

*На правах рукописи*

Блинова Варвара Глебовна

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в лаборатории медицинской биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент  
**Жданов Дмитрий Дмитриевич**

Официальные оппоненты:

**Киселевский Михаил Валентинович**  
доктор медицинских наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение «Национальный медицинский  
исследовательский центр онкологии имени  
Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации, заведующий  
лабораторией клеточного иммунитета

**Рубцов Юрий Петрович**  
доктор биологических наук  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Государственный научный  
центр Российской Федерации Институт  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук, главный научный  
сотрудник, руководитель лаборатории  
молекулярной вирусологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится «26» февраля 2026 года в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте [www.ibmc.msk.ru](http://www.ibmc.msk.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Учёный секретарь  
Диссертационного совета,  
Кандидат химических наук

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Регуляторные Т-клетки (Трег) являются субпопуляцией CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, ответственной за поддержание иммунного гомеостаза. Они контролируют иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены, индуцируя ауто толерантность 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 (Dikiy & Rudensky, 2023). 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 (Nocturne & Mariette, 2023; Tzeplaeff et al., 2023; Verreycken et al., 2022), 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 (Giovannelli et al., 2020; Verreycken et al., 2022), 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 (Hogi, 2021). 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 (Mailer, 2018). 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 (Allan et al., 2005). 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 (Du et al., 2022). Последующие работы выявили корреляцию нарушенной экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 и такими АИЗ, как васкулит, характеризующийся определением антинейтрофильных цитоплазматических антител (Free et al., 2013), тиреоидит Хашимото (Kristensen et al., 2015), гигантоклеточный артериит (Miyabe et al., 2017) и РС (Sambucci et al., 2018). В данный момент продолжается изучение механизмов АС FoxP3 и его последствий в контексте функционирования Трег.

Перекрывающие 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 (Chen et al., 2024; Dominski & Kole, 1993; Kim et al., 2023; Zhang, 2024). Успехом завершились результаты клинических испытаний лекарственных препаратов на основе ПСО для таких заболеваний как миодистрофия Дюшенна (Этеплирсен) (McDonald et al., 2021) и спинальная мышечная атрофия (Нусинерсен) (Mercuri et al., 2018). 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.

## **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.

## **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 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.

### **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).

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 12 работ в российских и международных научных изданиях. Среди них – 6 статей в рецензируемых научных журналах и 6 публикаций в трудах конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы, который включает 172 источника, и приложение. Работа изложена на 136 страницах и содержит 51 рисунок и 20 таблиц.

### **Финансирование**

Диссертационная работа выполнена при поддержке программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5) и гранта Российского научного фонда № 23-24-00326, <https://rscf.ru/project/23-24-00326>.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Соблюдение этических стандартов, здоровые доноры (ЗД) и пациенты.** 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.). Исследование соответствовало Хельсинскому заявлению 1964 года и его более поздним обновлениям. Все пациенты и ЗД дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Пациенты с РС, БАС и ЗД 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). В исследование включены три группы по 20 пациентов с диагнозами РС, БАС и БШ. Контрольную группу ЗД составили 20 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу.

**Выделение регуляторных Т-клеток и размножение *ex vivo*.** Образцы крови получены путем венепункции в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K<sub>2</sub>EDTA. Свежие мононуклеарные клетки периферической крови выделяли с использованием Lympholite-N центрифугированием в градиенте плотности. Трег выделяли с использованием набора CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T-Cell Isolation Kit II. Для размножения Трег *ex vivo* клетки высевали в концентрации 5 x 10<sup>4</sup> клеток/мл и культивировали в клеточной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мкг/мл антител анти-CD28, 5 мкг/мл моноклональных антител анти-CD3, 5 нг/мл TGF-beta и 100 ЕД/мл rHu IL-2. Каждые 3-4 дня производили смену среды и культивировали клетки в течение 15 дней.

**Экспрессия общей мРНК FoxP3 и сплайс-вариантов FoxP3.** Общую РНК выделяли из клеток с использованием набора RUpplus. 5 мкг РНК подвергали процедуре обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT Kit. Реакционную смесь для амплификации готовили с использованием qPCR mix-HS SYBR и соответствующими праймерами. Амплификацию и детекцию накопления амплификата проводили в реальном времени при помощи системы DTrime5. Данные полученного уровня мРНК нормализовали по отношению к средним уровням РНК генов 18S, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и бета-актина.

**Трансфекция клеток ПСО.** Олигонуклеотиды размером 24, 30, 36 или 42 оснований были синтезированы на заказ (Синтол, Россия). Нуклеотиды были модифицированы 2'-О-метоксиэтил сахарами, фосфоротиоатным остовом и 5'-метилцитозинном и конъюгированы с красителем. Трансфекцию клеток проводили с использованием Lipofectamine 2000.

**Определение пролиферативной активности Трег.** Определяли общее количество клеток в процессе пролиферации при помощи счётчика клеток. Для оценки доли пролиферирующих клеток Трег метили витальным красителем сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) и культивировали по описанной выше методике. Интенсивность пролиферации оценивали по снижению сигнала CFSE, который измеряли каждые 24 часа при помощи проточной цитометрии.

