайс-варианта FoxP3 $\Delta 7$

или FoxP3FL не привела к изменению уровня мРНК LGALS9. Уровень мРНК NRP1 не изменялся у Трег, экспрессирующих различные сплайс-варианты (рис. 37 В).

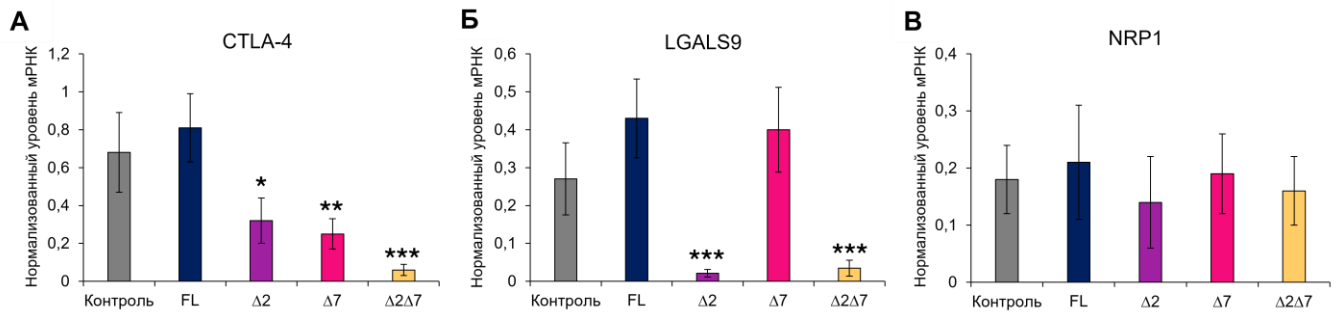


Рисунок 37. Уровни мРНК молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности Трег (А) CTLA-4; (Б) LGALS9; (В) NRP1. N = 4. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; * – $p \leq 0,005$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.**

3.10. Подавление активности теломеразы регуляторными Т-клетками, селективно экспрессирующими индивидуальные сплайс-варианты FoxP3

Одним из механизмов супрессорного действия Трег является подавление активности теломеразы за счёт снижения синтеза её активной формы в целевых лимфоцитах [59]. Трег, экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3FL, подавляют активность теломеразы значительно эффективнее, чем клетки с делециями экзонов 2 и/или 7 (рис. 38).

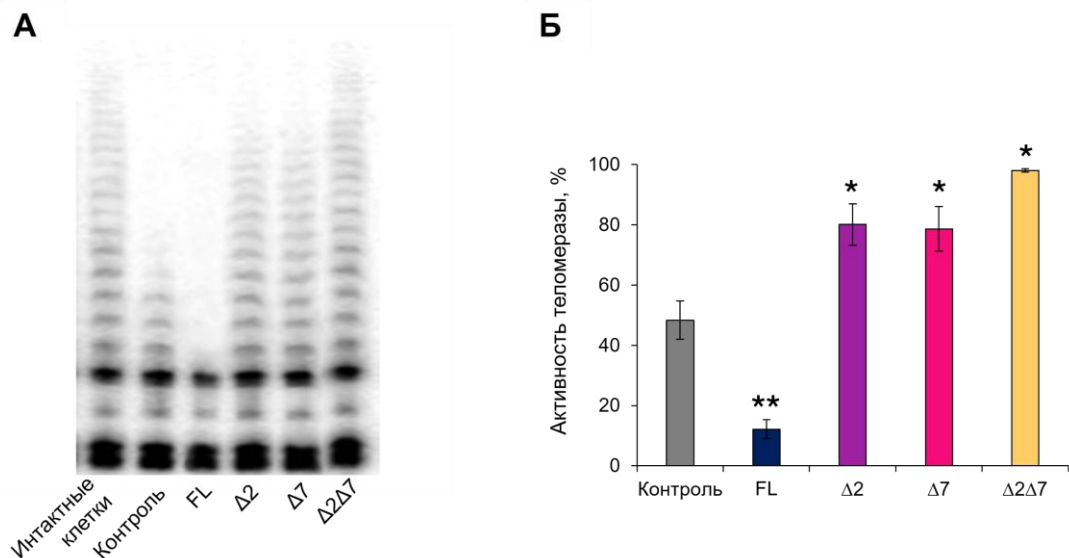


Рисунок 38. Способность Трег с индивидуальными сплайс-вариантами подавлять активность теломеразы в целевых лимфоцитах. (А) Активность теломеразы, определенная с методом TRAP. (Б) Результаты количественной оценки TRAP методом денситометрии. N = 4. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Активность теломеразы в таргетных лимфоцитах, инкубированных с контрольными Трег, составила $48,4 \pm 6,3\%$. После инкубации таргетных лимфоцитов с Трег, экспрессирующими FoxP3FL, активность теломеразы составила $12,1 \pm 3,1\%$. Трег, экспрессирующие сплайс-варианты с делециями экзонов, подавляли активность теломеразы менее эффективно, чем контрольные клетки. Активность теломеразы в таргетных лимфоцитах, инкубированных с Трег, экспрессирующими FoxP3 Δ 2, составила $80,1 \pm 6,9\%$; с Трег, экспрессирующими FoxP3 Δ 7, $78,6 \pm 7,4\%$; с Трег, экспрессирующими FoxP3 Δ 2 Δ 7, $98,1 \pm 0,6\%$.

3.11. Цитокиновый профиль регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3

Исследовали концентрацию супрессорных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-35; гетеродимерного ИЛ-12, индуцирующего активацию и пролиферацию Трег (субъединица p40); провоспалительного ИЛ-26. Оценивали концентрацию ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-22, ИЛ-28 и ИЛ-29, относящихся к семейству противовоспалительных регуляторов с отрицательной обратной связью (рис. 39).

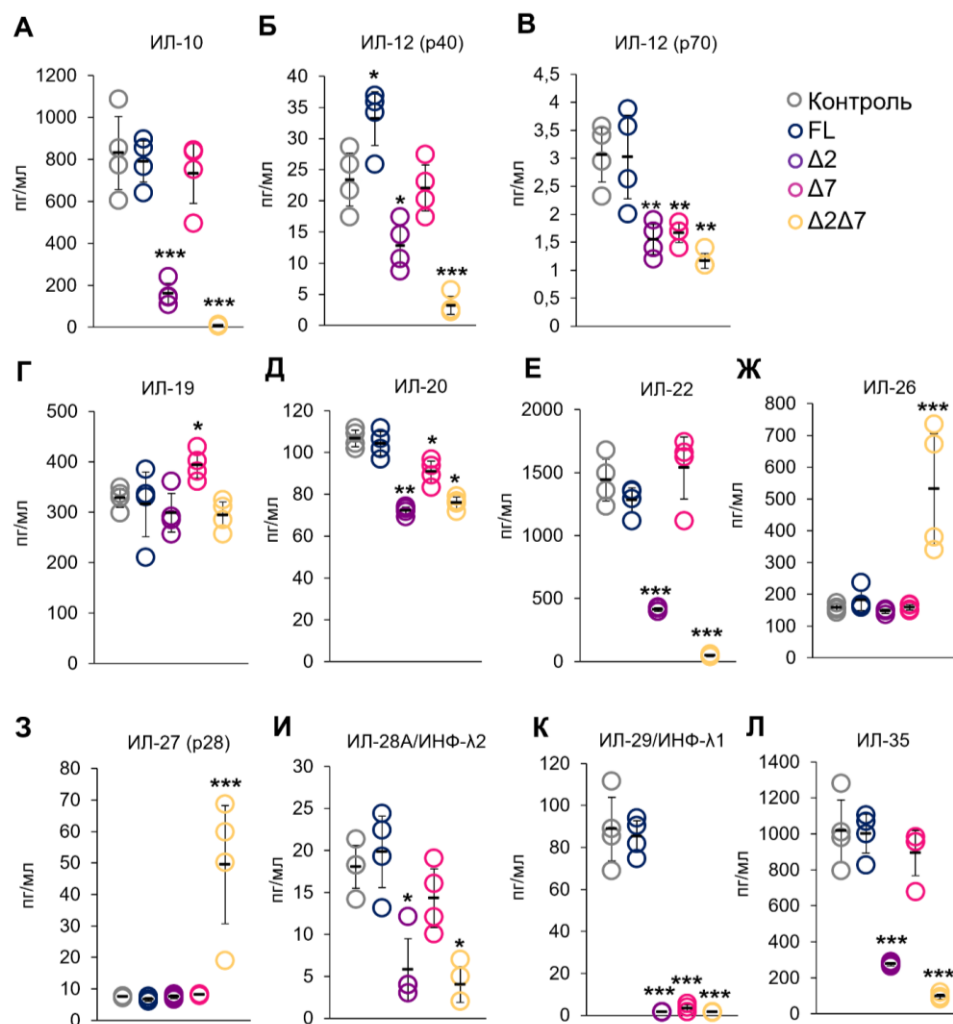


Рисунок 39. Концентрации цитокинов в культуральной среде Трег, экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3. Концентрации (А) ИЛ-10, (Б)

ИЛ-12 (p40), (В) ИЛ-12 (p70), (Г) ИЛ-19, (Д) ИЛ-20, (Е) ИЛ-22, (Ж) ИЛ-26, (З) ИЛ-27 (p28), (И) ИЛ-28А/ИФН- λ 2, (К) ИЛ-29/ИФН- λ 1 и (Л) ИЛ-35. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,005$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Концентрация ИЛ-10 и ИЛ-35 была понижена только в среде Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делециями экзона 2 (FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 2 Δ 7) (рис. 39 А, Л).

Концентрация субъединицы p40 ИЛ-12 значительно повышалась в среде клеток, экспрессирующих FoxP3FL, и была понижена в среде Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 2 Δ 7 (рис. 39 Б). Концентрация субъединицы p70 ИЛ-12 была понижена средах клеток с делецией как экзона 2, так и с делецией экзона 7 (рис. 39 В). Концентрация ИЛ-19 была повышена в среде Трег, экспрессирующих FoxP3 Δ 7 (рис. 39 Г). Концентрация ИЛ-20 и ИЛ-29 была снижена в средах клеток с делецией как экзона 2, так и с делецией экзона 7 (рис. 39 Д, К), а концентрация ИЛ-22 и ИЛ-28 была снижена только в среде клеток с делециями экзона 2 (FoxP3 Δ 2 и FoxP3 Δ 2 Δ 7) (рис. 39 Е, И). Концентрация ИЛ-26 и ИЛ-27 была значительно повышена только в среде клеток с делециями обоих экзонов (рис. 39 Ж, З), что свидетельствует о том, что Трег не экспрессируют данные цитокины.

Результаты данного эксперимента показали, что Трег, экспрессирующие сплайс-варианты FoxP3 с делецией экзонов, менее активно продуцируют цитокины, ассоциированные с супрессорной активностью или с активацией и пролиферацией Трег по сравнению с клетками с экспрессией FoxP3FL. Данные наблюдения соответствуют пониженной супрессорной активности Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делециями экзонов.

3.12. Иммунофенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток с индивидуальными сплайс-вариантами FoxP3

Исследовали экспрессию Трег-ассоциированных маркёров через 96 ч после трансфекции ПСО. Оценивали экспрессию поверхностных маркёров CD4, CD25, CD127, CD152, CD39, CD223 и ядерных маркёров FoxP3 и Helios. На рисунке 1 в Приложении представлены графики проточной цитометрии, отображающие долю клеток с отрицательным, низким и высоким уровнем экспрессии маркёров.

CD4, CD25, CD127 и FoxP3 рассматриваются в качестве маркёров, по которым принято идентифицировать Трег. Не было выявлено различий в экспрессии CD4 среди всех групп клеток, 96,9 – 98,1% Трег обладали фенотипом CD4 (рис. 40 А).

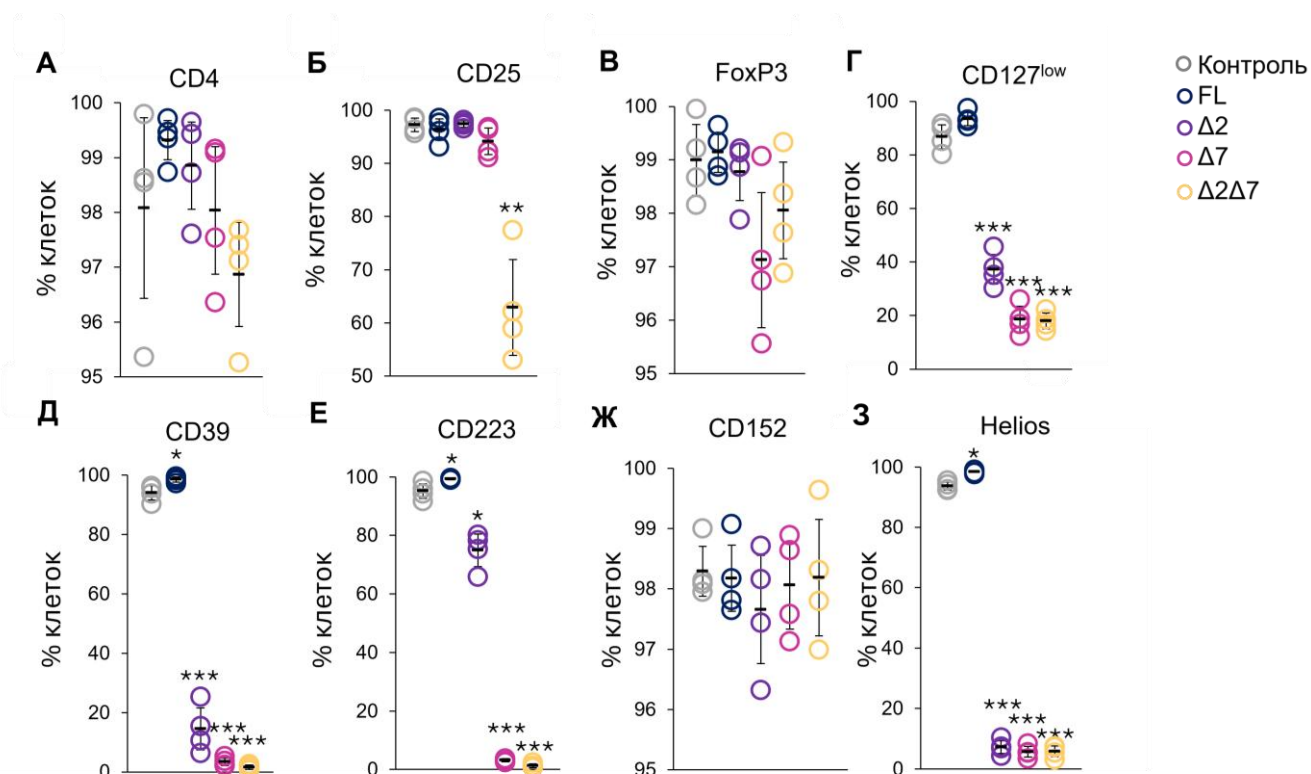


Рисунок 40. Иммунофенотип Трег, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3. Экспрессию Трег-ассоциированных маркёров определяли методом проточной цитометрии через четыре дня после трансфекции олигонуклеотидами. Маркёры, ассоциированные с идентификацией Трег: (А) CD4, (Б) CD25, (В) FoxP3, (Г) CD127. Маркёры, ассоциированные с супрессорной активностью Трег: (Д) CD39, (Е) CD223, (Ж) CD152. Маркёр, позволяющий идентифицировать стабильные Трег (З) Helios. * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,005$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни

Экспрессия маркёра CD25 была понижена у клеток с делециями обоих экзонов: $62,9 \pm 9,0\%$ Трег, экспрессирующих FoxP3Δ2Δ7, обладали фенотипом CD25 (рис. 40 Б). Трег также характеризуются низкой экспрессией CD127. Фенотип CD127^{low} был характерен лишь для контрольных клеток и клеток, экспрессирующих FoxP3FL (рис. 40 Г). Делеция экзона 2 привела к снижению количества клеток, у которых определялась экспрессия CD127^{low} ($37,3 \pm 5,6\%$). Наименьшее количество Трег, обладающих фенотипом CD127^{low}, наблюдали при делеции экзона 7 ($18,5 \pm 4,9\%$) и при делеции обоих экзонов ($18,0 \pm 2,9\%$). Использование доступных коммерческих антител не позволило детектировать Трег, экспрессирующие индивидуальный сплайс-вариант FoxP3. Не было выявлено различий в экспрессии FoxP3 среди всех групп клеток. Всем Трег был присущ FoxP3 фенотип (рис. 40 В).

CD152 (CTLA-4), CD223 и CD39 – маркёры, задействованные в реализации супрессорной функции Трег. Все группы Трег характеризовались фенотипом CD152 (рис. 40 Ж). Данное

наблюдение не согласуется с оценкой уровня экспрессии мРНК CTLA-4. Индукция сплайс-варианта FoxP3FL привела к увеличению доли Трег с фенотипом CD39 ($98,2 \pm 0,8\%$) (рис. 40 Д) по сравнению с контрольными клетками ($93,7 \pm 2,4\%$). Делеция экзона 2 привела к понижению доли Трег с фенотипом CD39 до $10,7 \pm 7,1\%$. Наиболее существенное понижение доли CD39 - положительных клеток наблюдали при делеции экзона 7 ($2,4 \pm 1,3\%$) и делеции обоих экзонов ($1,9 \pm 0,7\%$). Индукция сплайс-варианта FoxP3FL привела к увеличению доли Трег с фенотипом CD223 ($99,6 \pm 0,3\%$) (рис. 40 Е) по сравнению с контрольными клетками ($96,0 \pm 0,3\%$). Индукция сплайс-варианта FoxP3Δ2 привела к снижению доли CD223-положительных клеток до $78,4 \pm 5,5\%$. Наименьшее количество CD223-положительных клеток наблюдали при индукции сплайс-варианта FoxP3Δ7 ($2,7 \pm 0,5\%$) и сплайс-варианта FoxP3Δ2Δ7 ($1,1 \pm 0,7\%$). Helios является маркером, позволяющим идентифицировать стабильность популяции Трег. Повышение количества Трег, обладающих фенотипом Helios ($98,4 \pm 0,5\%$) наблюдали при индукции сплайс-варианта FoxP3FL ($98,4 \pm 0,5\%$ по сравнению с $93,7 \pm 1,3\%$ контрольных клеток). Делеция экзонов приводила к резкому понижению количества клеток, экспрессирующих Helios: $7,2 \pm 2,1\%$ Helios-положительных клеток с делецией экзона 2; $5,7 \pm 1,8\%$ с делецией экзона 7; и $5,8 \pm 1,8\%$ с делецией обоих экзонов (рис. 40 З).