**Детекция белковых форм сплайс-вариантов FoxP3.** Детекцию проводили методом вестерн-блоттинга. Клетки лизировали в Трис-боратном буфере. Белки экстракта разделяли в полиакриламидном геле с градиентом плотности NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein. Белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны в буфере для переноса Novex. Мембраны инкубировали в блокирующем растворе Blotting-Grade Blocker, а затем с первичными антителами. Использовали антитела anti-mouse/rat/human FoxP3 (клон 150D), которые специфичны к экзону 2, и антитела anti-human FoxP3 (клон 259D), 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. Мембраны промывали, инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена и визуализировали с помощью набора хемилюминесцентных реагентов Super Signal.

**Анализ супрессорной активности.** Анализ проводили с помощью реакции смешанных лимфоцитов (смешанной культуры лимфоцитов). Респондерные клетки-мишени CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетки метили CFSE. Меченые клетки инкубировали 5 суток с обработанными митомицином С аллогенными моноклеарными клетками периферической крови (фидерными клетками) и Трег в соотношениях от 1:2 до 1:96. Долю пролиферирующих клеток определяли по количеству клеток со сниженным сигналом CFSE методом проточной цитометрии.

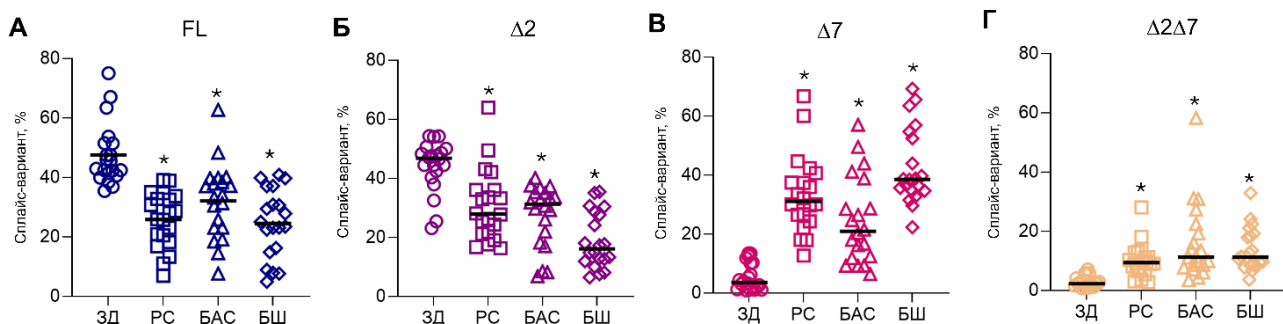
**Подавление активности теломеразы.** Способность Трег подавлять активность теломеразы в клетках-мишенях оценивали после совместного культивирования через полупроницаемую мембрану. Трансфицированные Трег культивировали с аутологичными CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клетками-мишенями в соотношении 1:1 в системе пористых мембранных вставок в 24-луночных планшетах. Активность теломеразы измеряли с помощью протокола амплификации теломерных повторов (TRAP). Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле и буфера TBE.

**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- $\lambda$ 2, ИЛ-29/ИФН- $\lambda$ 1 и ИЛ-35 в культуральной среде Трег проводили мультиплексным методом с использованием стандартной панели 12-Plex Bio-Plex Pro™ Human Treg Cytokine Panel на иммуноанализаторе Bio-Plex 200 System и последующей обработкой полученных результатов с помощью приложения Bio-Plex Manager 6.0 Properties.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

### 1. Уровни экспрессии сплайс-вариантов FoxP3 в Трег периферической крови здоровых доноров и пациентов с АИЗ

Уровни экспрессии мРНК сплайс-вариантов FoxP3FL, FoxP3 $\Delta$ 2, FoxP3 $\Delta$ 7 и FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 определены в Трег периферической крови ЗД, а также пациентов с РС, БАС и БШ (рис. 1).



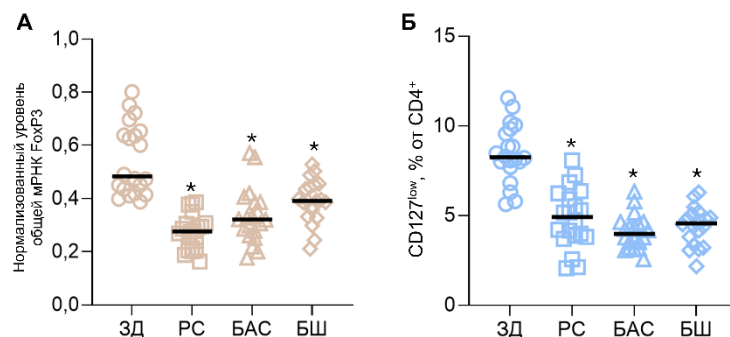
**Рисунок 1. Уровни мРНК сплайс-вариантов FoxP3 у ЗД и пациентов с РС, БАС и БШ.** (А) Полноразмерный вариант FoxP3FL. (Б) Сплайс-вариант  $\Delta$ 2. (В) Сплайс-вариант  $\Delta$ 7. (Г) Сплайс-вариант  $\Delta$ 2 $\Delta$ 7. Показана доля (в процентах) мРНК сплайс-варианта от общей мРНК FoxP3. ЗД, здоровые 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.