Таким образом, наиболее характерным для Трег фенотипом обладают клетки, селективно экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3FL. При делеции одного и/или обоих экзонов снижается количество Трег, экспрессирующих маркёры, ассоциированные с идентификацией, супрессорной активностью и стабильностью данных клеток.

СИФ исследуемых клеточных маркёров представлены в таблице 7 Приложения.

3.13. Индукция полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 в регуляторных Т-клетках пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Показанные в работе результаты по индукции полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 в Трег 3Д позволили использовать разработанный подход для индукции сплайс-варианта FoxP3FL в Трег пациентов с БАС.

Для индукции экспрессии FoxP3FL Трег пациентов с БАС трансфицировали ПСО #Инс2 и #Инс7, а также контрольными неспецифическими олигонуклеотидами #Кон1 и #Кон2. Эффективность трансфекции оценивали ежедневно. В течение четырех дней после трансфекции её эффективность составила не менее 76 – 74% (рис. 41).

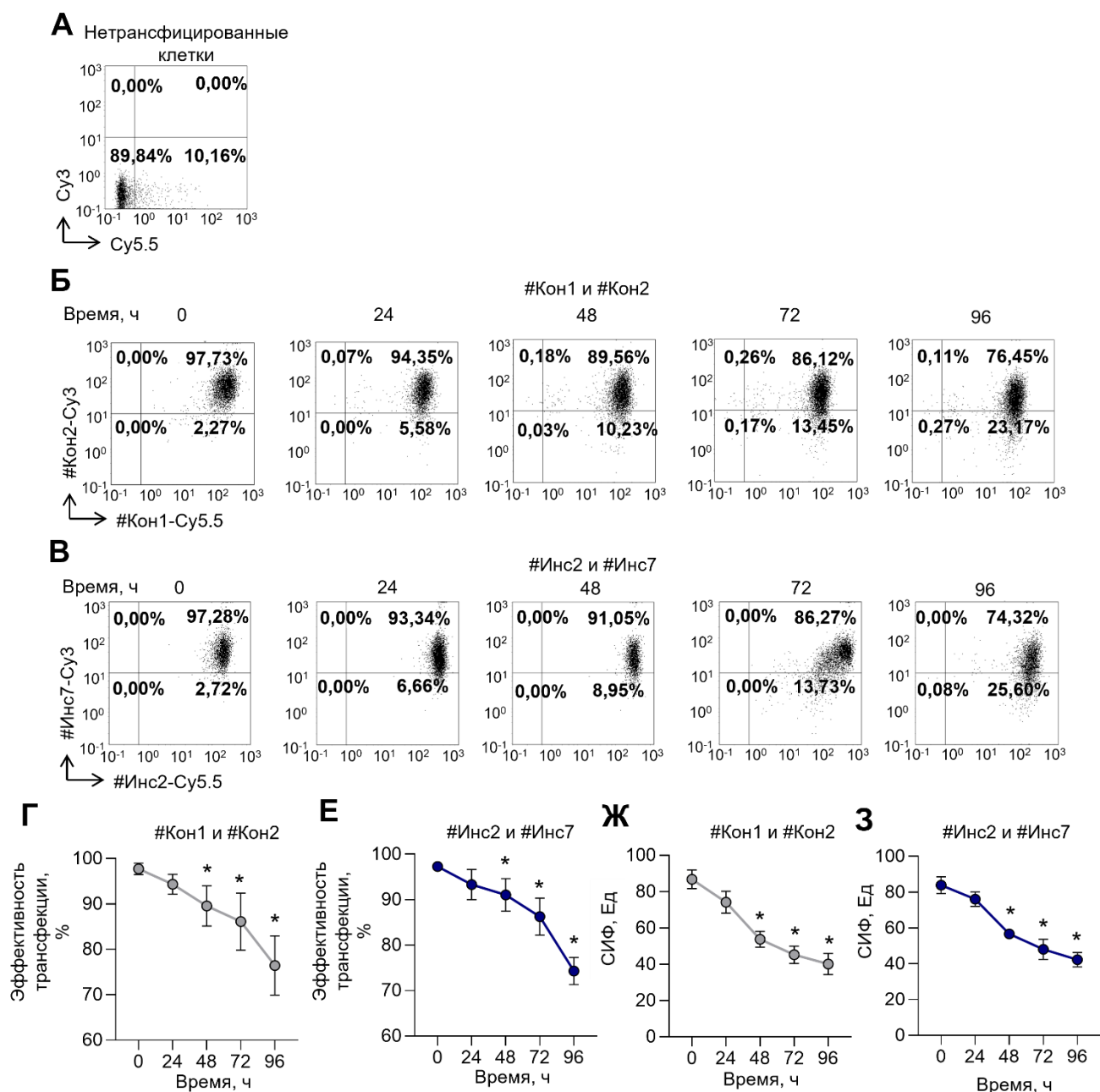


Рисунок 41. Эффективность трансфекции Трег олигонуклеотидами. Диаграммы проточной цитометрии (А) нетрансфицированных клеток; (Б) клеток, трансфицированных контрольными неспецифическими олигонуклеотидами #Кон1 и #Кон2; и (В) клеток, трансфицированных #Инс2 и #Инс7. (Г, Д) Эффективность трансфекции в течение 96 часов. (Е, Ж) СИФ трансфицированных клеток. N = 4. * – $p \leq 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни

Экспрессия сплайс-варианта FoxP3FL в Трег, трансфицированных #Инс2 и #Инс7, составила 95,1 – 96,4% (рис. 42 А). В Трег, трансфицированных #Кон1 и #Кон2, уровень экспрессии FoxP3FL составил 11,1 – 44,1%. Уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 в трансфицированных Трег приведены в таблице 8 в Приложении.

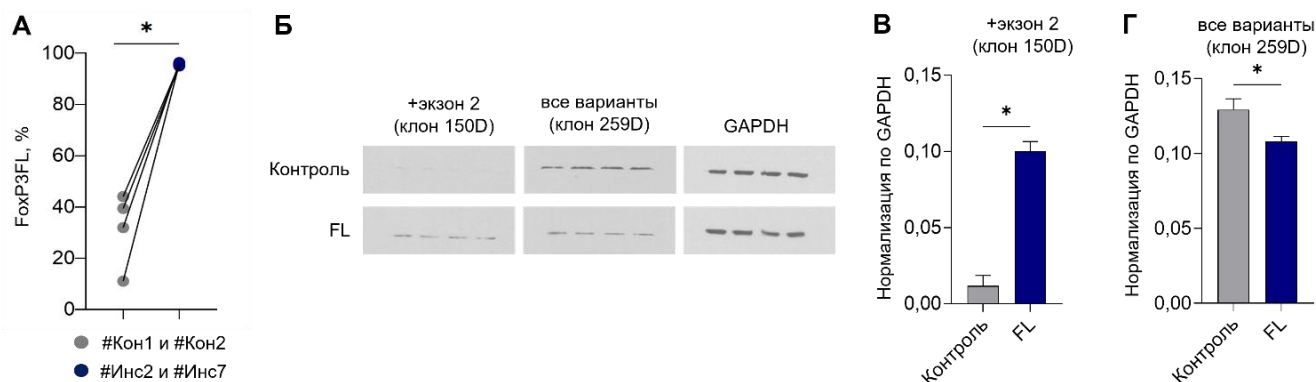


Рисунок 42. Индукция экспрессии FoxP3FL в Трег пациентов с БАС. (А) Результаты ПЦР, показывающие индукцию FoxP3FL после трансфекции Трег #Инс2 и #Инс7. Приведены индивидуальные значения для контрольных клеток и клеток с индуцированной экспрессией FoxP3FL. (Б) Результаты вестерн-блоттинга, показывающие индукцию FoxP3FL после трансфекции Трег #Инс2 и #Инс7. Клон 150D специфичен экзону 2, в то время как клон 259D специфичен эпитопу после экзона 2, общему для всех белковых форм сплайс-вариантов FoxP3. (В, Г) Нормализованные по GAPDH результаты вестерн-блоттинга сплайс-вариантов FoxP3. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. N = 4. * – $p \leq 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни

Индукция экспрессии FoxP3FL на белковом уровне была подтверждена вестерн-блоттингом (рис. 42 Б). Используя клон антитела 150D (специфичный эпитопу, кодируемому экзоном 2), было показано, что среди контрольных клеток определялся низкий уровень белка FoxP3, содержащего данный эпитоп. Уровень данного белка был увеличен более чем в 5 раз после индукции сплайс-варианта FoxP3FL (рис. 42 В). Клон антитела 259D, который является специфичным эпитопу, расположенному после участка, кодируемого экзоном 2, и общим для всех сплайс-вариантов, был использован для обнаружения белка FoxP3 как в контрольных клетках, так и в клетках с индуцированной экспрессией FoxP3FL (рис. 42 Б, Г). После индукции FoxP3FL определяли в 1,2 раза меньше белка, содержащего эпитоп, общий для всех сплайс-вариантов. Результаты эксперимента показали, что трансфекция Трег пациентов с БАС ПСО #Инс2 и #Инс7 позволяет получить клетки с селективной экспрессией сплайс-варианта FoxP3FL.

3.14. Проллиферативная активность регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL отличались значительно более высокой долей пролиферирующих клеток в ходе культивирования (рис. 43): через 96 ч после трансфекции $86,1 \pm 8,6\%$ Трег, экспрессирующих FoxP3FL, совершили деление по сравнению с $65,8 \pm 6,3\%$ контрольных Трег.

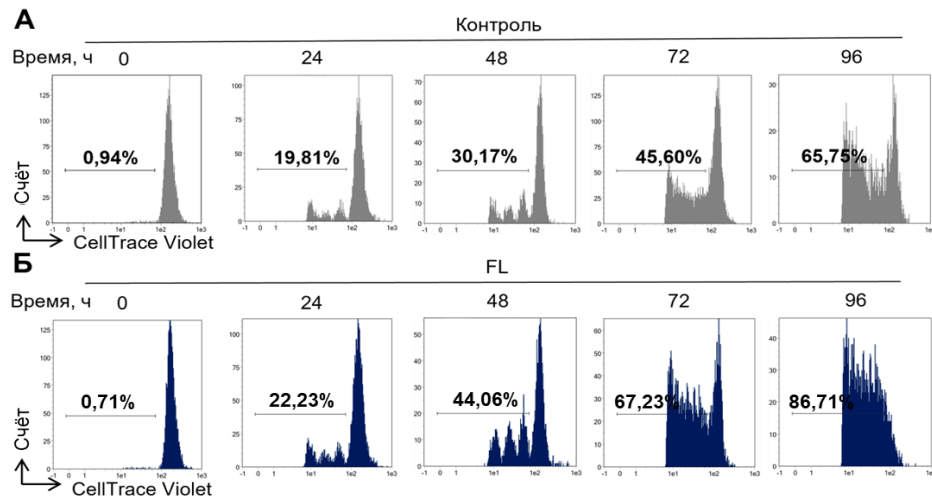


Рисунок 43. Повышенная пролиферативная способность Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL. Диаграммы проточной цитометрии, отображающие пролиферацию (А) контрольных клеток и (Б) Трег, экспрессирующих FoxP3FL.

Было подсчитано общее количество клеток в течение 96 ч культивирования после трансфекции (рис. 44).

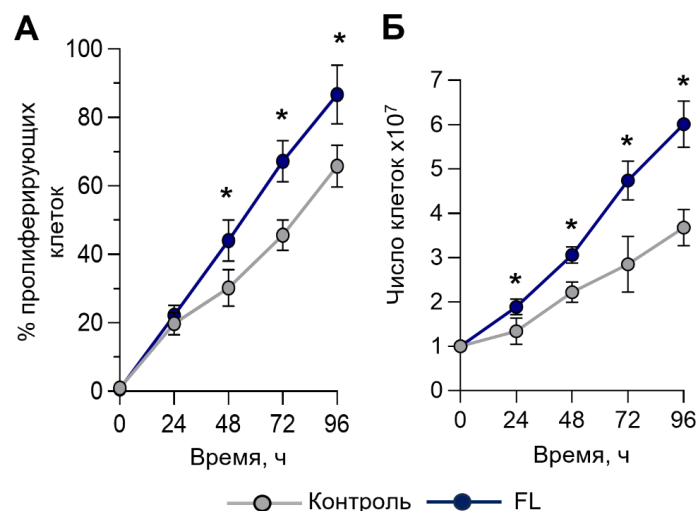


Рисунок 44. Интенсивность пролиферации трансфицированных Трег. (А) Процент пролиферирующих клеток, определенный методом проточной цитометрии. (Б) Общее количество клеток в течение 96 ч пролиферации. * — $p < 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Трег, экспрессирующие FoxP3FL, пролиферировали с более высокой скоростью, и через 96 ч после трансфекции их общее количество достигло $(6,01 \pm 0,52) \times 10^7$ по сравнению с $(3,68 \pm 0,41) \times 10^7$ контрольных клеток (рис. 44 Б).

Частоту деления клеток в сутки рассчитывали на основе суточного количества клеток. Частота деления составила 0,65 для Трег, экспрессирующих FoxP3FL, и 0,56 для контрольных Трег.

Согласно данным, полученным с помощью световой микроскопии (рис. 45), контрольные Трег начинали формировать клеточные агрегаты через 72 ч после трансфекции, в то время как Трег, экспрессирующие FoxP3FL, были способны формировать их через 48 ч, и количество агрегатов было выше. Размер клеточных агрегатов составлял 60 – 100 мкм и не различался между группами Трег.

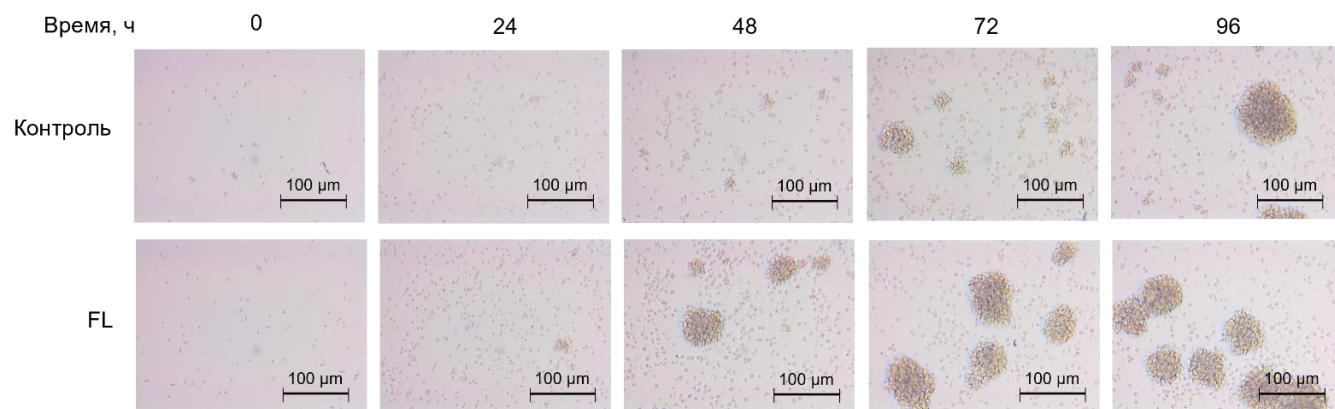


Рисунок 45. Микрофотографии пролиферирующих в течение 96 часов контрольных Трег и Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL. Увеличение x200.

Результаты данных экспериментов показали, что Трег пациентов с БАС с селективной экспрессией сплайс-варианта FoxP3FL обладают повышенной пролиферативной активностью.

3.15. Супрессорная активность регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Супрессорную активность Трег оценивали с помощью реакции смешанных лимфоцитов. Контрольные Трег подавляли пролиферацию $CD4^+CD25^-$ Т-клеток в соотношении 1:16 (рис. 46 А, Б), в то время как Трег с селективной экспрессией FoxP3FL подавляли клетки-мишени в соотношении 1:64 и, соответственно, были в четыре раза активнее (рис. 46 В, Г).

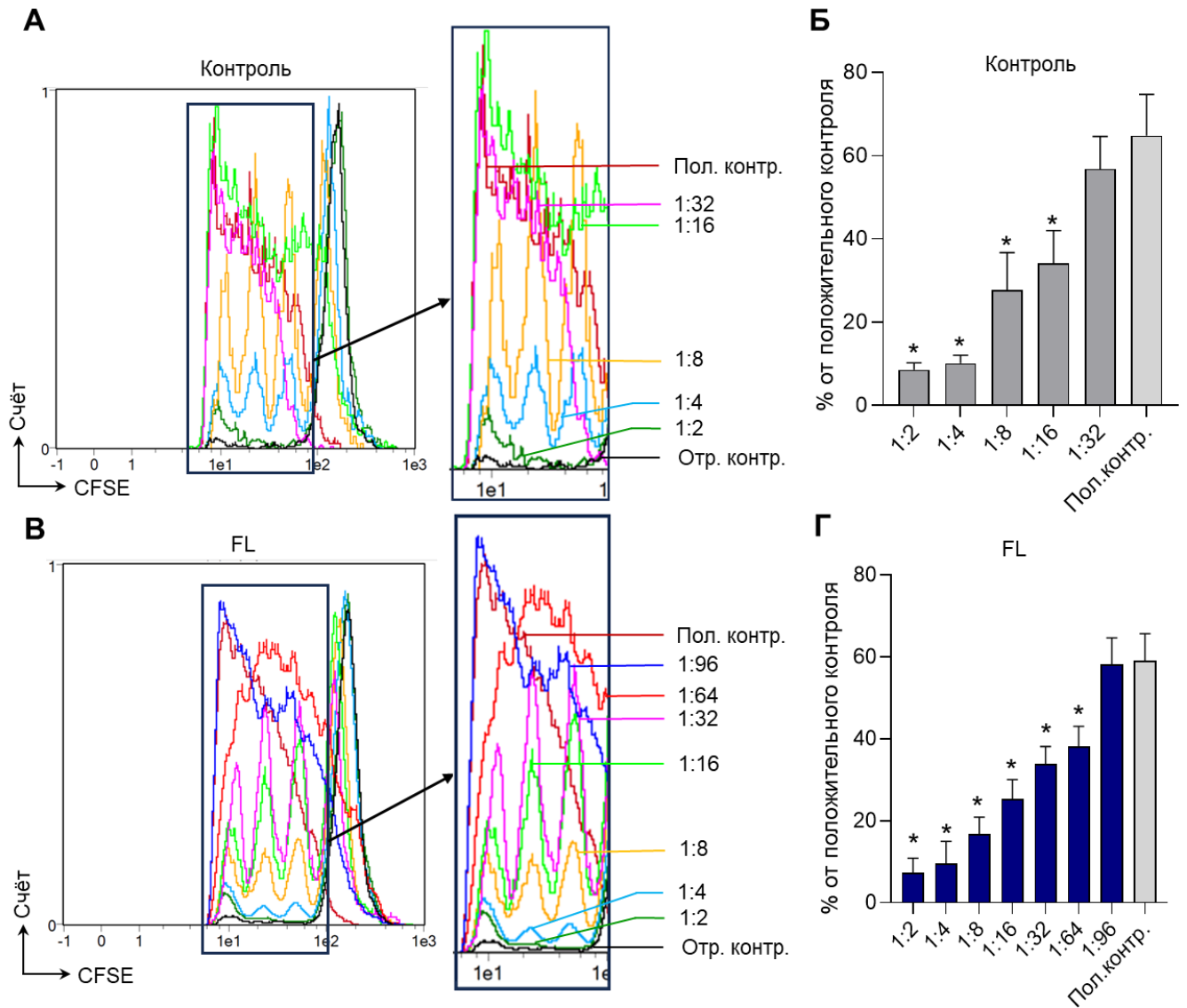


Рисунок 46. Проллиферативные диаграммы реакции смешанных лимфоцитов. $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, инкубированные в различных соотношениях совместно с (А) контрольными Трег или (В) Трег, экспрессирующими FoxP3FL. (Б, Г) Результаты анализа реакции смешанных лимфоцитов. Отр. контр. — отрицательный контроль, клетки $CD4^+CD25^+$. Пол. контр. — положительный контроль, клетки $CD4^+CD25^-$, культивируемые совместно с фидерными клетками. N = 4. * — $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.

Уровень синтеза вовлеченных в реализацию супрессорной активности гранзима А, В и перфорина оценивали с помощью проточной цитометрии (рис. 47).

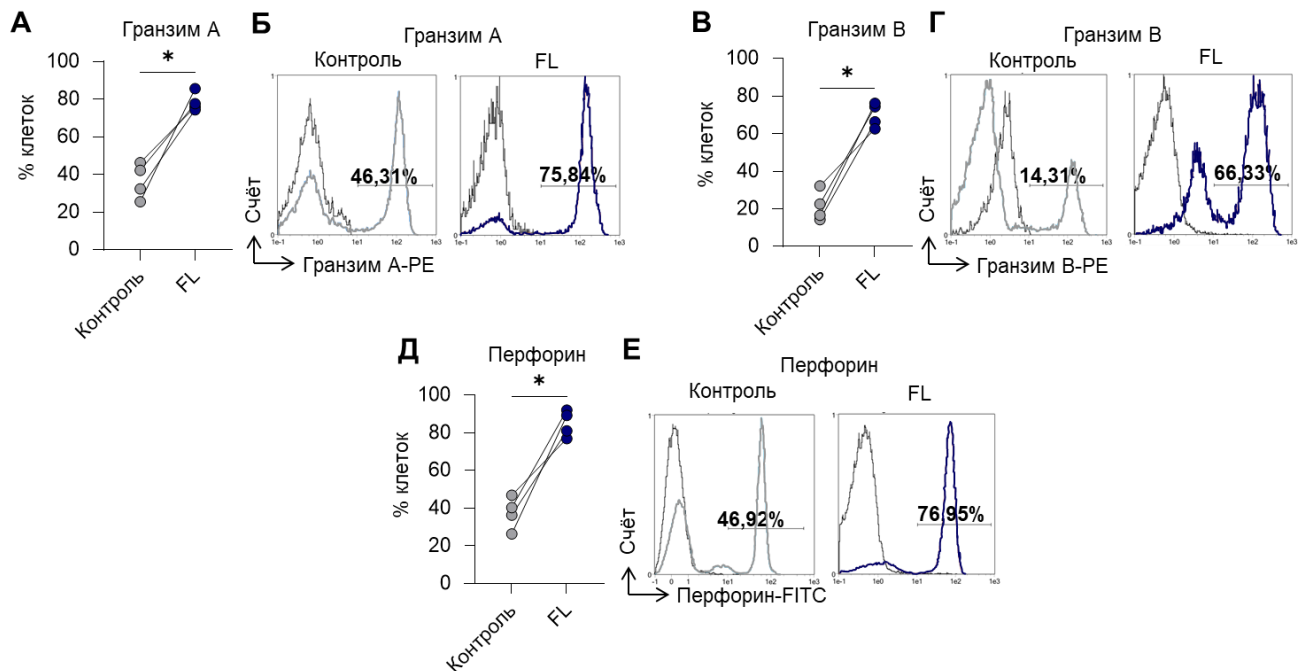


Рисунок 47. Повышение уровня синтеза молекул, вовлеченных в супрессорную активность Трег, при индукции сплайс-варианта FoxP3FL. Способность Трег продуцировать (А) гранзим А, (В) гранзим В и (Д) перфорин. Показаны индивидуальные значения для контрольных клеток и клеток с индуцированным FoxP3FL. (Б, Г, Е) Диаграммы проточной цитометрии контрольных Трег и Трег с индуцированным сплайс-вариантом FoxP3FL. Черные гистограммы (Б, Г, Е) обозначают нестимулированные клетки. Серые и синие гистограммы обозначают стимулированные клетки. N = 4. * – $p < 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Индукция экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL привела к значительному увеличению количества Трег, синтезирующих гранзимы А, В и перфорин. При индукции FoxP3FL 74,3 – 85,7% Трег синтезировали гранзим А (рис. 47 А, Б), 62,6 – 76,3% синтезировали гранзим В (рис. 47 В, Г), тогда как среди контрольных клеток 25,6 – 46,3% Трег синтезировали гранзим А и 14,3 – 32,2% синтезировали гранзим В. Доля перфорин-положительных клеток составила 26,3 – 46,9% (рис. 47 Д, Е) среди контрольных Трег и увеличилась до 80,0 – 92,1% после индукции FoxP3FL.

Оценивали также концентрацию цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-35, задействованных в механизмах супрессорной активности Трег. Концентрация ИЛ-10 в культуральной среде контрольных Трег составила 164,6 – 341,6 пг/мл, тогда как в среде клеток, экспрессирующих FoxP3FL, она достигла значений 410,4 – 721,8 пг/мл (рис. 48 А). Концентрация ИЛ-35 повысилась с 171,8 – 390,4 пг/мл в среде контрольных Трег до 501,8 – 861,7 пг/мл в среде Трег, экспрессирующих FoxP3FL (рис. 48 Б).

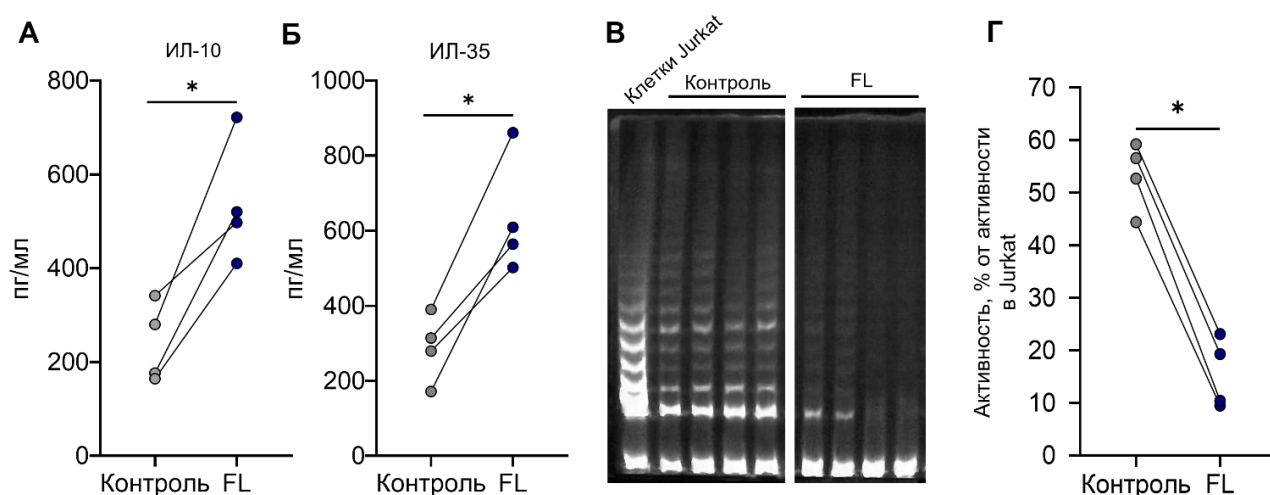


Рисунок 48. Повышение концентрации супрессорных цитокинов ИЛ-10 (А) и ИЛ-35 (Б) в культуральной среде Трег с индуцированной экспрессией сплайс-варианта FoxP3FL. Повышение способности подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях при индукции экспрессии FoxP3FL в Трег. (В) Электрофорез в геле амплификатов теломерных повторов (TRAP), используемый для обнаружения активности теломеразы. Клеточная линия Jurkat использовалась в качестве референсной линии для измерения активности теломеразы. (Г) Результаты количественной оценки TRAP относительно референсных клеток. Приведены индивидуальные результаты для контрольных Трег и Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL. N = 4. * – $p < 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Способность Трег подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях была определена с помощью метода TRAP. Активность теломеразы в клетках-мишенях, инкубированных с контрольными Трег, составила 44,4 – 59,2% от клеток Jurkat (рис. 48 В, Г). Трег с индуцированной экспрессией сплайс-варианта FoxP3FL были способны более эффективно подавлять активность теломеразы, активность теломеразы составила 9,5 – 23,1%.

Результаты данных экспериментов показали, что повышенная супрессорная активность Трег при индукции экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL связана с повышением продукции Трег гранзимов А, В; перфорины; ИЛ-10 и ИЛ-35, которые задействованы в механизмах контактно-независимой супрессии, а также со способностью Трег, экспрессирующих FoxP3FL, более эффективно подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях.

3.16. Иммунофенотипическая характеристика регуляторных Т-клеток, селективно экспрессирующих FoxP3FL, у пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Результаты проточной цитометрии выявили, что все Трег, экспрессирующие FoxP3FL, были CD4-положительными (95,2 – 99,3%) и не отличались от контрольных клеток (93,0 – 98,4%) (рис. 49 А). Количество клеток с фенотипом CD25⁺ также не отличалось между Трег, экспрессирующими FoxP3FL, (98,6 – 99,8%) и контрольными Трег (96,3 – 98,6%) (рис. 49 Б). Небольшое увеличение количества клеток с фенотипом CD127^{low} наблюдали после индукции FoxP3FL (86,4 – 89,3%) по сравнению с контрольными клетками (79,6 – 84,8%) (рис. 49 В). Индукция FoxP3FL привела к значительному увеличению количества Helios-положительных клеток (91,4 – 96,6%) по сравнению с 14,9 – 30,3% контрольных Трег (рис. 49 Г).

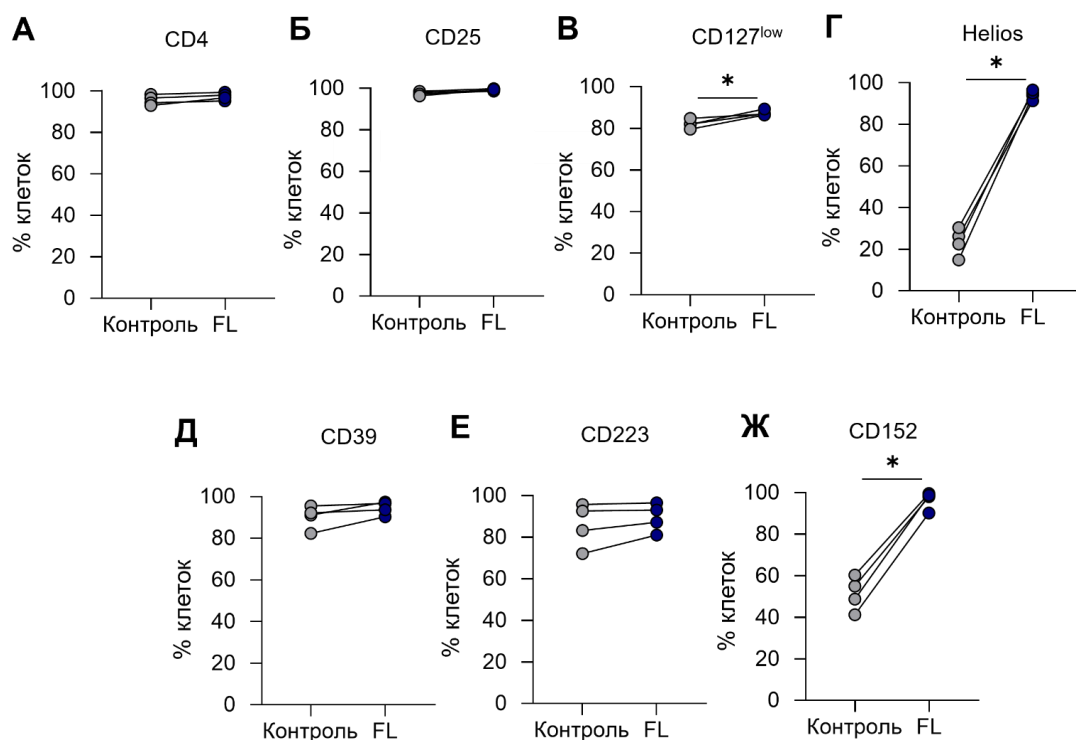


Рисунок 49. Результаты проточной цитометрии, отображающие иммунофенотип контрольных Трег и Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL. Маркёры, ассоциированные с идентификацией Трег: (А) CD4, (Б) CD25, (В) CD127. Маркёр, позволяющий идентифицировать стабильные Трег (Г) Helios. Маркёры, ассоциированные с супрессорной активностью Трег: (Д) CD39, (Е) CD223, (Ж) CD152. N = 4. * – $p < 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Кроме того, индукция FoxP3FL привела к увеличению доли CD152-положительных клеток (90,2 – 99,6%) по сравнению с 41,3 – 60,4% контрольных клеток (рис. 49 Ж). Доля клеток, экспрессирующих CD39, была высокой как среди контрольных Трег (82,4 – 95,6%), так и среди

Трег, экспрессирующих FoxP3FL (90,3 – 97,5%) (рис. 49 Д). Аналогичным образом не было выявлено существенных различий в количестве клеток, экспрессирующих CD223. 72,1 – 95,8% контрольных Трег и 81,0 – 96,6% Трег, экспрессирующих FoxP3FL, обладали фенотипом CD223 (рис. 49 Е). СИФ маркёров приведены в таблице 9 в Приложении.

4. Обсуждение

Развитие АИЗ сопряжено с нарушением функционирования Трег. Нарушения затрагивают недостаточную пролиферацию, приводящую к понижению количества Трег в периферической крови, и понижение супрессорной активности, влияющее на способность Трег ингибировать активность, в первую очередь пролиферативную, таргетных аутореактивных лимфоцитов. На сегодняшний день не сформировалась окончательная гипотеза, являются ли данные нарушения причиной или следствием патологии, или же лишь сопутствуют ей. Однозначного понимания причины дисфункции Трег при АИЗ не достигнуто. Внимание уделяют комплексному взаимодействию генетических факторов, к которым относят мутации в генах, ассоциированных с сигнальными путями Трег, с различными «триггерами» внешней среды (инфекции, стрессовые воздействия). Кроме того, нарушение дифференцировки Трег в тимусе также может приводить к дисфункции данных клеток [156].

Результаты данной работы подтвердили, что в периферической крови пациентов с РС, БАС или БШ количество Трег в популяции $CD4^+$ Т-лимфоцитов достоверно понижено, по сравнению со здоровыми донорами (рис. 15 Б).