В Трег периферической крови ЗД преобладает экспрессия полноразмерного сплайс-варианта FoxP3FL (среднее значение  $47,6 \pm 10,4\%$ ; медиана  $44,2\%$ ) и сплайс-варианта FoxP3 $\Delta$ 2 (среднее значение  $44,2 \pm 8,7\%$ ; медиана  $46,7\%$ ). Экспрессия сплайс-вариантов FoxP3 $\Delta$ 7 (среднее значение  $5,5 \pm 4,6\%$ ; медиана  $3,6\%$ ) и FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 (среднее значение  $2,8 \pm 1,9\%$ ; медиана  $2,2\%$ ) менее выражена. В Трег периферической крови пациентов с РС преобладает FoxP3 $\Delta$ 2 (среднее значение  $30,7 \pm 12,1\%$ ; медиана  $27,9\%$ ) и FoxP3 $\Delta$ 7 (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 FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 повышен (среднее значение  $10,1 \pm 5,7\%$ ; медиана  $9,4\%$ ) по сравнению с Трег ЗД. В группе пациентов с БАС в Трег преобладает экспрессия FoxP3FL (среднее значение  $32,1 \pm 12,5\%$ ; медиана  $33,6\%$ ) и FoxP3 $\Delta$ 2 (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 FoxP3 $\Delta$ 7 (среднее значение  $24,5 \pm 14,7\%$ ; медиана  $20,9\%$ ) и FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 (среднее значение  $16,0 \pm 13,0\%$ ; медиана  $11,3\%$ ). В Трег пациентов с БШ преобладает экспрессия сплайс-варианта FoxP3 $\Delta$ 7 (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 FoxP3 $\Delta$ 2 ( $18,9 \pm 9,4\%$ ; медиана  $16,1\%$ ), повышена экспрессия FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 ( $13,9 \pm 7,3\%$ ; медиана  $11,3$ ).

## 2. Снижение уровня экспрессии общей мРНК FoxP3 в Трег периферической крови и понижение содержания данных клеток у пациентов с АИЗ

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. 2 А), а также с понижением содержания Трег в периферической крови (рис. 2 Б).

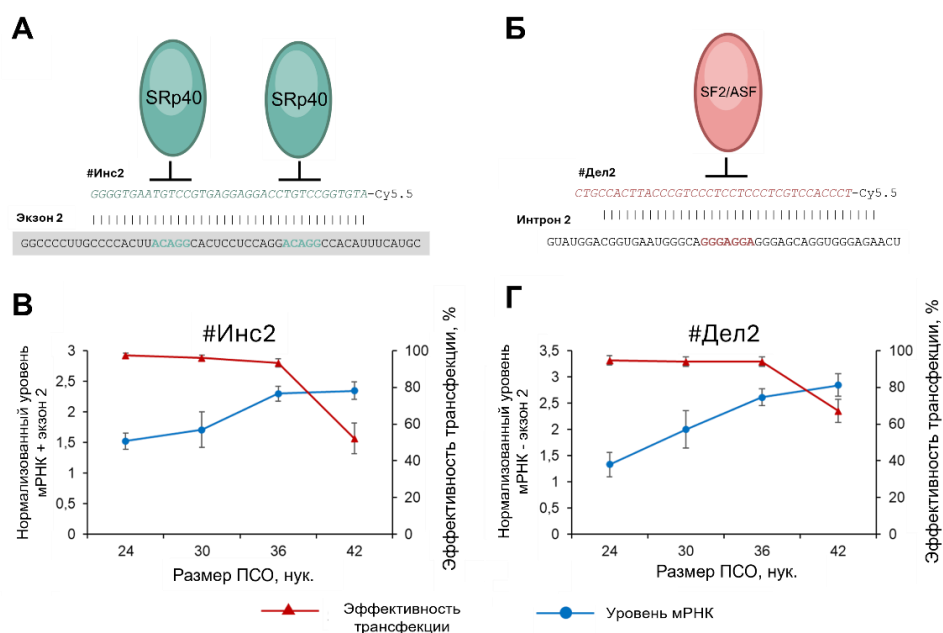


**Рисунок 2. Уровень экспрессии общей мРНК FoxP3 в Трег и содержание Трег в периферической крови.** (А) Снижение уровня общей мРНК FoxP3 в Трег пациентов с АИЗ. (Б) Понижение содержания Трег в периферической крови, выраженного в % от CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. ЗД, здоровые доноры. РС, рассеянный склероз. БАС, боковой амиотрофический склероз. БШ, болезнь Шегрена. Черные горизонтальные линии отображают медиану. \* –  $p < 0,05$  по отношению к Трег ЗД по критерию Манна-Уитни.

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<sup>+</sup> 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  $4,6\%$ .

### 3. Подбор ПСО

Наблюдали уменьшение эффективности трансфекции при увеличении размера ПСО #Инс2 (рис. 3 В). 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. 3 В) увеличивался с увеличением размера ПСО, и достигал максимальных значений у ПСО размером 36 и 42 нуклеотида. Это указывает на большую специфичность и большую способность индуцировать сплайсинг у ПСО большего размера.



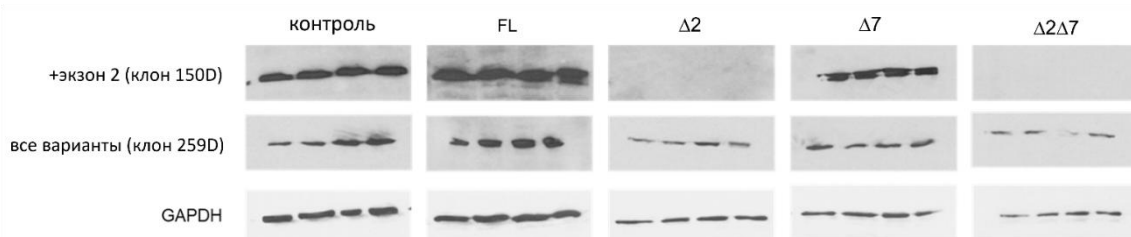
**Рисунок 3. Подбор размера ПСО.** Взаимодействие ПСО #Инс2 (А), ПСО #Дел2 (Б) с целевой последовательностью пре-мРНК FoxP3. Уровни мРНК и эффективность трансфекции определены через 24 часа после трансфекции клеток ПСО различной длины (В) ПСО #Инс2, (Г) ПСО #Дел2.

Наименьшая эффективность трансфекции ( $67,18 \pm 6,32\%$ ) была у клеток, трансфицированных ПСО #Дел2 размером 42 нуклеотида (рис. 3 Г). Уровень мРНК участка с делецией экзона 2 (обозначен как - экзон 2 на рис. 3 Г) был максимальный у Трег, трансфицированных #Дел2 размером 36 и 42 нуклеотида. Аналогично с трансфекцией #Инс2 наблюдали резкое падение эффективности трансфекции до  $36,25 \pm 5,63\%$  у ПСО #Инс7 размером 42 нуклеотида (рис. 4 В). Уровень мРНК участка со вставкой экзона 7 (обозначен как + экзон 7 на рис. 4 В) был максимальный у Трег, трансфицированных ПСО размером 36 и 42 нуклеотида. Наименьшая эффективность трансфекции ( $71,06 \pm 4,58\%$ ) была у клеток, трансфицированных ПСО #Дел7 размером 42 нуклеотида (рис. 4 Г). Уровень мРНК участка с делецией экзона 7 (обозначен как - экзон 7 на рис. 4 Г) был максимальный у Трег, трансфицированных #Дел7 размером 36 и 42 нуклеотида. Таким образом, наиболее



В Трег, трансфицированных ПСО, индуцирующим делецию экзона 2 (#Дел2) и ПСО (#Инс7), был селективно экспрессирован сплайс-вариант FoxP3 $\Delta$ 2 (рис. 5 В). Трансфекция Трег ПСО #Инс2 и ПСО #Дел7, способным индуцировать делецию экзона 7, позволила добиться селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3 $\Delta$ 7 (рис. 5 Г). Трансфекция клеток двумя ПСО, индуцирующими делецию обоих экзонов (#Дел2 и #Дел7), привела к селективной экспрессии сплайс-варианта FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 (рис. 5 Д).

Результаты оценки экспрессии мРНК сплайс-вариантов FoxP3 были подтверждены с помощью вестерн-блоттинга (рис. 6). 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 $\Delta$ 2 и FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7).

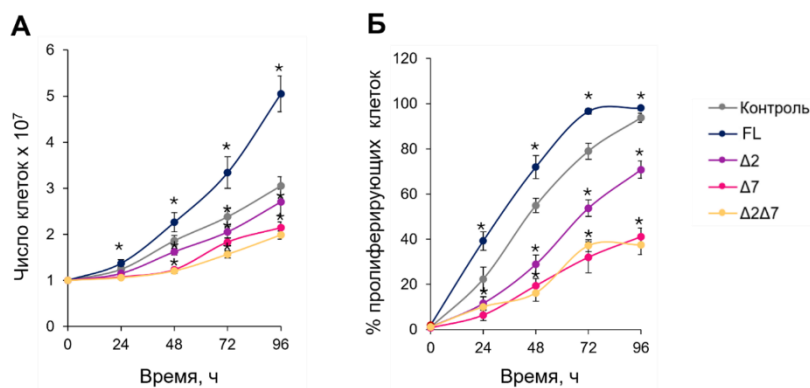


**Рисунок 6. Результаты вестерн-блоттинга белковых форм сплайс вариантов FoxP3 в Трег, трансфицированных ПСО.**

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.

## **5. Пролиферативная активность Трег с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3**

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. 7 А). Клетки, селективно экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3 $\Delta$ 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 $\Delta$ 7 составило  $(2,14 \pm 0,13) \times 10^7$  клеток, а количество Трег, селективно экспрессирующих FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 составило  $(1,98 \pm 0,09) \times 10^7$  клеток.