Изменение активности Трег связывают с процессом АС мастерного белка данных клеток FoxP3. При таких АИЗ как васкулит, характеризующийся определением антинейтрофильных цитоплазматических антител, гигантоклеточный артериит, и РС изучали взаимосвязь между экспрессией сплайс-вариантов FoxP3 в Трег и развитием аутоиммунных реакций (см. раздел 1.5). При тиреоидите Хашимото, целиакии, системной красной волчанке, ревматоидном артрите рассматривали экспрессию сплайс-вариантов FoxP3 в $CD4^+$ Т-клетках. Однако, в данных исследованиях оценивали уровень экспрессии лишь двух сплайс-вариантов FoxP3: FoxP3Δ2 и FoxP3FL. Одно исследование выявило увеличение уровня экспрессии FoxP3Δ7 в $CD4^+$ Т-клетках пациентов с болезнью Крона (см. раздел 1.5). Результаты нашей работы выявили уровни экспрессии четырех основных сплайс-вариантов FoxP3 в Трег человека при таких АИЗ как РС, БАС и БШ, а также в Трег здоровых доноров (рис. 14). Показано, что в Трег периферической крови ЗД преобладающими сплайс-вариантами являются FoxP3FL и FoxP3Δ2. Впервые у здоровых доноров была определена экспрессия FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7. Уровень экспрессии данных сплайс-вариантов в Трег ЗД значительно менее выражен по сравнению с FoxP3FL и FoxP3Δ2. В Трег периферической крови пациентов с РС преобладает экспрессия FoxP3Δ2 и FoxP3Δ7. Выявленное увеличение уровня экспрессии FoxP3Δ2 в Трег пациентов с РС согласуется с данными литературы [13]. В Трег пациентов с БАС преобладает экспрессия FoxP3FL и FoxP3Δ2, однако уровень их экспрессии понижен по сравнению с Трег ЗД, и значительно повышены уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7. В Трег пациентов с БШ преобладает экспрессия сплайс-варианта FoxP3Δ7, тогда как значительно снижен уровень

экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL и повышена экспрессия FoxP3Δ2Δ7. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что при таких АИЗ как РС, БАС и БШ снижается уровень экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL и повышается уровень экспрессии сплайс-вариантов с делециями.

Описанные изменения сопровождаются пониженной экспрессией общей мРНК FoxP3 в Трег пациентов, а также снижением количества Трег в периферической крови. Данные о снижении уровня общей мРНК FoxP3 в Трег при РС [157] и БАС [158] соответствуют опубликованным ранее данным. При БШ снижение уровня общей мРНК FoxP3 прежде было определено в CD4⁺ Т-клетках [159]. Снижение количества Трег в периферической крови ранее было описано в работах, посвященных РС [130] и БАС [5]. Литературные данные по количеству Трег в периферической крови пациентов с БШ противоречивы [160], однако в ряде работ отмечается снижение количества данных клеток [161–163].

Одним из объяснений, почему в Трег пациентов упомянутых выше публикаций детекция сплайс-вариантов Трег ограничивалась только белковыми формами вариантов FoxP3FL и FoxP3Δ2, является ограниченный выбор специфичных к FoxP3 антител. Подавляющее большинство коммерчески доступных антител имеют специфичность к эпитопам общим для всех белковых форм сплайс-вариантов FoxP3. В данной работе мы использовали антитела, детектирующие эпитоп, кодируемый экзоном 2, для доказательства его включения или делеции при использовании переключающих сплайсинг олигонуклеотидов (рис. 28 и рис. 42 Б). Поэтому вопрос о получении антител, специфичных к эпитопу, кодируемому экзоном 7, является критичным для детекции белковых форм сплайс-вариантов FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7. Альтернативным подходом может стать разработка метода таргетной протеомики на основе масс-спектро스코пии. Преимуществом данного подхода является возможность обнаружения абсолютного количества белковых молекул белков сплайс-вариантов FoxP3 в образцах [164]. В рамках выполнения настоящей работы мы проводили определение количества мРНК сплайс-вариантов FoxP3 методом ОТ-ПЦР в реальном времени, что является ограничением данной работы. Зачастую не вся зрелая мРНК подвергается процессу трансляции и количество мРНК не всегда пропорционально количеству синтезируемого функционального белка [165]. Поэтому нельзя с уверенностью говорить о том, что пропорции сплайс-вариантов мРНК FoxP3 будут сохраняться на белковом уровне. Однако, соответствие результатов уровня мРНК и белков FoxP3FL и FoxP3Δ2 мы показали методом вестерн-блоттинга (рис. 28 и рис. 42 Б). В образцах, в которых обнаружили селективную индуцированную экспрессию мРНК сплайс-вариантов FoxP3Δ7 или FoxP3Δ2Δ7, не обнаружили белка с экспрессией эпитопа, кодируемого экзоном 2, но белок с эпитопом общим для всех сплайс-вариантов обнаружился. Это косвенно подтверждает селективную экспрессию на белковом уровне сплайс-вариантов с делециями экзона 7.

Помимо этого, из объема (8 мл) образцов периферической крови пациентов и доноров, предоставляемым лечебными учреждениями, применяемым в данной работе методом иммуномагнитной сепарации, удастся выделить относительно небольшое (порядка $5 \cdot 10^5$) количество Трег. Этого объема достаточно для проведения генетических исследований, но недостаточно для процедур вестерн-блоттинга. Этот факт является еще обоснованием применения метода ОТ-ПЦР в реальном времени для детекции сплайс-вариантов FoxP3.

Недостаточность количества клеток для клеточных экспериментов обусловила необходимость их размножения *ex vivo* и, следовательно, необходимость доказательства идентичности размноженных клеток исходным. Было выявлено, что Трег пациентов с РС характеризуются пониженной пролиферативной и супрессорной активностью по сравнению с Трег ЗД (рис. 16 Д и рис. 18) что согласуется с опубликованными ранее данными [131]. Размножение Трег *ex vivo* не привело к изменению уровней мРНК сплайс-вариантов FoxP3 (рис. 17), что доказывает их идентичность (по данному параметру, по крайней мере) исходным выделенным клеткам. Размноженные клетки ЗД были использованы для дальнейших клеточных экспериментов.

Для определения влияния сплайс-вариантов FoxP3 на фенотип, пролиферативную и супрессорную активность Трег осуществляли модуляцию АС пре-мРНК FoxP3 ПСО. Был произведен подбор размера и комбинации ПСО, способных индуцировать селективную экспрессию индивидуального сплайс-варианта FoxP3. Решение задачи по подбору оптимального размера ПСО является типичной задачей поиска терапевтического олигонуклеотида. Малая длина олигонуклеотида благоприятна для эффективности трансфекции, но приводит к снижению специфичности и появлению офф-таргет эффектов. Увеличение размера олигонуклеотидов увеличивает его специфичность к целевой пре-мРНК, но понижает эффективность трансфекции. Поэтому соблюдение рационального баланса между эффективностью трансфекции и способностью индуцировать АС является главным критерием подбора размера ПСО.

В нашей работе ПСО размером 36 нуклеотидов были наиболее подходящими для модуляции АС на всех исследуемых участках пре-мРНК FoxP3. Трансфекция Трег ПСО размером 36 нуклеотидов приводила к оптимальному соотношению специфичности и эффективности трансфекции (рис. 20). Было продемонстрировано, что модуляция АС одиночным ПСО не позволяет получить селективную экспрессию индивидуального сплайс-варианта FoxP3 (рис. 24). Это объясняется тем, что предшественником всех сплайс-вариантов FoxP3 является единая пре-мРНК, и модуляция АС одного экзона не влияет на другой. Получить Трег, селективно экспрессирующие индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, удалось при использовании комбинации из двух ПСО, модулирующих АС экзонов 2 и 7 одновременно.

При оценке пролиферативной и супрессорной активности Трег, экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, было выявлено, что Трег, экспрессирующие FoxP3FL, обладают повышенной пролиферативной и супрессорной активностью. Интенсивность пролиферации Трег с FoxP3FL была в 1,7 раза выше, чем у контрольных клеток, в то время как супрессорная активность данных клеток была повышена в 3 раза. Результаты данной работы не позволяют в полной мере понять биохимические, молекулярно-биологические и генетические механизмы, по которым сплайс-варианты FoxP3 реализуют свою функцию и влияют на биологию Трег. Более детальное определение уровней синтеза молекул, вовлеченных в эти процессы, протеомными методами могут дать ответ на данный вопрос. Логичным представляется проведение молекулярного профилирования цельного клеточного лизата и ядерной фракции, поскольку FoxP3 является транскрипционным фактором.

На данный момент возможно предположить, что изменения фенотипа, пролиферации и супрессорной активности Трег связаны с белковой структурой сплайс-вариантов FoxP3 и её изменением при делеции экзонов. Белковые формы сплайс-вариантов FoxP3 взаимодействуют с белками-партнёрами в нескольких сайтах, кодируемых экзонами 2 и 7. При делеции второго экзона происходит структурное изменение N-концевого домена FoxP3, отдельные сайты которого взаимодействуют с ROR α и ROR γ t, TIP60 и HDAC7, Eos (см. раздел 1.2). Данные взаимодействия приводят к подавлению транскрипции генов провоспалительных цитокинов Т-клетками. Делеция экзона 7 приводит к изменению структуры домена лейциновой молнии, отвечающего за гетеро- и гомодимеризацию FoxP3. Лейциновая молния также опосредует взаимодействие между FoxP3 и гистонами (например, гистоном H1.5), что вызывает подавление транскрипции провоспалительного *ИЛ-2* в Т-клетках. Исходя из вышеизложенного, делеция экзонов в результате АС изменяет структуру FoxP3, изменяя функционирование данного белка в качестве транскрипционного фактора, и, следовательно, изменяя процессы гомо- и гетеродимеризации. В качестве косвенного доказательства данной гипотезы приводим визуализацию димеров (рис. 50), образованными белковыми сплайс-вариантами, предсказанными искусственным интеллектом. В программе AlphaFold3 нами сгенерированы следующие структуры димеров FoxP3: димер, мономерами которого являются белковые формы FoxP3FL; димер, одним мономером которого является белковая форма FoxP3FL, а вторым белковая форма FoxP3 Δ 7; димер, мономерами которого являются белковые формы FoxP3 Δ 7.

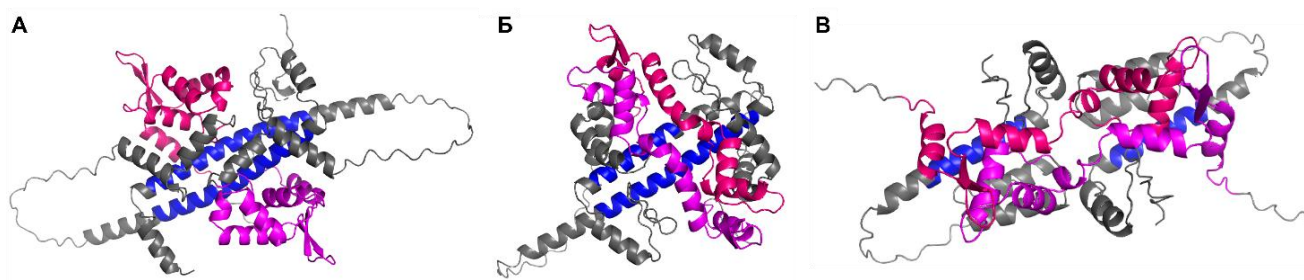


Рисунок 50. Димеризация FoxP3. (А) димер FoxP3FL - FoxP3FL; (Б) димер FoxP3FL - FoxP3Δ7; (В) димер FoxP3Δ7 - FoxP3Δ7. Лейциновая молния выделена синим цветом. Домен Forkhead одного мономера выделен розовым цветом, другого – фиолетовым. Структура сгенерирована в программе AlphaFold3 и визуализирована в программе PyMOL 2.5.2.

Можно наблюдать, что, согласно предсказанным структурам, в поддержании структуры димера FoxP3FL - FoxP3FL (рис. 50 А) задействована лейциновая молния. Кроме того, домен Forkhead в данном случае димеризуется по типу «голова к голове» (Н-Н). FoxP3FL - FoxP3Δ7 сохраняет способность к димеризации через лейциновую молнию, однако изменяется принцип димеризации доменов Forkhead, который больше не соответствует типу Н-Н (рис. 50 Б). При образовании димера FoxP3Δ7 - FoxP3Δ7 домены лейциновой молнии не задействованы в димеризации (рис. 50 В). Димеризация доменов Forkhead реализуется по принципу «обмена доменами» (domain-swapping). Несмотря на отсутствие экспериментального подтверждения приведенных данных, можно предположить, что АС пре-мРНК FoxP3, приводящий к делеции экзона 7, способствует образованию domain-swapped димера FoxP3. Возможно, это происходит вследствие потери доменами лейциновой молнии способности к димеризации. Как описано ранее (см. раздел 1.2.3.4.), domain-swapped димер не способен эффективно связываться с ДНК и Runx1, вследствие чего вовлечён в инактивацию транскрипционной активности и нарушение иммунного гомеостаза [88].

При сравнении третичной структуры белковых форм Foxp3FL и Foxp3Δ2, предсказанных в AlphaFold2 в 2021 году [125] (данные в PDB отсутствуют), было выявлено, что делеция экзона 2 приводила к конформационным изменениям, способствующим усилению связывания домена Forkhead с ДНК. Однако в данном исследовании авторами не был указан уровень достоверности предсказания. Кроме того, отсутствие у белковых форм сплайс-вариантов FoxP3Δ2, FoxP3Δ7 и FoxP3Δ2Δ7 сигналов ядерного экспорта приводит к различиям в субклеточной локализации, что может также отражаться на функционировании FoxP3 как транскрипционного активатора и репрессора. При этом механизмы, регулирующие субклеточное распределение белковых форм FoxP3, еще предстоит изучить.

В нашей работе увеличение супрессорной активности Трег, экспрессирующих FoxP3FL, соотносилось с увеличением доли клеток, экспрессирующих задействованные в супрессорных механизмах гранзимы А, В и перфорин. Помимо этого, наблюдали повышенную экспрессию супрессорных молекул CD39 и CD223. Экспрессия данных молекул, гранзимов и перфорина, а также CTLA-4 и LGALS9 (рис. 35 – 37 и рис. 40) среди Трег с делециями экзонов была понижена. Уровень экспрессии NRP1 не изменялся среди Трег, экспрессирующих различные сплайс-варианты, что может свидетельствовать об отсутствии влияния АС FoxP3 на экспрессию данной молекулы. Все группы Трег характеризовались фенотипом CD152, хотя уровень мРНК CTLA-4 при делеции экзонов снижался. Объяснением данному наблюдению может являться то, что последствие АС в момент проведения эксперимента определялось только на уровне мРНК и синтез белковой молекулы CTLA-4 и его транслокация на мембрану Трег отставал во времени от синтеза мРНК. В дополнение к этому, понижение супрессорной и пролиферативной активности Трег при делеции экзонов согласуется со снижением их способности продуцировать супрессорные цитокины ИЛ-10 и ИЛ-35; цитокина, стимулирующего активацию и пролиферацию ИЛ-12; и цитокинов, индуцирующих противовоспалительную активность (ИЛ-19, ИЛ-20, ИЛ-22, ИЛ-28 и ИЛ-29) (рис. 39). Увеличение супрессорной активности Трег, экспрессирующих FoxP3FL, также обусловлено их способностью более эффективно, по сравнению с контрольными клетками, подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях. При делециях одного или обоих экзонов Трег подавляли теломеразу менее эффективно, чем контрольные клетки (рис. 38).

Популяцию Трег принято характеризовать фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{low}$. При делеции экзонов 2 и 7 наблюдали уменьшение количества CD25-положительных клеток. Делеция одного или обоих экзонов приводила к уменьшению доли клеток с фенотипом $CD127^{low}$, а также с фенотипом Helios (рис. 40).

Разработанный подход, позволяющий осуществить модуляцию АС пре-мРНК FoxP3 в сторону селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL, использовали в дальнейшей работе по получению Трег с увеличенной пролиферативной и супрессорной активностью у пациентов с БАС. Мы показали, что данный подход применим для увеличения пролиферативной и супрессорной активности изначально «дефектных» Трег пациентов. Степень нейровоспаления у пациентов с БАС ассоциирована с уменьшением количества Трег и понижением экспрессии общей мРНК FoxP3. Это приводит к прогрессированию заболевания и снижению шансов на выживание как на мышинных моделях, так и у пациентов [166]. При индукции экспрессии FoxP3FL Трег характеризовались увеличением пролиферативной активности в 1,6 раз и увеличением супрессорной активности в 4 раза (рис. 44 и рис. 46). Было показано, что Трег, экспрессирующие FoxP3FL, обладают фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{low}$. Уровень экспрессии

CD4, CD25, CD127 не отличался от контрольных клеток (рис. 49). Разницу наблюдали в уровне экспрессии CD152, маркера, вовлеченного в супрессорную активность и Helios, маркера, позволяющего идентифицировать стабильную популяцию Трег. Повышение уровня экспрессии данных маркеров может свидетельствовать о том, что Трег, экспрессирующие FoxP3FL, являются более стабильными и функционально активными. Взаимосвязь между повышением уровня экспрессии Helios и высокой стабильностью популяции Трег согласуется с данными литературы [167]. Уровень экспрессии CD39 и CD223 не различался среди Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL и среди контрольных клеток. Однако способность продуцировать гранзимы А, В и перфорин, вовлеченные в контакт-зависимые супрессорные механизмы, была значительно выше при индукции сплайс-варианта FoxP3FL (рис. 47). Таким образом, можно предположить, что экспрессия FoxP3FL способствует реализации гранзим-опосредованной супрессорной активности. Что же касается контакт-независимых механизмов, Трег с селективной экспрессией FoxP3FL характеризовались усилением синтеза супрессорных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-35, а также повышенной способностью подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях (рис. 48).

При оценке активности Трег, экспрессирующих различные сплайс-варианты FoxP3, возникает вопрос, в чем заключается биологическая роль АС пре-мРНК FoxP3 в контексте функционирования Трег. Мы предложили следующее объяснение. При делеции экзонов понижается супрессорная активность Трег, что приводит к уменьшению числа супрессированных данными клетками CD4⁺- и CD8⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток. Учитывая тот факт, что цитотоксическим Т-лимфоцитам и НК-клеткам отводится основная роль в противоопухолевом иммунитете, и повышение их уровня коррелирует с улучшенными противоопухолевыми эффектами и прогнозом при различных типах рака, увеличение их количества при понижении супрессорной активности Трег соответствует улучшению противоопухолевого ответа. Подтверждением описанному явлению служит тот факт, что увеличение количества Трег является плохим прогностическим признаком при различных типах опухолей [168]. Гипотетически, уровень функциональных Трег, можно рассматривать как один из факторов, определяющих баланс в системе «противоопухолевый иммунитет – аутоиммунитет». Поэтому АС пре-мРНК FoxP3 можно считать инструментом «тонкой настройки» функциональной активности Трег в регуляции иммунного ответа, как противоопухолевого, так и аутоиммунитета. Обычно такая форма регуляции функции белка и клеточных процессов встречается, когда какой-либо клеточный процесс развивается слишком быстро или заходит слишком «далеко». Ранее подобный процесс регуляции был описан для белков, ассоциированных с апоптозом или клеточной пролиферацией [169,170].