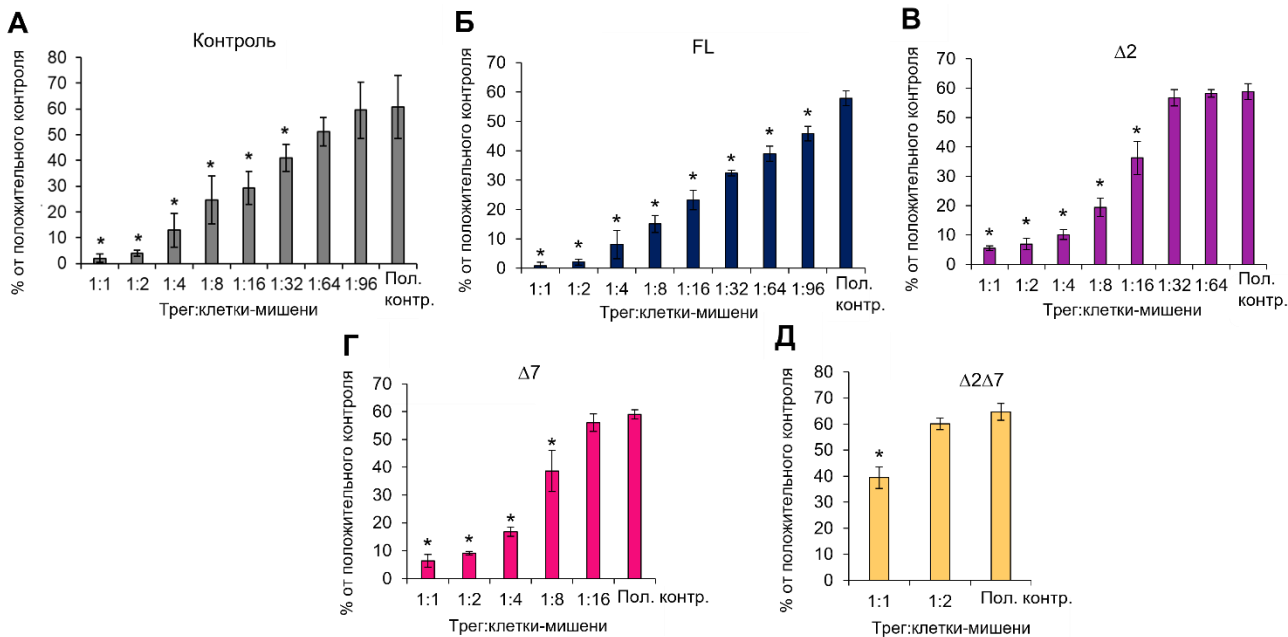


**Рисунок 7. Проллиферативная активность Трег, селективно экспрессирующих индивидуальный сплайс-вариант FoxP3.** (А) Проллиферативная активность (количество клеток) в течение четырёх дней культивирования после трансфекции, демонстрирующая повышенную пролиферативную активность клеток, с экспрессией FoxP3FL, 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.

Индукция экспрессии сплайс-варианта FoxP3FL привела к значительному увеличению доли пролиферирующих клеток (рис. 7 Б). Через 96 ч после трансфекции  $98,04 \pm 1,02\%$  клеток прошли циклы деления по сравнению с  $93,83 \pm 2,02\%$  контрольных клеток. Индукция экспрессии сплайс-варианта FoxP3Δ2 привела к подавлению пролиферации клеток через 96 ч, и  $70,78 \pm 3,87\%$  популяции клеток делились. Делеция экзона 7 приводила к резкому снижению доли пролиферирующих клеток:  $41,14 \pm 3,86\%$  Трег, экспрессирующих FoxP3Δ7 и  $37,15 \pm 4,34\%$  Трег, экспрессирующих FoxP3Δ2Δ7 прошли циклы деления.

## 6. Супрессорная активность Трег с селективной экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3

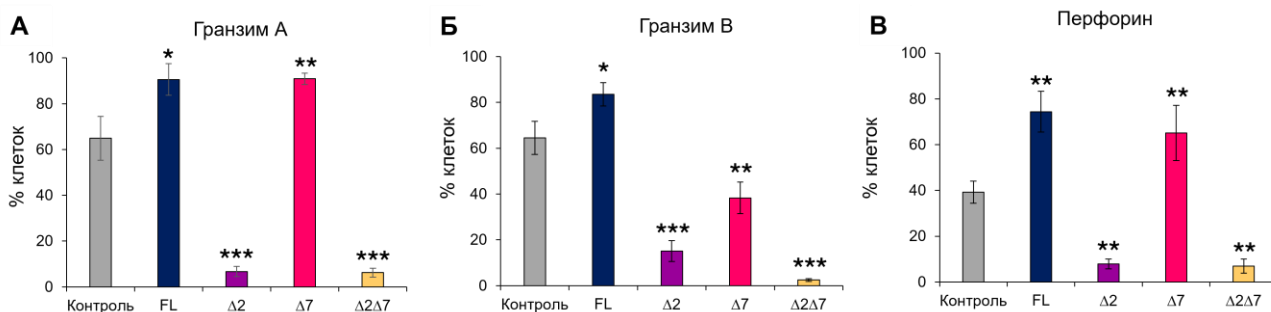
Контрольные клетки подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:32 (рис. 8 А). Супрессорная активность Трег, экспрессирующих FoxP3FL, была в три раза выше, поскольку они могли подавлять клетки-мишени в соотношении 1:96 (рис. 8 Б). Понижение супрессорной активности наблюдали при делеции экзонов. Трег, экспрессирующие FoxP3Δ2 подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:16 (рис. 8 В). Трег, экспрессирующие FoxP3Δ7 подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:8 (рис. 8 Г). Наиболее выраженное понижение супрессорной активности наблюдали при делеции обоих экзонов 2 и 7. Трег, экспрессирующие FoxP3Δ2Δ7 подавляли пролиферацию клеток-мишеней в соотношении 1:1 (рис. 8 Д). Результаты данного эксперимента показали, что Трег, экспрессирующие сплайс-варианты FoxP3 с делецией экзонов, обладают пониженной супрессорной активностью.



**Рисунок 8. Результаты реакции смешанных лимфоцитов.** Повышенная супрессорная активность Трег, экспрессирующих FoxP3FL, и пониженная супрессорная активность Трег с делециями экзонов. N = 4. \* – p < 0,05 по критерию Манна-Уитни.

### 7. Уровень синтеза молекул, вовлеченных в реализацию супрессорной активности Трег

Сериновые протеазы гранзим А, гранзим В и связанный с гранзимами перфорин вовлечены в механизмы контакт-зависимой супрессорной активности Трег. Наблюдали снижение количества клеток, продуцирующих данные молекулы, при делеции экзона 2, но не экзона 7 (рис. 9). Почти все клетки, экспрессирующие FoxP3FL (90,6 ± 6,9%) или FoxP3Δ7 (90,9 ± 2,5%) были гранзим А-положительными (рис. 9 А) по сравнению с контрольными клетками (64,9 ± 9,6%).

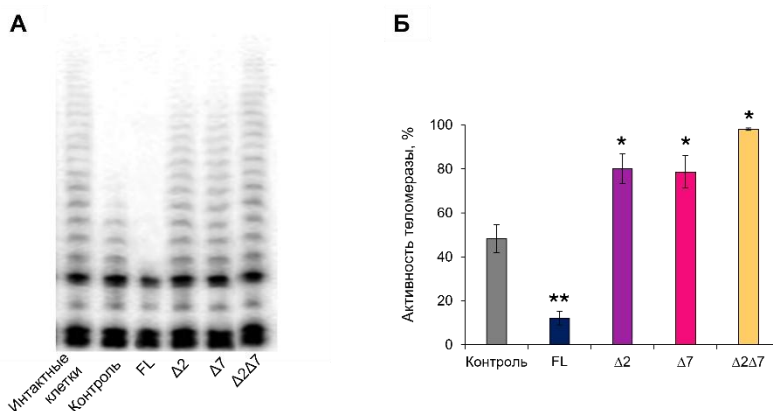


**Рисунок 9. Способность Трег с экспрессией индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 продуцировать молекулы, вовлеченные в реализацию супрессорной активности:** (А) гранзим А, (Б) гранзим В и (В) перфорин. N = 4. \* – p ≤ 0,05; \*\* – p ≤ 0,01; \*\*\* – p ≤ 0,005 по отношению к трансфицированным контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Большинство Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делецией экзона 2, т. е. FoxP3Δ2 и FoxP3Δ2Δ7, были гранзим А-отрицательными ( $6,7 \pm 2,2\%$  из Трег, экспрессирующих FoxP3Δ2 и  $6,2 \pm 1,9\%$  из Трег, экспрессирующих FoxP3Δ2Δ7 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. 9 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 FoxP3Δ2 и  $2,5 \pm 0,6\%$  с экспрессией FoxP3Δ2Δ7). 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 FoxP3Δ7 (рис. 9 В). Доля перфорин-положительных клеток была наименьшей среди Трег с делецией экзона 2 ( $7,9 \pm 2,1\%$  перфорин-положительных клеток с экспрессией FoxP3Δ2 и  $7,0 \pm 3,1\%$  с экспрессией FoxP3Δ2Δ7).