Попробовать объяснить влияние различных сплайс-вариантов FoxP3 на активность Трег при различных АИЗ можно с помощью понятия «доминантно-негативная форма» мРНК или белка (англ. *dominant-negative form*) [171,172]. При изменении процесса АС FoxP3 в сторону усиленной экспрессии сплайс-варианта с делецией одного и/или двух экзонов образующаяся впоследствии белковая форма конкурирует с белковой формой FoxP3FL и в дальнейшем становится доминирующей, изменяя влияние FoxP3 на активность Трег, что, вероятно, проявляется снижением супрессорной и пролиферативной активности данных клеток. Однако факторы, приводящие к изменению АС в сторону образования сплайс-вариантов с делециями при каждом конкретном АИЗ еще предстоит изучить.

Следует упомянуть несколько свойственных данной работе ограничений. Некоторые уже обозначены выше. Во-первых, число пациентов и здоровых доноров невелико ($n = 20$) для полной статистической достоверности. Однако полученных данных было достаточно, чтобы показать различия между экспрессиями сплайс-вариантов FoxP3 у пациентов и у здоровых доноров. Во-вторых, доступные на момент исследования антитела позволили прямо подтвердить наличие белковой формы при делеции экзона 2, однако необходимо дальнейшее подтверждение наличия белковых форм всех сплайс-вариантов FoxP3. При этом использование в данной работе ОТ-ПЦР в реальном времени способствовало успешному выявлению сплайс-вариантов FoxP3 на уровне мРНК. В-третьих, результаты проведенной работы также указывают на пластичность Трег даже среди отдельных пациентов и здоровых доноров. Таким образом, анализ всех изолированных клеток дает средний уровень экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 и клеточных маркёров. Вероятно, протеомный анализ отдельных клеток может дать более полный ответ о взаимосвязи между АС FoxP3 и Трег-ассоциированными молекулами. В-четвертых, лишь небольшое количество Трег удастся выделить из периферической крови, что затрудняет проведение функциональных тестов. Несмотря на то, что размножение клеток *ex vivo* не привело к изменениям в уровнях экспрессии сплайс-вариантов FoxP3, данная процедура может повлиять на другие клеточные параметры, сделав их отличными от параметров Трег в периферической крови. Частично этот вопрос может быть решен вышеупомянутым протеомным исследованием отдельных клеток, но необходимо разработать функциональные тесты, учитывающие наличие небольшого количества клеток. В-пятых, модуляция АС с помощью ПСО обеспечивает качественную, но временную индукцию селективной экспрессии сплайс-вариантов FoxP3. Возможно, временной модуляции АС достаточно для реализации Трег, селективно экспрессирующими индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, биологических функций. При этом стабильные линии Трег, селективно экспрессирующие индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, в будущем возможно получить с применением технологии CRISPR/Cas.

Анализируя дальнейшие перспективы, можно сказать следующее. До сих пор остается не до конца выясненным, как именно Трег вовлечены в патогенез АИЗ. Одной из причин является использование различных фенотипов для идентификации Трег группами исследователей. Большинство исследований сосредоточены на Трег, циркулирующих в периферической крови, однако Трег, локализующиеся в тканях, зачастую не рециркулируют через кровоток. Тем не менее, поддержание иммунологического гомеостаза зависит и от резидентных в тканях Трег, что подчеркивает необходимость изучения Трег не только в периферической крови, но и в тканях. Возможно, уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в тканевых Трег будут отличаться от таковых в Трег периферической крови. Кроме того, весьма перспективным кажется проведение дальнейших исследований, направленных на изучение взаимодействия Трег с другими иммунными клетками, а также на механизмы, позволяющие им инфильтрировать в пораженные болезнью ткани.

Остается открытым вопрос об идентификации индивидуальных белковых форм сплайс-вариантов FoxP3 в образцах (в т.ч. образцах от пациентов) и выяснении биохимических механизмов реализации пролиферативной и супрессорной активности. Как сказано выше, мы полагаем, что разработка методов таргетной протеомики для первого случая и протеомного молекулярного профилирования для второго способно дать ответ на эти вопросы.

Для лечения аутоиммунных заболеваний разрабатываемый широкий спектр клеточной и не клеточной терапии сосредоточен на улучшении противовоспалительных или толерогенных аспектов иммунной системы. Регенеративная клеточная терапия с использованием аутологичных Трег может являться перспективным подходом, позволяющим достичь улучшения периферической иммунологической толерантности. Разрабатываемые и оцениваемые в ходе клинических испытаний виды Трег-клеточной терапии для АИЗ не рассматривают АС FoxP3 в качестве терапевтической мишени. При этом одним из известных лимитирующих факторов применения аутологичных Трег в целях регенеративной терапии является их небольшое количество. Результаты нашей работы дают возможный ответ на вопрос, почему у пациентов с АИЗ понижается количество и нарушается супрессорная активность Трег. Описанный в данной работе подход по увеличению пролиферативной и супрессорной активности аутологичных Трег при индукции селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL с помощью ПСО у пациентов с АИЗ с выявленными отклонениями пропорции сплайс-вариантов FoxP3, может быть использован в целях регенеративной терапии в дальнейшем. Однако для перехода к регенеративной медицине необходимо провести множество экспериментов по совершенствованию различных стадий получения Трег, пригодных для регенеративной терапии, включая оптимизацию методов их получения и стабилизации. Возможно, при АИЗ применение найдет комбинация Трег-клеточной терапии с другими методами лечения. Кроме того, учитывая полученные данные,

демонстрирующие разницу в уровнях экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 среди пациентов с одним и тем же АИЗ, перспективным направлением дальнейшей работы может быть разработка специфичного вида клеточной терапии для индивидуального пациента, сочетающего в себе воздействие на FoxP3, и на другие Трег-ассоциированные молекулы. Однозначно, понимание функционирования сплайс-вариантов FoxP3 и механизма биологических последствий их действия на иммунные клетки должны быть учтены при развитии данных подходов.

5. Заключение

Результаты данной работы отражают попытку объяснить биохимические основы функционирования Трег как при физиологических условиях, так и при развитии иммунопатологических состояний, в частности, при аутоиммунных заболеваниях. Механизмы активации, перестройки иммунной системы и возникновения в ней отклонений при развитии АИЗ изучены недостаточно полно. Особое место в реализации иммунного ответа занимают Трег, регулирующие функционирование аутоактивированных лимфоцитов, поддерживающих иммунный гомеостаз и предотвращающих развитие аутоиммунных реакций. Результаты данной работы показали, что АС FoxP3 оказывает влияние на несколько аспектов функционирования Трег. Изменения в уровнях экспрессии четырех основных сплайс-вариантов FoxP3 в сторону преобладания вариантов с делециями экзонов у пациентов с АИЗ соотносились со снижением количества Трег в периферической крови. Нарушение супрессорной активности данных клеток при преобладании сплайс-вариантов с делециями было показано на Трег пациентов с РС.

Для более детального изучения взаимосвязи между АС FoxP3 и изменением активности Трег была поставлена задача получения Трег, экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3. Селективную экспрессию индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 удалось получить при помощи ПСО, способных индуцировать АС экзонов 2 или 7. В условиях *in vitro* выявили, что Трег с полноразмерным сплайс-вариантом FoxP3 обладают наибольшей супрессорной и пролиферативной активностью, тогда как Трег с делециями экзонов менее активны. Более детально последствия АС FoxP3 изучали на молекулярном уровне, выявив взаимосвязь между делецией или включением экзонов и изменением уровня синтеза молекул, необходимых для реализации контакт-зависимых и контакт-независимых супрессорных механизмов Трег.

К связанным с функционированием Трег биохимическим компонентам иммунной системы относят такие сигнальные молекулы, как ИЛ-10 и ИЛ-35. Данные цитокины способствуют подавлению активности эффекторных лимфоцитов, что является одним из механизмов, ограничивающих гиперактивацию иммунной системы. Определяли уровень синтеза вовлеченных в контакт-независимую активность Трег гранзимов А и В, ассоциированного с гранзимами перфорины, а также CD39. Среди контакт-независимых механизмов особо выделяют способность Трег подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях. Включение или делеции экзонов приводили к изменению эффективности подавления теломеразы в таргетных клетках Трег. Контакт-зависимая супрессорная активность Трег осуществляется путем воздействия на клетки-мишени поверхностных молекул CTLA-4 (CD152) и LAG-3 (CD223). В работе отражены данные по изменению уровня синтеза Трег-ассоциированных супрессорных цитокинов, гранзимов, перфорины и других молекул при включении или делеции экзонов. При модуляции

АС пре-мРНК FoxP3 изменялся иммунофенотип Трег. Таким образом, полученные результаты позволили определить последствия АС FoxP3 на молекулярном уровне и соотнести их с изменением активности Трег.

Разработанный подход был применен для модуляции АС пре-мРНК в Трег пациентов с БАС. Индукция селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL позволила получить Трег, характеризующиеся увеличенной пролиферативной и супрессорной активностью. Это означает, что данный подход применим для увеличения количества и улучшения супрессорной функции Трег с уже имеющимися отклонениями АС FoxP3. В случае дальнейшего изучения и развития данный подход применим для разработки клеточного продукта Трег и может стать фундаментальной основой редактирования генома Трег для целей регенеративной терапии.

Выводы

1. Трег периферической крови пациентов с РС, БАС и БШ характеризуются изменением АС пре-мРНК FoxP3 в сторону экспрессии сплайс-вариантов с делециями экзона 7 и с делециями экзонов 2 и 7. По сравнению со здоровыми донорами экспрессия сплайс-вариантов FoxP3FL и FoxP3Δ2 снижена в Трег пациентов всех групп.
2. Селективная экспрессия индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 достигается путём применения пары переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, модулирующих АС пре-мРНК FoxP3 в области как 2, так и 7 экзона. Олигонуклеотиды размером 36 оснований оптимальны по соотношению специфичности и эффективности трансфекции.
3. Среди Трег, экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3, у здоровых доноров наибольшей скоростью пролиферации и способностью ингибировать эффекторные лимфоциты обладают Трег с полноразмерным сплайс-вариантом. Такие клетки наиболее эффективно синтезируют супрессорные гранзимы А и В, перфорин, цитокины ИЛ-10 и ИЛ-35, а также подавляют активность теломеразы. У Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делециями экзонов, способность синтезировать эти молекулы, супрессорная активность и скорость пролиферации значительно снижены.
4. Индукция индивидуальных сплайс-вариантов не влияет на уровень синтеза мембранных маркёров Трег CD4 и CD152. Индукция экспрессии FoxP3FL приводит к увеличению синтеза, мембранного маркёра CD127^{low}, маркёров супрессорной активности CD39 и CD223, а также маркёра стабильности Трег Helios. Индукция делеционных вариантов приводит к значительному снижению синтеза маркёров CD127^{low}, CD39, CD223 и Helios. Уровень синтеза мембранного маркёра CD25 понижается только в Трег с делециями экзонов 2 и 7.
5. Применение переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, индуцирующих включение экзонов 2 и 7 в мРНК FoxP3, приводит к селективной экспрессии полноразмерного сплайс-варианта FoxP3FL и вызывает увеличение пролиферативной и супрессорной активности Трег пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.

Список использованной литературы

1. Dikiy S., Rudensky A.Y. Principles of Regulatory T Cell Function // Immunity. — 2023. — V. 56. — P. 240 — 255.
2. Verreycken J., Baeten P., Broux B. Regulatory T Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Breaching (Blood-Brain) Barriers // Hum Vaccin Immunother. — 2022. — V. 18. P. — e2153534.
3. Nocturne G., Mariette X. Expert Perspective: Challenges in Sjögren's Disease // Arthritis & Rheumatology. — 2023. — V. 75. — P. 2078 — 2087.
4. Tzeplaeff L., Wilfling S., Requardt M.V., Herdick M. Current State and Future Directions in the Therapy of ALS // Cells. — 2023. — V. 12. — P. 1523.
5. Giovannelli I., Heath P., Shaw P.J., Kirby J. The Involvement of Regulatory T Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Their Therapeutic Potential // Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener. — 2020. — V. 21. — P. 435 — 444.
6. Hori S. FOXP3 as a Master Regulator of Treg Cells // Nature Reviews Immunology. — 2021. — V. 21. — P. 618 — 619.
7. Mailer R.K.W. Alternative Splicing of FOXP3-Virtue and Vice // Front Immunol. — 2018. — V. 9. — P. 338666.
8. Allan S.E., Passerini L., Bacchetta R., Crellin N., Dai M., Orban P.C., Ziegler S.F., Roncarolo M.G., Levings M.K. The Role of 2 FOXP3 Isoforms in the Generation of Human CD4⁺ Tregs // J Clin Invest. — 2005. — V. 115. — P. 3276 — 3284.
9. Du J., Wang Q., Yang S., Chen S., Fu Y., Spath S., Domeier P., Hagin D., Anover-Sombke S., Haouili M. et al. FOXP3 Exon 2 Controls Treg Stability and Autoimmunity // Sci Immunol. — 2022. — V. 7. — P. eabo5407.
10. Free M.E., Bunch D.O.D., McGregor J.A., Jones B.E., Berg E.A., Hogan S.L., Hu Y., Preston G.A., Jennette J.C., Falk R.J., et al. Patients with Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Have Defective Treg Cell Function Exacerbated by the Presence of a Suppression-Resistant Effector Cell Population // Arthritis Rheum. — 2013. — V. 65. — P. 1922 — 1933.
11. Kristensen B., Hegedüs L., Madsen H.O., Smith T.J., Nielsen C.H. Altered Balance between Self-Reactive T Helper (Th)17 Cells and Th10 Cells and between Full-Length Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) and FoxP3 Splice Variants in Hashimoto's Thyroiditis // Clin Exp Immunol. — 2015. — V. 180. — P. 58 — 69.
12. Miyabe C., Miyabe Y., Strle K., Kim N.D., Stone J.H., Luster A.D., Unizony S. An Expanded Population of Pathogenic Regulatory T Cells in Giant Cell Arteritis Is Abrogated by IL-6 Blockade Therapy // Ann Rheum Dis. — 2017. — V. 76. — P. 898 — 905.

13. Sambucci M., Gargano F., De Rosa V., De Bardi M., Picozza M., Placido R., Ruggieri S., Capone A., Gasperini C., Matarese G., et al. FoxP3 Isoforms and PD-1 Expression by T Regulatory Cells in Multiple Sclerosis // *Scientific Reports*. — 2018. — V. 8. — P. 1 — 9.
14. Dominski Z., Kole R. Restoration of Correct Splicing in Thalassemic Pre-mRNA by Antisense Oligonucleotides // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1993. — V. 90. P. — 8673 — 8677.
15. Kim J., Woo S., de Gusmao C.M., Zhao B., Chin D.H., DiDonato R.L., Nguyen M.A., Nakayama T., Hu C.A., Soucy A., et al. A Framework for Individualized Splice-Switching Oligonucleotide Therapy // *Nature*. — 2023. — V. 619. — P. 828 — 836.
16. Chen S., Heendeniya S.N., Le B.T., Rahimizadeh K., Rabiee N., Zahra Q. ul ain, Veedu R.N. Splice-Modulating Antisense Oligonucleotides as Therapeutics for Inherited Metabolic Diseases // *BioDrugs*. — 2024. — V. 38. — P. 177 — 203.
17. Zhang X. Splice-Switching Antisense Oligonucleotides for Pediatric Neurological Disorders // *Front Mol Neurosci*. — 2024. — V. 17. — P. 1412964.
18. McDonald C.M., Shieh P.B., Abdel-Hamid H.Z., Connolly A.M., Ciafaloni E., Wagner K.R., Goemans N., Mercuri E., Khan N., Koenig E., et al. Open-Label Evaluation of Eteplirsen in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy Amenable to Exon 51 Skipping: PROMOTED Trial // *J Neuromuscul Dis*. — 2021. — V. 8. — P. 989.
19. Mercuri E., Darras B.T., Chiriboga C.A., Day J.W., Campbell C., Connolly A.M., Iannaccone S.T., Kirschner J., Kuntz N.L., Saito K., et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy // *New England Journal of Medicine*. — 2018. — V. 378. — P. 625 — 635.
20. Nishizuka Y., Sakakura T. Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice // *Science*. — 1969. — V. 166. — P. 753 — 755.
21. Nishizuka Y., Sakakura T., Tanaka Y. Ovarian Dysgenesis Induced by Neonatal Thymectomy in the Mouse // *Endocrinology*. — 1971. — V. 89. — P. 886 — 893.
22. Gershon R.K., Cohen P., Hencin R., Liebhaver S.A. Suppressor T Cells // *The Journal of Immunology*. — 1972. — V. 108. — P. 586 — 590.
23. Fehervari Z., Sakaguchi S. Peacekeepers of the Immune System // *Sci Am*. — 2006. — V. 295. — P. 56 — 63.
24. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor Alpha-Chains (CD25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases // *J Immunol*. — 1995. — V. 155. — P. 1151 — 1164.