#### 8. Подавление активности теломеразы Трег, селективно экспрессирующими индивидуальные сплайс-варианты FoxP3

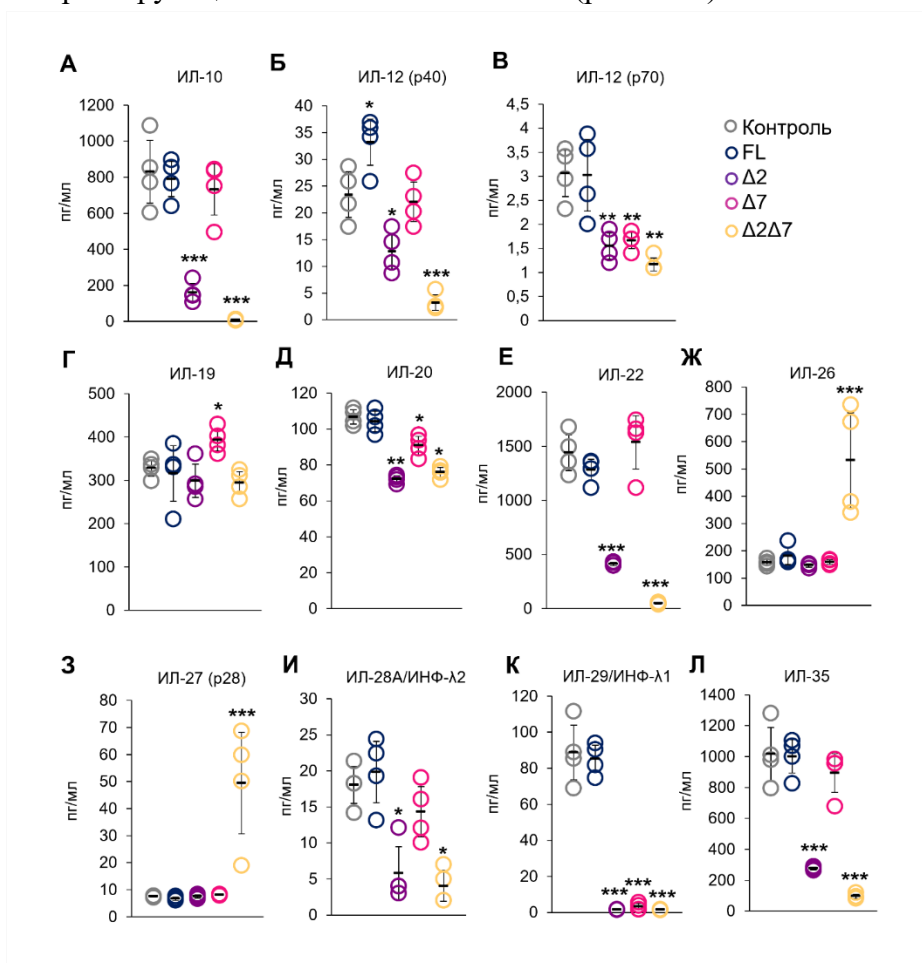
Трег, экспрессирующие сплайс-вариант FoxP3FL, подавляли теломеразу значительно эффективнее, чем клетки с делециями экзонов 2 и/или 7 (рис. 10). Активность теломеразы в таргетных лимфоцитах, инкубированных с контрольными Трег, составила  $48,4 \pm 6,3\%$ . После инкубации таргетных лимфоцитов с Трег, экспрессирующими FoxP3FL, активность теломеразы составила  $12,1 \pm 3,1\%$ . Активность теломеразы в таргетных лимфоцитах, инкубированных с Трег, экспрессирующими FoxP3Δ2, составила  $80,1 \pm 6,9\%$ ; с Трег, экспрессирующими FoxP3Δ7,  $78,6 \pm 7,4\%$ ; с Трег, экспрессирующими FoxP3Δ2Δ7,  $98,1 \pm 0,6\%$ .



**Рисунок 10. Способность Трег с индивидуальными сплайс-вариантами подавлять теломеразу в таргетных лимфоцитах.** (А) Активность теломеразы, определенная с помощью метода 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.

## 9. Цитокиновый профиль Трег, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3

Концентрация супрессорных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-35 была понижена только в среде Трег, экспрессирующих сплайс-варианты с делециями экзона 2 (FoxP3Δ2 и FoxP3Δ2Δ7) (рис. 11 А, Л). Концентрация субъединицы р40 ИЛ-12, индуцирующего активацию и пролиферацию Трег, значительно повышалась в среде клеток, экспрессирующих FoxP3FL, и была понижена в среде Трег, экспрессирующих FoxP3Δ2 и FoxP3Δ2Δ7 (рис. 11 Б).



**Рисунок 11. 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/ИНФ-λ2, (К) ИЛ-29/ИНФ-λ1 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.

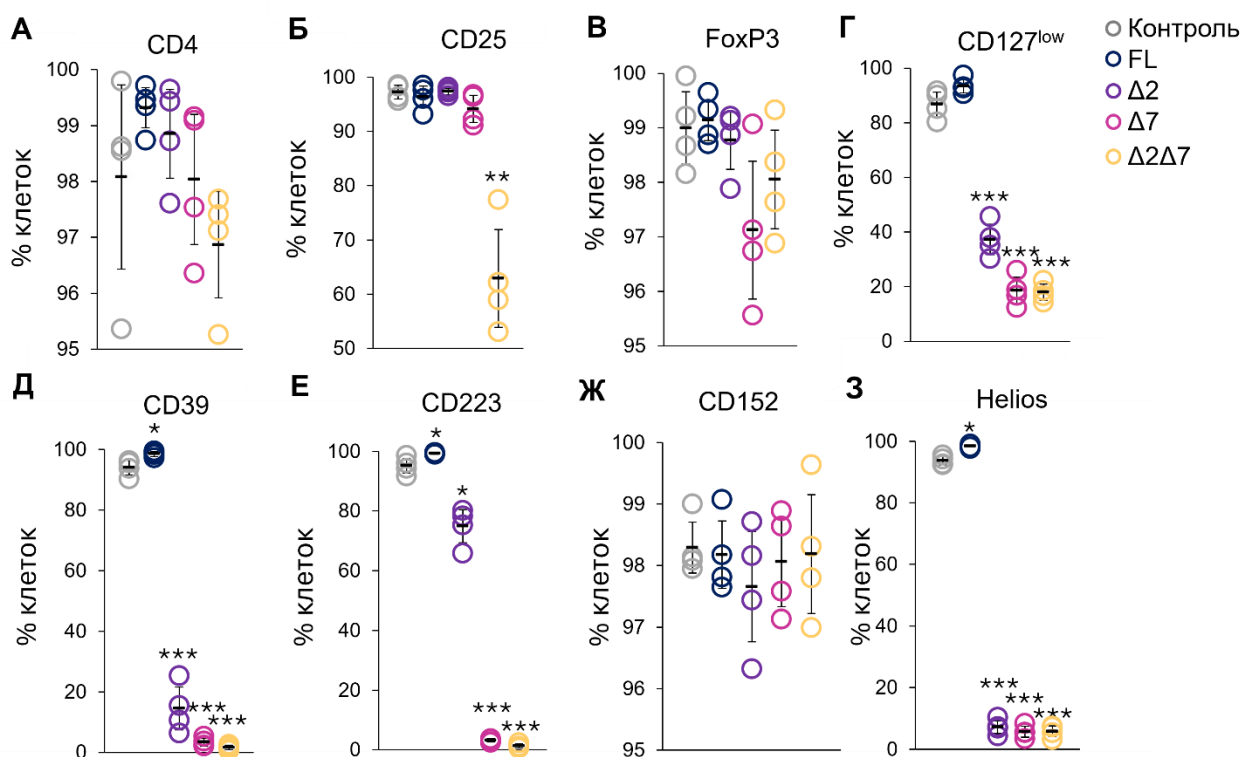
Концентрация субъединицы р70 ИЛ-12 была понижена в средах клеток с делецией как экзона 2, так и с делецией экзона 7 (рис. 11 В). Концентрация ИЛ-19 была повышена в среде Трег, экспрессирующих FoxP3Δ7 (рис. 11 Г). Концентрация ИЛ-20 и ИЛ-29 была понижена в средах клеток с делецией как экзона 2, так и с делецией экзона 7 (рис. 11 Д, К), а концентрация