25. Owen D.L., Mahmud S.A., Sjaastad L.E., Williams J.B., Spanier J.A., Simeonov D.R., Ruscher R., Huang W., Proekt I., Miller C.N., et al. Thymic Regulatory T Cells Arise via Two Distinct Developmental Programs // *Nature Immunology*. — 2019. — V. 20. — P. 195 — 205.
26. Owen D.L., Sjaastad L.E., Farrar M.A. Regulatory T Cell Development in the Thymus // *The Journal of Immunology*. — 2019. — V. 203. — P. 2031 — 2041.
27. Ono M. Control of Regulatory T-Cell Differentiation and Function by T-Cell Receptor Signalling and Foxp3 Transcription Factor Complexes // *Immunology*. — 2020. — V. 160. — P. 24 — 37.
28. Savage P.A., Klawon D.E.J., Miller C.H. Regulatory T Cell Development // *Annu Rev Immunol*. — 2020. — V. 38. — P. 421 — 453.
29. Шевырев Д. В., Козлов V.A. Влияние гомеостатических цитокинов – IL-7 и IL-15 на Т-регуляторные клетки *in vitro* // *Медицинская иммунология*. — 2021. — Т. 23. — С. 671 – 676.
30. Haddadi M.H., Negahdari B. Clinical and Diagnostic Potential of Regulatory T Cell Markers: From Bench to Bedside // *Transpl Immunol*. — 2022. — V. 70. — P. 101518.
31. Sjaastad L.E., Owen D.L., Tracy S.I., Farrar M.A. Phenotypic and Functional Diversity in Regulatory T Cells // *Front Cell Dev Biol*. — 2021. — V. 9. — P. 715901.
32. Cheru N., Hafler D.A., Sumida T.S. Regulatory T Cells in Peripheral Tissue Tolerance and Diseases // *Front Immunol*. — 2023. — V. 14. — P. 1154575.
33. Roy D., Bose S., Pati S., Guin A., Banerjee K., Saha S., Singhal A.K., Chakraborty J., Sarkar D.K., Sa G. GFI1/HDAC1-Axis Differentially Regulates Immunosuppressive CD73 in Human Tumor-Associated FOXP3⁺ Th17 and Inflammation-Linked Th17 Cells // *Eur J Immunol*. — 2021. — V. 51. — P. 1206 — 1217.
34. McCallion O., Bilici M., Hester J., Issa F. Regulatory T-Cell Therapy Approaches // *Clin Exp Immunol*. — 2023. — V. 211. — P. 96 — 107.
35. Караваева О.С., Дроков М.Ю., Хамаганова Е.Г. Т-Регуляторные Клетки и Трансплантация Аллогенных Гемопозитических Стволовых Клеток // *Трансплантология*. — 2022. — Т. 14. — С. 462–475.
36. Sun I., Oh M., Zhao L., Patel C., Arwood M., Xu W., Tam A., Blosser R., Wen J., Powell J. MTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3⁺ Regulatory T Cells // *The Journal of Immunology*. — 2018. — V. 201. — P. 481. — 492.
37. Fu Z., Wang S., Li J., Zhang Y., Li H., Li G., Wan X., Zhang Y. Biological Role of GITR/GITRL in Attributes and Immune Responses of Macrophage // *J Leukoc Biol*. — 2020. — V. 107. — P. 309 — 321.

38. Amoozgar Z., Kloepper J., Ren J., Tay R.E., Kazer S.W., Kiner E., Krishnan S., Posada J.M., Ghosh M., Mamessier E., et al. Targeting Treg Cells with GITR Activation Alleviates Resistance to Immunotherapy in Murine Glioblastomas // *Nat Commun.* — 2021. — V. 12. — P. 2582 — 2582.
39. Kumar P., Marinelarena A., Raghunathan D., Ragothaman V.K., Saini S., Bhattacharya P., Fan J., Epstein A.L., Maker A. V., Prabhakar B.S. Critical Role of OX40 Signaling in the TCR-Independent Phase of Human and Murine Thymic Treg Generation // *Cellular & Molecular Immunology.* — 2018. — V. 16. — P. 138 — 153.
40. Medler J., Wajant H. Tumor Necrosis Factor Receptor-2 (TNFR2): An Overview of an Emerging Drug Target // *Expert Opin Ther Targets.* — 2019. — V. 23. — P. 295 — 307.
41. Watson H.A., Durairaj R.R.P., Ohme J., Alatsatianos M., Almutairi H., Mohammed R.N., Vigar M., Reed S.G., Paisey S.J., Marshall C., et al. L-Selectin Enhanced T Cells Improve the Efficacy of Cancer Immunotherapy // *Front Immunol.* — 2019. — V. 10. — P. 456593.
42. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis // *Front Immunol.* — 2020. — V. 10. — P. 495736.
43. Alrumaihi F. The Multi-Functional Roles of CCR7 in Human Immunology and as a Promising Therapeutic Target for Cancer Therapeutics // *Front Mol Biosci.* — 2022. — V. 9. — P. 834149.
44. Thornton A.M., Shevach E.M. Helios: Still behind the Clouds // *Immunology.* — 2019. — V. 158. — P. 161 — 170.
45. Lam A.J., Uday P., Gillies J.K., Levings M.K. Helios Is a Marker, Not a Driver, of Human Treg Stability // *Eur J Immunol.* — 2022. — V. 52. — P. 75 — 84.
46. Harjunpää H., Guillerey C. TIGIT as an Emerging Immune Checkpoint // *Clin Exp Immunol.* — 2020. — V. 200. — P. 108 — 119.
47. Timperi E., Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells // *Int J Mol Sci.* — 2021. — V. 22. — P. 8068.
48. Jiang X., Wu X., Xiao Y., Wang P., Zheng J., Wu X., Jin Z. The Ectonucleotidases CD39 and CD73 on T Cells: The New Pillar of Hematological Malignancy // *Front Immunol.* — 2023. — V. 14. — P. 1110325.
49. Hossen M.M., Ma Y., Yin Z., Xia Y., Du J., Huang J.Y., Huang J.J., Zou L., Ye Z., Huang Z. Current Understanding of CTLA-4: From Mechanism to Autoimmune Diseases // *Front Immunol.* — 2023. — P. 1198365.
50. Oyewole-Said D., Konduri V., Vazquez-Perez J., Weldon S.A., Levitt J.M., Decker W.K. Beyond T-Cells: Functional Characterization of CTLA-4 Expression in Immune and Non-Immune Cell Types // *Front Immunol.* — 2020. — V. 11. — P. 608024.

51. Chocarro L., Blanco E., Zuazo M., Arasanz H., Bocanegra A., Fernández-Rubio L., Morente P., Fernández-Hinojal G., Echaide M., Garnica M., et al. Understanding LAG-3 Signaling // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2021. — V. 22. — P. 5282.
52. Gertel S., Polachek A., Elkayam O., Furer V. Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3) Regulatory T Cells: An Evolving Biomarker for Treatment Response in Autoimmune Diseases // *Autoimmun Rev*. — 2022. — V. 21. — P. 103085.
53. Zimmer N., Trzeciak E.R., Graefen B., Satoh K., Tuettenberg A. GARP as a Therapeutic Target for the Modulation of Regulatory T Cells in Cancer and Autoimmunity // *Front Immunol*. — 2022. — V. 13. — P. 928450.
54. Metelli A., Salem M., Wallace C.H., Wu B.X., Li A., Li X., Li, Z. Immunoregulatory Functions and the Therapeutic Implications of GARP-TGF- β in Inflammation and Cancer // *Journal of Hematology & Oncology*. — 2018. — V. 11. — P. 1 — 11.
55. Chen W., Huang W., Xue Y., Chen Y., Qian W., Ma J., August A., Wang J., Zheng S.G., Lin J. Neuropilin-1 Identifies a New Subpopulation of TGF- β -Induced Foxp3⁺ Regulatory T Cells With Potent Suppressive Function and Enhanced Stability During Inflammation // *Front Immunol*. — 2022. — V. 13. — P. 900139.
56. Wegrzyn A.S., Kedzierska A.E., Obojski A. Identification and Classification of Distinct Surface Markers of T Regulatory Cells // *Front Immunol*. — 2023. — V. 13. — P. 7990.
57. Goldmann O., Nwofor O.V., Chen Q., Medina, E. Mechanisms Underlying Immunosuppression by Regulatory Cells // *Front Immunol*. — 2024. — V. 15. — P. 1328193.
58. 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. 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*. — 2018. — V. 331. — P. 146 — 160.
59. 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. Contact-Independent Suppressive Activity of Regulatory T Cells Is Associated with Telomerase Inhibition, Telomere Shortening and Target Lymphocyte Apoptosis // *Mol Immunol*. — 2018. — V. 101. — P. 229 — 244.
60. Wang D., Lei L. Interleukin-35 Regulates the Balance of Th17 and Treg Responses during the Pathogenesis of Connective Tissue Diseases // *Int J Rheum Dis*. — 2021. — V. 24. — P. 21 — 27.
61. Deng Z., Fan T., Xiao C., Tian H., Zheng Y., Li C., He J. TGF- β Signaling in Health, Disease and Therapeutics // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2024. — V. 9. — P. 1 — 40.
62. Cigalotto L., Martinvalet D. Granzymes in Health and Diseases: The Good, the Bad and the Ugly // *Front Immunol*. — 2024. — V. 15. — P. 1371743.

63. Harris F., Berdugo Y.A, Tree T. IL-2-Based Approaches to Treg Enhancement // *Clin Exp Immunol.* — 2023. — V. 211. — P. 149 — 163.
64. Bacchetta R., Barzaghi F., Roncarolo M.G. From IPEX Syndrome to FOXP3 Mutation: A Lesson on Immune Dysregulation // *Ann N Y Acad Sci.* — 2018. — V. 1417. — P. 5 — 22.
65. Chatila T.A., Blaeser F., Ho N., Lederman H.M., Voulgaropoulos C., Helms C., Bowcock A.M. JM2, Encoding a Fork Head–Related Protein, Is Mutated in X-Linked Autoimmunity–Allergic Disregulation Syndrome // *Journal of Clinical Investigation.* — 2000. — V. 106. — P. 75 — 81.
66. Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paepers B., Clark L.B., Yasayko S.A., Wilkinson J.E., Galas D., Ziegler S.F., Ramsdell F. Disruption of a New Forkhead/Winged-Helix Protein, Scurfin, Results in the Fatal Lymphoproliferative Disorder of the Scurfy Mouse // *Nat Genet.* — 2001. — V. 27. — P. 68 — 73.
67. Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F., Ochs H.D. The Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IPEX) Is Caused by Mutations of FOXP3 // *Nat Genet.* — 2001. — V. 27. — P. 20 — 21.
68. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells // *Nature Immunology.* — 2003. — V. 4. — P. 330 — 336.
69. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3 // *Science.* — 2003. — V. 299. — P. 981— 985.
70. 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. 993 — 998.
71. Williams L.M., Rudensky A.Y. Maintenance of the Foxp3-Dependent Developmental Program in Mature Regulatory T Cells Requires Continued Expression of Foxp3 // *Nature Immunology.* — 2007. — V. 8. — P. 277 — 284.
72. Raugh A., Allard D., Bettini M. Nature vs. Nurture: FOXP3, Genetics, and Tissue Environment Shape Treg Function // *Front Immunol.* — 2022. — V. 13. — P. 911151.
73. Ono M. Control of Regulatory T-Cell Differentiation and Function by T-Cell Receptor Signalling and Foxp3 Transcription Factor Complexes // *Immunology.* — 2020. — V. 160. — P. 24 — 37.
74. Liu Z., Lee D.S., Liang Y., Zheng Y., Dixon J.R. Foxp3 Orchestrates Reorganization of Chromatin Architecture to Establish Regulatory T Cell Identity // *Nat Commun.* — 2023. — V. 14. — P. 6493.

75. Kim J.H., Hwang J., Jung J.H., Lee H.J., Lee D.Y., Kim S.H. Molecular Networks of FOXP Family: Dual Biologic Functions, Interplay with Other Molecules and Clinical Implications in Cancer Progression // *Molecular Cancer*. — 2019. — V. 18. — P. 1 — 19.
76. Mertowska P., Mertowski S., Podgajna M., Grywalska E. The Importance of the Transcription Factor Foxp3 in the Development of Primary Immunodeficiencies // *J Clin Med*. — 2022. — V. 11. — P. 947.
77. Dikiy S., Li J., Bai L., Jiang M., Janke L., Zong X., Hao X., Hoyos B., Wang Z.M., Xu B., et al. A Distal Foxp3 Enhancer Enables Interleukin-2 Dependent Thymic Treg Cell Lineage Commitment for Robust Immune Tolerance // *Immunity*. — 2021. — V. 54. — P. 931 — 946.
78. Kawakami R., Kitagawa Y., Chen K.Y., Arai M., Ohara D., Nakamura Y., Yasuda K., Osaki M., Mikami N., Lareau C.A., et al. Distinct Foxp3 Enhancer Elements Coordinate Development, Maintenance, and Function of Regulatory T Cells // *Immunity*. — 2021. — V. 54. — P. 947 — 961.
79. Fulford T.S., Grumont R., Wirasinha R.C., Ellis D., Barugahare A., Turner S.J., Naeem H., Powell D., Lyons P.A., Smith K.G.C., et al. C-Rel Employs Multiple Mechanisms to Promote the Thymic Development and Peripheral Function of Regulatory T Cells in Mice // *Eur J Immunol*. — 2021. — V. 51. — P. 2006 — 2026.
80. Dong Y., Yang C., Pan F. Post-Translational Regulations of Foxp3 in Treg Cells and Their Therapeutic Applications // *Front Immunol*. — 2021. — V. 12. — P. 626172.
81. Thulo M., Rabie M.A., Pahad N., Donald H.L., Blane A.A., Perumal C.M., Carlos Penedo J., Fanucchi S. The Influence of Various Regions of the FOXP2 Sequence on Its Structure and DNA-Binding Function // *Biosci Rep*. — 2021. — V. 41. — BSR20202128.
82. Knethen A., Heinicke U., Weigert A., Zacharowski K., Brüne B. Histone Deacetylation Inhibitors as Modulators of Regulatory T Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — V. 21. — P. 2356.
83. Deng G., Song X., Greene M.I. FoxP3 in Treg Cell Biology: A Molecular and Structural Perspective // *Clin Exp Immunol*. — 2020. — V. 199. — P. 255 — 262.
84. Li X., Han M., Zhang H., Liu F., Pan Y., Zhu J., Liao Z., Chen X., Zhang B. Structures and Biological Functions of Zinc Finger Proteins and Their Roles in Hepatocellular Carcinoma // *Biomark Res*. — 2022. — V. 10. — P. 1 — 13.
85. Zhang X., Blumenthal R.M., Cheng X. Updated Understanding of the Protein–DNA Recognition Code Used by C2H2 Zinc Finger Proteins // *Curr Opin Struct Biol*. — 2024. — V. 87. — P. 102836.
86. Song X., Li B., Xiao Y., Chen C., Wang Q., Liu Y., Berezov A., Xu C., Gao Y., Li Z., et al. Structural and Biological Features of FOXP3 Dimerization Relevant to Regulatory T Cell Function // *Cell Rep*. — 2012. — V. 1. — P. 665.

87. Kim D.H., Kim H.Y., Cho S., Yoo S.J., Kim W.J., Yeon H.R., Choi K., Choi J.M., Kang S.W., Lee W.W. Induction of the IL-1RII Decoy Receptor by NFAT/FOXP3 Blocks IL-1 β -Dependent Response of Th17 Cells // *Elife*. — 2021. — V. 10. — P. e61841.
88. Leng F., Zhang W., Ramirez R.N., Rudensky A.Y., Benoist C., Leon J., Zhong Y., Hou L., Yuki K., et al. The Transcription Factor FoxP3 Can Fold into Two Dimerization States with Divergent Implications for Regulatory T- Cell Function and Immune Homeostasis // *Immunity*. — 2022. — V. 55. — P. 1354 — 1369.
89. Dai S., Qu L., Li J., Chen Y. Toward a Mechanistic Understanding of DNA Binding by Forkhead Transcription Factors and Its Perturbation by Pathogenic Mutations // *Nucleic Acids Res.* — 2021. — V. 49. — P. 10235 — 10249.
90. Sulakhe D., D'Souza M., Wang S., Balasubramanian S., Athri P., Xie B., Canzar S., Agam G., Gilliam T.C., Maltsev N. Exploring the Functional Impact of Alternative Splicing on Human Protein Isoforms Using Available Annotation Sources // *Brief Bioinform.* — 2019. — V. 20. — P. 1754 — 1768.
91. Zeng C., Hamada M. RNA-Seq Analysis Reveals Localization-Associated Alternative Splicing across 13 Cell Lines // *Genes*. — 2020. — V. 11. — P. 820.
92. Sun L., Mailliot J., Schaffitzel C. Nonsense-Mediated mRNA Decay Factor Functions in Human Health and Disease // *Biomedicines*. — 2023. — V. 11. — P. 722.
93. Liu Q., Fang L., Wu C. Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases // *Genes*. — 2022. — V. 13. — P. 401.
94. Black D.L. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing // *Annu Rev Biochem.* — 2003. — V. 72. — P. 291 — 336.
95. Jiang W., Chen L. Alternative Splicing: Human Disease and Quantitative Analysis from High-Throughput Sequencing // *Comput Struct Biotechnol J.* — 2021. — V. 19. — P. 183 — 195.
96. Black C.S., Whelan T.A., Garside E.L., Macmillan A.M., Fast N.M., Rader S.D. Spliceosome Assembly and Regulation: Insights from Analysis of Highly Reduced Spliceosomes // *RNA*. — 2023. — V. 29. — P. 531.
97. Plyasova A.A., Zhdanov D.D. Alternative Splicing of Human Telomerase Reverse Transcriptase (HTRT) and Its Implications in Physiological and Pathological Processes // *Biomedicines*. — 2021. — V. 9. — P. 526.
98. Crooke S.T., Liang X.H., Baker B.F., Crooke R.M. Antisense Technology: A Review // *J Biol Chem.* — 2021. — V. 296. — P. 100416.
99. Takeda S., Clemens P.R., Hoffman E.P. Exon-Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy // *J Neuromuscul Dis.* — 2021. — V. 8. — P. 343.

100. Quemener A.M., Bachelot L., Forestier A., Donnou-Fournet E., Gilot D., Galibert M.D. The Powerful World of Antisense Oligonucleotides: From Bench to Bedside // Wiley Interdiscip Rev RNA. — 2020. — P. 1594.
101. Shen X., Corey D.R. Chemistry, Mechanism and Clinical Status of Antisense Oligonucleotides and Duplex RNAs // Nucleic Acids Res. — 2018. — V. 46. — P. 1584 — 1600.
102. Roberts T.C., Langer R., Wood M.J.A. Advances in Oligonucleotide Drug Delivery // Nature Reviews Drug Discovery. — 2020. — V. 19. — P. 673 — 694.
103. Aung-Htut M.T., McIntosh C.S., West K.A., Fletcher S., Wilton S.D. In Vitro Validation of Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers // Molecules. — 2019. — V. 24. — P. 2922.
104. Takeshima Y. Expansion of Splice-Switching Therapy with Antisense Oligonucleotides // International Journal of Molecular Sciences. — 2025. — V. 26. — P. 2270.
105. Kim J., Hu C., Moufawad El Achkar C., Black L.E., Douville J., Larson A., Pendergast M.K., Goldkind S.F., Lee E.A., Kuniholm A., et al. Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease // New England Journal of Medicine. — 2019. — V. 381. — P. 1644–1652.
106. Joly A.L., Liu S., Dahlberg C.I.M., Mailer R.K.W., Westerberg L.S., Andersson J. Foxp3 Lacking Exons 2 and 7 Is Unable to Confer Suppressible Ability to Regulatory T Cells in Vivo // J Autoimmun. — 2015. — V. 63. — P. 23 — 30.
107. Mailer R.K.W., Falk K., Röttschke O. Absence of Leucine Zipper in the Natural FOXP3 Δ 2 Δ 7 Isoform Does Not Affect Dimerization but Abrogates Suppressible Capacity // PLoS One. — 2009. — V. 4. — P. e6104.
108. Shi J.Y., Ma L.J., Zhang J.W., Duan M., Ding Z. Bin, Yang L.X., Cao Y., Zhou J., Fan J., Zhang X., et al. FOXP3 Is a HCC Suppressor Gene and Acts through Regulating the TGF- β /Smad2/3 Signaling Pathway // BMC Cancer. — 2017. — V. 17. — P. 1 — 10.
109. Ebert L.M., Bee S.T., Browning J., Svobodova S., Russell S.E., Kirkpatrick N., Gedye C., Moss D., Ng S.P., MacGregor D., et al. The Regulatory T Cell–Associated Transcription Factor FoxP3 Is Expressed by Tumor Cells // Cancer Res. — 2008. — V. 68. — P. 3001 — 3009.
110. Zuo T., Wang L., Morrison C., Chang X., Zhang H., Li W., Liu Y., Wang Y., Liu X., Chan M.W.Y., et al. FOXP3 Is an X-Linked Breast Cancer Suppressor Gene and an Important Repressor of the HER-2/ErbB2 Oncogene // Cell. — 2007. — V. 129. — P. 1275–1286.
111. Wang J., Gong R., Zhao C., Lei K., Sun X., Ren H. Human FOXP3 and Tumour Microenvironment // Immunology. — 2023. — V. 168. — P. 248 — 255.
112. Jeong S. SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA // Mol Cells. — 2017. — Vol. 40. — P. 1.

113. Weinstein K.N., Domeier P.P., Ziegler S.F. A Splice of Life: The Discovery, Function, and Clinical Implications of FOXP3 Isoforms in Autoimmune Disease // *Int Immunol.* — 2024. — V. 37. — P. 83 — 90.
114. Kröger B., Spohn M., Mengel M., Sperhake J.P., Ondruschka B., Mailer R.K. Expression of Full-Length FOXP3 Exceeds Other Isoforms in Thymus and Stimulated CD4 + T Cells // *J Clin Immunol.* — 2024. — V. 44. — P. 1 — 4.
115. De Rosa V., Galgani M., Porcellini A., Colamatteo A., Santopaolo M., Zuchegna C., Romano A., De Simone S., Procaccini C., La Rocca C., et al. Glycolysis Controls the Induction of Human Regulatory T Cells by Modulating the Expression of FOXP3 Exon 2 Splicing Variants // *Nature Immunology.* — 2015. — V. 16. — P. 1174 — 1184.
116. Mailer R.K.W., Joly A.L., Liu S., Elias S., Tegner J., Andersson J. IL-1 β Promotes Th17 Differentiation by Inducing Alternative Splicing of FOXP3 // *Scientific Reports.* — 2015. — V. 5. — P. 1 — 9.
117. Hirano M., Galarza-Muñoz G., Nagasawa C., Schott G., Wang L., Antonia A.L., Jain V., Yu X., Widen S.G., Briggs F.B.S., et al. The RNA Helicase DDX39B Activates FOXP3 RNA Splicing to Control T Regulatory Cell Fate // *Elife.* — 2023. — V. 12. — P. 76927.
118. Kaur G., Goodall J.C., Jarvis L.B., Hill Gaston J.S. Characterisation of Foxp3 Splice Variants in Human CD4⁺ and CD8⁺ T Cells—Identification of Foxp3 Δ 7 in Human Regulatory T Cells // *Mol Immunol.* — 2010. — V. 48. — P. 321 — 332.
119. Du J., Wang Q., Ziegler S.F., Zhou B. FOXP3 Interacts with HnRNPF to Modulate Pre-mRNA Alternative Splicing // *Journal of Biological Chemistry.* — 2018. — V. 293. — P. 10235 — 10244.
120. Magg T., Mannert J., Ellwart J.W., Schmid I., Albert M.H. Subcellular Localization of FOXP3 in Human Regulatory and Nonregulatory T Cells // *Eur J Immunol.* — 2012. — V. 42. — P. 1627 — 1638.
121. Lasick K.A., Jose E., Samayoa A.M., Shanks L., Pond K.W., Thorne C.A., Paek A.L. FOXO Nuclear Shuttling Dynamics Are Stimulus-Dependent and Correspond with Cell Fate // *Mol Biol Cell.* — 2023. — V. 34. — P. ar21.
122. Joly A.L., Seitz C., Liu S., Kuznetsov N. V., Gertow K., Westerberg L.S., Paulsson-Berne G., Hansson G.K., Andersson J. Alternative Splicing of FoxP3 Controls Regulatory T Cell Effector Functions and Is Associated with Human Atherosclerotic Plaque Stability // *Circ Res.* — 2018. — V. 122. — P. 1385 — 1394.
123. Sato Y., Liu J., Lee E., Perriman R., Roncarolo M.G., Bacchetta R. Co-Expression of FOXP3^{FL} and FOXP3 Δ 2 Isoforms Is Required for Optimal Treg-Like Cell Phenotypes and Suppressive Function // *Front Immunol.* — 2021. — V. 12. — P. 752394.

124. Jamee M., Zaki-Dizaji M., Lo B., Abolhassani H., Aghamahdi F., Mosavian M., Nademi Z., Mohammadi H., Jadidi-Niaragh F., Rojas M., et al. Clinical, Immunological, and Genetic Features in Patients with Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked (IPEX) and IPEX-like Syndrome // *J Allergy Clin Immunol Pract.* — 2020. — V. 8. — P. 2747 — 2760.
125. Gu Q., Zhao X., Guo J., Jin Q., Wang T., Xu W., Li L., Zhang J., Zhang W., Hong S., et al. The Splicing Isoform Foxp3 Δ 2 Differentially Regulates TTreg and PTreg Homeostasis // *Cell Rep.* — 2023. — V. 42. — P. 112877.
126. Song Y., Li J., Wu Y. Evolving Understanding of Autoimmune Mechanisms and New Therapeutic Strategies of Autoimmune Disorders // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* — 2024. — V. 9. — P. 1 — 40.
127. Yasmeen F., Pirzada R.H., Ahmad B., Choi B., Choi S. Understanding Autoimmunity: Mechanisms, Predisposing Factors, and Cytokine Therapies // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2024. — V. 25. — P. 7666.
128. Sun L., Su Y., Jiao A., Wang X., Zhang B. T Cells in Health and Disease // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* — 2023. — V. 8. — P. 1 — 50.
129. Lee G.R. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity // *Int J Mol Sci.* — 2018. — V. 19. — P. 730.
130. Li Y.F., Zhang S.X., Ma X.W., Xue Y.L., Gao C., Li X.Y., Xu A.D. The Proportion of Peripheral Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis // *Mult Scler Relat Disord.* — 2019. — V. 28. — P. 75 — 80.
131. Lifshitz G. V., Zhdanov D.D., Lokhonina A. V., Eliseeva D.D., Lyssuck E.Y., Zavalishin I.A., Bykovskaia S.N. Ex Vivo Expanded Regulatory T Cells CD4+CD25+FoxP3+CD127Low Develop Strong Immunosuppressive Activity in Patients with Remitting-Relapsing Multiple Sclerosis // *Autoimmunity.* — 2016. — V. 49. — P. 388 — 396.
132. Meng Q., Ma J., Cui J., Gu Y., Shan Y. Subpopulation Dynamics of T and B Lymphocytes in Sjögren's Syndrome: Implications for Disease Activity and Treatment // *Front Immunol.* — 2024. — V. 15. — P. 1468469.
133. Yan S., Kotschenreuther K., Deng S., Kofler D.M. Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis: Functions, Development, Regulation, and Therapeutic Potential // *Cellular and Molecular Life Sciences.* — 2022. — V. 79. — P. 533.
134. Li H.T., Zhang S.X., Zhang J.Q., Cheng T., Liu Y., Liu H.Q., Hao M., Chen J.W. A Decreased Number of Circulating Regulatory T Cells Is Associated with Adverse Pregnancy Outcomes in Patients with Systemic Lupus Erythematosus // *Immun Inflamm Dis.* — 2022. — V. 10. — P. e731.
135. Zhang R., Miao J., Zhu P. Regulatory T Cell Heterogeneity and Therapy in Autoimmune Diseases // *Autoimmun Rev.* — 2021. — V. 20. — P. 102715.

136. Truffault F., Nazzal D., Verdier J., Gradolatto A., Fadel E., Roussin R., Eymard B., Le Panse R., Berrih-Aknin S. Comparative Analysis of Thymic and Blood Treg in Myasthenia Gravis: Thymic Epithelial Cells Contribute to Thymic Immunoregulatory Defects // *Front Immunol.* — 2020. — V. 11. — P. 527555.
137. Олисов О.Ю., Гудова В.В., Быковская С.Н. Роль Регуляторных Т-Клеток в Развитии Аутоиммунной Воспалительной Реакции При Псориазе. *Медицинский алфавит.* — 2019. — V. 1. — P. 10 — 14.
138. Negrini S., Emmi G., Greco M., Borro M., Sardanelli F., Murdaca G., Indiveri F., Puppo F. Sjögren's Syndrome: A Systemic Autoimmune Disease // *Clin Exp Med.* — 2022. — V. 22. — P. 9 — 25.
139. Baldini C., Fulvio G., La Rocca G., Ferro F. Update on the Pathophysiology and Treatment of Primary Sjögren Syndrome // *Nature Reviews Rheumatology.* — 2024. — V. 20. — P. 473 — 491.
140. Christodoulou M.I., Kapsogeorgou E.K., Moutsopoulos N.M., Moutsopoulos H.M. Foxp3⁺ T-Regulatory Cells in Sjögren's Syndrome: Correlation with the Grade of the Autoimmune Lesion and Certain Adverse Prognostic Factors // *American Journal of Pathology.* — 2008. — V. 173. — P. 1389 — 1396.
141. Noort J.M., Baker D., Kipp M., Amor S. The Pathogenesis of Multiple Sclerosis: A Series of Unfortunate Events // *Clin Exp Immunol.* — 2023. — V. 214. — P. 1—17.
142. Serena G., Yan S., Camhi S.; Patel S., Lima R.S., Sapone A., Leonard M.M., Mukherjee R., Nath B.J., Lammers K.M., et al. Proinflammatory Cytokine Interferon- γ and Microbiome-Derived Metabolites Dictate Epigenetic Switch between Forkhead Box Protein 3 Isoforms in Coeliac Disease // *Clin Exp Immunol.* — 2017. — V. 187. — P. 490 — 506.
143. Suzuki K., Setoyama Y., Yoshimoto K., Tsuzaka K., Abe T., Takeuchi T. Decreased mRNA Expression of Two FOXP3 Isoforms in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus // *Int J Immunopathol Pharmacol.* — 2011. — V. 24. — P. 7 — 14.
144. Lord J.D., Valliant-Saunders K., Hahn H., Thirlby R.C., Ziegler S.F. Paradoxically Increased FOXP3⁺ T Cells in IBD Do Not Preferentially Express the Isoform of FOXP3 Lacking Exon 2 // *Dig Dis Sci.* — 2012. — V. 57. — P. 2846 — 2855.
145. Fisher M.S., Sennikov S. V. T-Regulatory Cells for the Treatment of Autoimmune Diseases // *Front Immunol.* — 2025. — V. 16. — P. 1511671.
146. Ye C., Brand D., Zheng S.G. Targeting IL-2: An Unexpected Effect in Treating Immunological Diseases // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* — 2018. — V. 3. — P. 1 — 10.

147. Passerini L., Barzaghi F., Curto R., Sartirana C., Barera G., Tucci F., Albarello L., Mariani A., Testoni P.A., Bazzigaluppi E., et al. Treatment with Rapamycin Can Restore Regulatory T-Cell Function in IPEX Patients // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. — 2020. — V. 145. — P. 1262 — 1271.
148. Schlöder J., Shahneh F., Schneider F.J., Wieschendorf B. Boosting Regulatory T Cell Function for the Treatment of Autoimmune Diseases – That’s Only Half the Battle! // *Front Immunol*. — 2022. — V. 13. — P. 973813.
149. Goswami T.K., Singh M., Dhawan M., Mitra S., Emran T. Bin, Rabaan A.A., Mutair A. Al, Alawi Z. Al, Alhumaid S., Dhama K. Regulatory T Cells (Tregs) and Their Therapeutic Potential against Autoimmune Disorders – Advances and Challenges // *Hum Vaccin Immunother*. — 2022. — V. 18. — P. 2035117.
150. Bender C., Wiedeman A.E., Hu A., Ylescupidez A., Sietsema W.K., Herold K.C., Griffin K.J., Gitelman S.E., Long S.A. A Phase 2 Randomized Trial with Autologous Polyclonal Expanded Regulatory T Cells in Children with New-Onset Type 1 Diabetes // *Sci Transl Med*. — 2024. — V. 16. — P. eadn2404.
151. Dall’Era M., Pauli M.L., Remedios K., Taravati K., Sandoval P.M., Putnam A.L., Lares A., Haemel A., Tang Q., Hellerstein M., et al. Adoptive Treg Cell Therapy in a Patient With Systemic Lupus Erythematosus // *Arthritis Rheumatol*. — 2019. — V. 71. — P. 431 — 440.
152. Sherley J.L., Stadler P.B., Stadler J.S. A Quantitative Method for the Analysis of Mammalian Cell Proliferation in Culture in Terms of Dividing and Non-Dividing Cells // *Cell Prolif*. — 1995. — V. 28. — P. 137 — 144.
153. Quah B.J.C., Parish C.R. The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation // *J Vis Exp*. — 2010. — P. e2259.
154. Crowley L.C., Scott A.P., Marfell B.J., Boughaba J.A., Chojnowski G., Waterhouse N.J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry // *Cold Spring Harb Protoc*. — 2016. — V. 7.
155. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L.C., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer // *Science*. — 1994. — V. 266. — P. 2011 — 2015.
156. Sumida T.S., Cheru N.T., Hafler D.A. The Regulation and Differentiation of Regulatory T Cells and Their Dysfunction in Autoimmune Diseases // *Nature Reviews Immunology*. — 2024. — V. 24. — P. 503 — 517.
157. Huan J., Culbertson N., Spencer L., Bartholomew R., Burrows G.G., Chou Y.K., Bourdette D., Ziegler S.F., Offner H., Vandenbark A.A. Decreased FOXP3 Levels in Multiple Sclerosis Patients // *J Neurosci Res*. — 2005. — V. 81. — P. 45 — 52.

158. Thonhoff J.R., Simpson E.P., Appel S.H. Neuroinflammatory Mechanisms in Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis // *Curr Opin Neurol.* — 2018. — V. 31. — P. 635 — 639.
159. Cano-Ortiz A., Laborda-Illanes A., Plaza-Andrades I., Del Pozo A.M., Cuadrado A.V., de Mora M.R.C., Leiva-Gea I., Sanchez-Alcoholado L., Queipo-Ortuño M.I. Connection between the Gut Microbiome, Systemic Inflammation, Gut Permeability and FOXP3 Expression in Patients with Primary Sjögren's Syndrome // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2020. — V. 21. — P. 8733.
160. Ming B., Zhu Y., Zhong J., Dong L. Regulatory T Cells: A New Therapeutic Link for Sjögren Syndrome? // *Rheumatology.* — 2023. — V. 62. — P. 2963 — 2970.
161. Miao M., Hao Z., Guo Y., Zhang X., Zhang S., Luo J., Zhao X., Zhang C., Liu X., Wu X., et al. Short-Term and Low-Dose IL-2 Therapy Restores the Th17/Treg Balance in the Peripheral Blood of Patients with Primary Sjögren's Syndrome // *Ann Rheum Dis.* — 2018. — V. 77. — P. 1838 — 1840.
162. Shi L., Wang J., Guo H.X., Han X.L., Tang Y.P., Liu G.Y. Circulating Th2 Cell Reduction and Th1/Th2 Imbalance Are Correlated with Primary Sjogren's Syndrome-Associated Interstitial Lung Disease // *Arthritis Res Ther.* — 2022. — V. 24. — P. 1 — 9.
163. Ríos-ríos W. de J., Sosa-luis S.A., Torres-aguilar H. T Cells Subsets in the Immunopathology and Treatment of Sjogren's Syndrome // *Biomolecules.* — 2020. — V. 10. — 1539.
164. Lin T.T., Zhang T., Kitata R.B., Liu T., Smith R.D., Qian W.J., Shi T. Mass Spectrometry-Based Targeted Proteomics for Analysis of Protein Mutations // *Mass Spectrom Rev.* — 2021. — V. 42. — P. 796.
165. Liu Y., Beyer A., Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance // *Cell.* — 2016. — V. 165. — P. 535 — 550.
166. Beers D.R., Zhao W., Wang J., Zhang X., Wen S., Neal D., Thonhoff J.R., Alsuliman A.S., Shpall E.J., Rezvani K., et al. ALS Patients' Regulatory T Lymphocytes Are Dysfunctional, and Correlate with Disease Progression Rate and Severity // *JCI Insight.* — 2017. — V. 2. — P. e89530.
167. Chougnet C., Hildeman D. Helios—Controller of Treg Stability and Function // *Transl Cancer Res.* — 2016. — V. 5. — P. 338 — 341.
168. Saleh R., Elkord E. FoxP3+ T Regulatory Cells in Cancer: Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets // *Cancer Lett.* — 2020. — V. 490. — P. 174 — 185.
169. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D. V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M. V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. Endonuclease G Modulates the Alternative Splicing of Deoxyribonuclease 1 mRNA in Human CD4+ T Lymphocytes and Prevents the Progression of Apoptosis // *Biochimie.* — 2019. — V. 157. — P. 158 — 176.

170. Zhdanov D.D., Plyasova A.A., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D. V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M. V., Alexandrova S.S., Lobaeva T.A., et al. Inhibition of Telomerase Activity by Splice-Switching Oligonucleotides Targeting the MRNA of the Telomerase Catalytic Subunit Affects Proliferation of Human CD4⁺ T Lymphocytes // *Biochem Biophys Res Commun.* — 2019. — V. 509. — P. 790 — 796.

171. Gerasimavicius L., Livesey B.J., Marsh J.A. Loss-of-Function, Gain-of-Function and Dominant-Negative Mutations Have Profoundly Different Effects on Protein Structure // *Nat Commun.* — 2022. — V. 13. — P. 1 — 15.

172. Savinov A., Roth F.P. Seeds of Their Own Destruction: Dominant-Negative Peptide Screening Yields Functional Insight and Therapeutic Leads // *Cell Syst.* — 2021. — V. 12. — P. 691 — 693.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю, д.б.н., доценту Жданову Дмитрию Дмитриевичу за неоценимый вклад и помощь на всех этапах создания и выполнения данной работы. Также благодарю весь коллектив лаборатории медицинской биотехнологии ИБМХ им. В.Н. Ореховича за помощь при проведении экспериментов.

Глубокую признательность за набор пациентов с РС и БАС выражаю врачам-неврологам: к.м.н. Елисеевой Дарье Дмитриевне и Абрамовой Анне Александровне (Научный центр неврологии). Благодарность за набор пациентов с БШ и консультирование выражаю врачам-ревматологам: д.м.н., профессору Васильеву Владимиру Ивановичу, к.м.н. Шорниковой Наталье Сергеевне и к.м.н. Пальшиной Светлане Геннадьевне (Центр лечения суставов и сердца), а также к.м.н. Родионовой Екатерине Борисовне (АНО «Шегрену-нет»).

Благодарю свою бабушку, к.б.н. Трубоченинову Лидию Петровну за жизненный пример и предание веры в себя, а также родителей за поддержку на всех этапах работы над диссертацией.

Приложение

Таблица 1. Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови ЗД.

ЗД	Сплайс-вариант FoxP3FL, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов
1	75,0	23,1	1,1	0,9
2	67,0	25,4	6,2	1,3
3	63,4	32,5	3,2	0,9
4	53,7	42,4	3,0	0,8
5	51,5	44,5	1,8	2,2
6	51,4	46,5	1,1	1,1
7	47,4	37,9	12,6	2,2
8	47,4	48,3	2,7	1,6
9	46,0	50,6	1,1	2,3
10	45,5	47,6	3,9	2,9
11	42,9	54,2	1,2	1,8
12	42,4	50,0	5,3	2,3
13	42,4	47,5	4,4	5,8
14	42,3	54,3	0,9	2,6
15	41,5	44,5	11,8	2,1
16	40,6	40,3	13,4	5,7
17	39,9	54,0	1,9	4,1
18	38,4	44,5	10,0	7,1
19	36,8	47,0	10,3	5,9
20	35,4	48,6	13,4	2,6

Таблица 2. Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови пациентов с РС.

Пациент с РС	Сплайс-вариант FoxP3FL, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов
1	39,1	21,1	33,5	6,4
2	38,9	21,8	26,5	12,8
3	35,0	26,2	30,0	8,9
4	34,7	32,9	29,7	2,7
5	33,7	25,3	37,3	3,6
6	32,8	16,3	40,6	10,3
7	32,5	33,5	26,7	7,3
8	30,7	36,0	24,3	9,0
9	28,7	33,2	30,0	8,1
10	28,0	36,0	22,1	13,9
11	25,9	43,1	17,9	13,1
12	25,7	24,3	44,6	5,4
13	23,0	49,4	18,0	9,6
14	20,9	19,0	32,1	28,0
15	20,5	63,9	12,7	3,0
16	18,2	28,1	42,3	11,3
17	16,8	27,7	37,4	18,1
18	13,3	17,6	60,0	9,1
19	11,0	42,1	35,9	11,0
20	6,9	16,7	66,7	9,7

Таблица 3. Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови пациентов с БАС.

Пациент с БАС	Сплайс-вариант FoxP3FL, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов
1	62,7	17,0	6,4	13,9
2	48,3	32,6	9,3	9,9
3	40,1	29,2	24,7	6,0
4	39,8	37,3	11,8	11,1
5	39,7	33,6	18,0	8,7
6	38,4	29,7	28,6	3,4
7	37,9	18,2	21,5	22,4
8	37,1	35,3	16,2	11,4
9	37,0	36,7	16,7	9,7
10	34,0	26,0	9,2	30,8
11	33,2	31,8	26,4	8,7
12	31,3	33,2	28,5	7,0
13	30,5	21,9	20,3	27,3
14	25,8	6,8	9,2	58,2
15	23,1	8,2	49,5	19,2
16	23,0	30,6	38,8	7,7
17	19,1	37,5	12,4	31,1
18	18,4	8,5	57,0	16,1
19	14,5	40,1	41,1	4,3
20	7,6	35,0	43,9	13,5

Таблица 4. Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови пациентов с БШ.

Пациент с БШ	Сплайс-вариант FoxP3FL, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов	Сплайс-вариант FoxP3Δ2Δ7, % от общего числа сплайс-вариантов
1	40,8	24,1	31,5	3,6
2	39,8	12,6	36,5	11,1
3	39,7	11,9	39,7	8,7
4	37,1	12,9	38,6	11,4
5	37,0	14,9	38,4	9,7
6	30,8	14,8	36,3	18,2
7	30,6	30,4	29,6	9,5
8	29,4	27,6	34,6	8,4
9	27,8	28,7	32,7	10,7
10	25,0	18,0	34,6	22,4
11	23,4	8,1	35,6	32,9
12	23,1	35,4	22,3	19,2
13	23,0	30,6	38,8	7,7
14	22,4	7,5	63,5	6,6
15	16,2	10,0	65,6	8,2
16	14,8	6,4	54,7	24,1
17	8,9	17,7	52,4	21,0
18	7,9	17,3	56,9	17,9
19	7,6	35,0	43,9	13,5
20	4,9	13,3	69,2	12,7

Таблица 5. Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 в Трег периферической крови ЗД, пациентов с РС, БАС и БШ.

Номер испытуемого	Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 у ЗД	Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 у пациентов с РС	Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 у пациентов с БАС	Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 у пациентов с БШ
1	0,626	0,291	0,219	0,435
2	0,473	0,295	0,327	0,443
3	0,751	0,286	0,385	0,455
4	0,638	0,258	0,42	0,386
5	0,475	0,205	0,333	0,488
6	0,722	0,38	0,35	0,528
7	0,601	0,24	0,278	0,370
8	0,654	0,278	0,386	0,395
9	0,411	0,274	0,32	0,386
10	0,451	0,386	0,261	0,244
11	0,49	0,377	0,286	0,332
12	0,42	0,308	0,306	0,399
13	0,697	0,204	0,177	0,211
14	0,388	0,35	0,406	0,503
15	0,45	0,201	0,299	0,3919
16	0,801	0,305	0,2	0,452
17	0,435	0,163	0,251	0,391
18	0,636	0,188	0,571	0,358
19	0,399	0,213	0,555	0,299
20	0,415	0,269	0,322	0,327

Таблица 6. Содержание Трег в периферической крови в группе ЗД и в группах пациентов с РС, БАС и БШ.

Номер испытуемого	Содержание Трег, % от CD4 ⁺ у ЗД	Содержание Трег, % от CD4 ⁺ у пациентов с РС	Содержание Трег, % от CD4 ⁺ у пациентов с БАС	Содержание Трег, % от CD4 ⁺ у пациентов с БШ
1	9,550	3,690	6,33	6,07
2	5,8	3,87	5,16	4,83
3	6,3	4,67	4,24	5,47
4	7,7	4,16	5,78	4,16
5	11,54	4,21	3,77	4,51
6	8,01	2,56	4,63	4,6
7	6,81	5,15	4,49	3,12
8	8,85	5,3	4,17	4,38
9	10,04	6,36	4,63	4,81
10	5,63	3,81	3,06	3,06
11	8,47	6,85	4,36	3,2
12	8,12	8,07	4,34	3,81
13	8,21	5,9	2,56	6,28
14	9,83	5,15	3,56	4,64
15	11,06	6,23	3,77	5,2
16	10,2	7,24	3,63	4,88
17	8,28	5,51	3,52	5,07
18	8	2,12	3,12	3,36
19	8,85	3,98	3,22	4,39
20	8,07	2,06	3,15	2,17

Таблица 7. СИФ Трег-ассоциированных маркёров.

Трег	Отрицательная	Низкая	Высокая
CD4			
Контроль	1,61	15,33	85,04
FL	1,34	15,32	203,86
$\Delta 2$	1,5	16,70	172,86
$\Delta 7$	1,41	13,45	191,08
$\Delta 2\Delta 7$	1,22	15,62	49,42
CD25			
Контроль	1,40	19,32	82,91
FL	1,04	12,78	195,21
$\Delta 2$	1,21	18,07	176,47
$\Delta 7$	1,11	15,70	112,95
$\Delta 2\Delta 7$	1,18	18,23	43,01
CD127			
Контроль	1,34	15,99	30,84
FL	1,22	10,52	39,68
$\Delta 2$	1,10	18,55	70,54
$\Delta 7$	1,28	16,28	35,46
$\Delta 2\Delta 7$	1,16	16,53	30,06
CD152			
Контроль	1,11	13,60	99,23
FL	1,30	18,46	134,40
$\Delta 2$	1,22	17,56	87,76
$\Delta 7$	1,21	16,79	103,93
$\Delta 2\Delta 7$	1,15	10,76	74,22
CD39			
Контроль	1,33	12,73	101,22
FL	1,20	15,07	140,99
$\Delta 2$	1,04	10,22	100,49

Δ7	1,25	13,53	77,27
Δ2Δ7	1,63	13,59	46,66
CD223			
Контроль	1,19	13,14	75,71
FL	1,22	11,73	212,60
Δ2	1,33	14,06	83,46
Δ7	1,26	19,79	69,51
Δ2Δ7	1,24	14,54	62,50
FoxP3			
Контроль	1,08	19,22	277,90
FL	1,17	16,94	317,26
Δ2	1,15	17,89	121,1
Δ7	1,04	15,16	139,41
Δ2Δ7	1,18	19,03	107,38
Helios			
Контроль	1,33	12,48	69,17
FL	1,20	19,90	116,72
Δ2	0,85	13,98	135,65
Δ7	0,92	10,12	97,73
Δ2Δ7	1,3	10,58	138,65

Представлено среднее значение из четырех независимых измерений. Диапазон ошибок составлял $\pm 5\%$ от представленных данных.

Таблица 8. Уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 в Трег после трансфекции #Инс2 и #Инс7 или #Кон1 и #Кон2.

Трансфекция	FL	$\Delta 2$	$\Delta 7$	$\Delta 2\Delta 7$
Пациент с БАС 1				
#Инс2 и #Инс7	0,379	0,001	0,011	0,006
#Кон1 и #Кон2	0,152	0,123	0,042	0,028
Пациент с БАС 2				
#Инс2 и #Инс7	0,328	0,006	0,003	0,008
#Кон1 и #Кон2	0,139	0,1153	0,068	0,030
Пациент с БАС 3				
#Инс2 и #Инс7	0,297	0,005	0,002	0,004
#Кон1 и #Кон2	0,122	0,106	0,119	0,034
Пациент с БАС 4				
#Инс2 и #Инс7	0,275	0,004	0,006	0,002
#Кон1 и #Кон2	0,033	0,114	0,115	0,035

Таблица 9. СИФ Трег-ассоциированных маркёров.

Маркёр	Контрольные Трег	Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL
CD4	115.1 ± 4.2	167.4 ± 15.7
CD25	167.9 ± 6.1	180.3 ± 2.8
CD127	40.7 ± 8.9	48.8 ± 3.3
Helios	34.5 ± 9.3	111.4 ± 19.9
CD39	141.2 ± 13.3	153.6 ± 14.2
CD223	130.4 ± 28	143.1 ± 21.8
CD152	57.7 ± 9.4	141.7 ± 13.4

Рисунок 1.

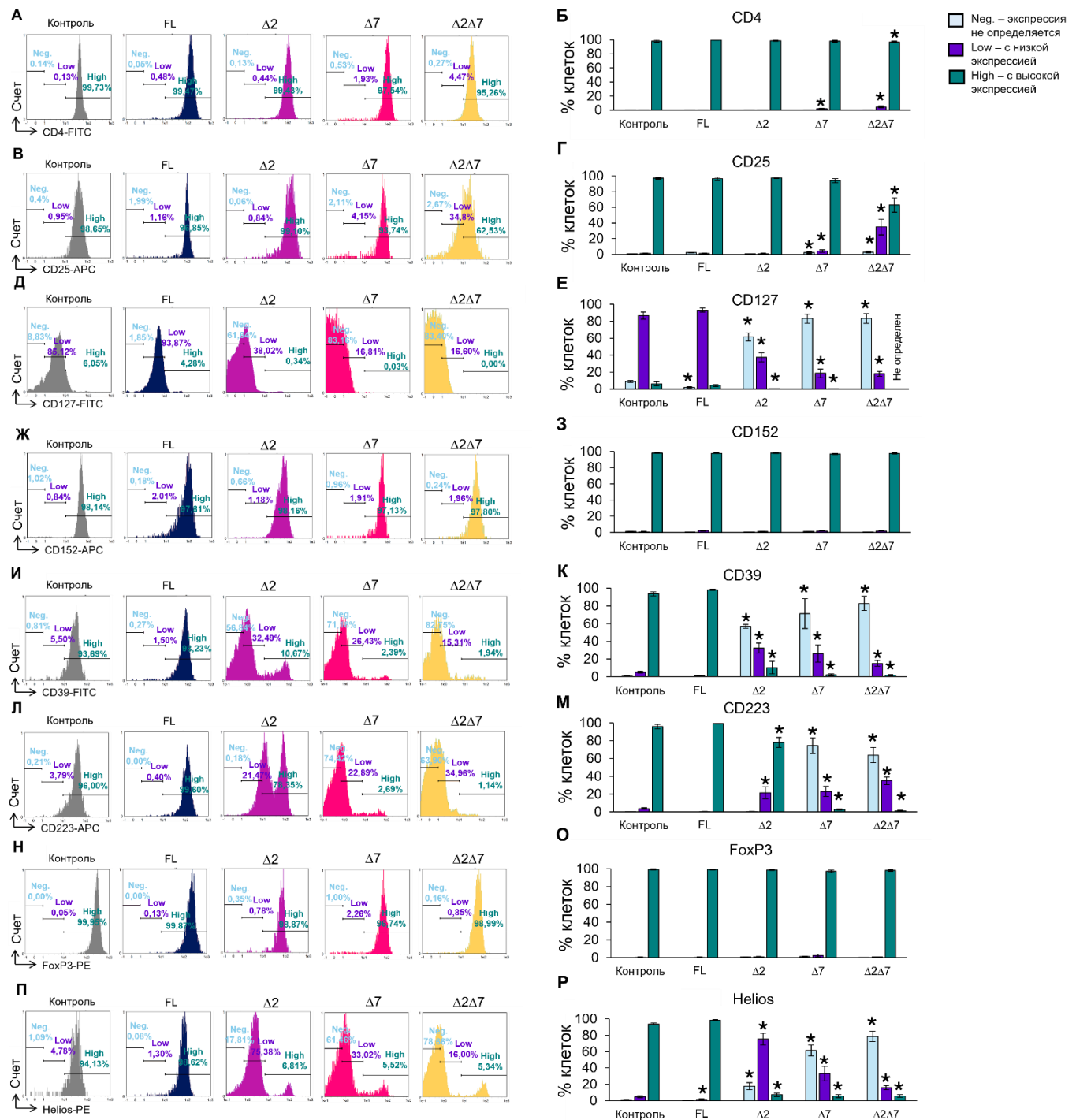


Рисунок 1. Диаграммы проточной цитометрии, демонстрирующие долю клеток с отрицательным, низким и высоким уровнем экспрессии клеточных маркёров (А) CD4, (В) CD25, (Д) CD127, (Ж) CD152, (И) CD39, (Л) CD223, (Н) FoxP3, (П) Helios. (Б), (Г), (Е), (З), (К), (М), (О) и (Р) результаты проточной цитометрии, отображающие долю клеток отрицательным, низким и высоким уровнем экспрессии клеточных маркёров. * – $p \leq 0,05$ по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.