ИЛ-22 и ИЛ-28 была понижена только в среде клеток с делециями экзона 2 (FoxP3 $\Delta$ 2 и FoxP3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7) (рис. 11 Е, И). Концентрация ИЛ-26 и ИЛ-27 была значительно повышена только в среде клеток с делециями обоих экзонов (рис. 11 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.

### 10. Иммунофенотипическая характеристика Трег с индивидуальными сплайс-вариантами FoxP3

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. 12 А).



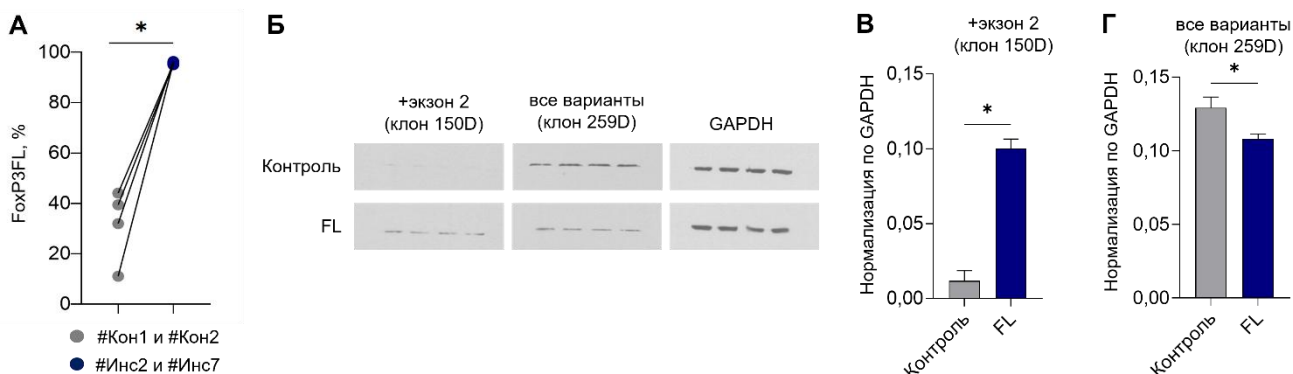
**Рисунок 12. Иммунофенотип Трег, селективно экспрессирующих индивидуальные сплайс-варианты FoxP3.** Маркёры, ассоциированные с идентификацией Трег: (А) CD4, (Б) CD25, (В) FoxP3, (Г) CD127. Маркёры, ассоциированные с супрессорной активностью Трег: (Д) CD39, (Е) CD223, (Ж) CD152. Маркёр, позволяющий идентифицировать 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 маркера CD25 была понижена у клеток с делециями обоих экзонов:  $62,9 \pm 9,0\%$  Трег, экспрессирующих FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$ , обладали фенотипом CD25 (рис. 12 Б). Трег также характеризуются низкой экспрессией CD127. Фенотип CD127<sup>low</sup> был характерен лишь для контрольных клеток и клеток, экспрессирующих FoxP3FL (рис. 12 Г). Делеция экзона 2 привела к снижению количества клеток, у которых определялась экспрессия CD127<sup>low</sup> ( $37,3 \pm 5,6\%$ ). Наименьшее количество Трег, обладающих фенотипом CD127<sup>low</sup>, 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. 12 В). CD152 (CTLA-4), CD223 и CD39 – маркеры, задействованные в реализации супрессорной функции Трег. Все группы Трег характеризовались фенотипом CD152 (рис. 12 Ж). Индукция сплайс-варианта FoxP3FL привела к увеличению доли Трег с фенотипом CD39 ( $98,2 \pm 0,8\%$ ) (рис. 12 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. 12 Е) по сравнению с контрольными клетками ( $96,0 \pm 0,3\%$ ). Индукция сплайс-варианта FoxP3 $\Delta 2$  привела к понижению доли CD223-положительных клеток до  $78,4 \pm 5,5\%$ . Наименьшее количество CD223-положительных клеток наблюдали при индукции сплайс-варианта FoxP3 $\Delta 7$  ( $2,7 \pm 0,5\%$ ) и сплайс-варианта FoxP3 $\Delta 2\Delta 7$  ( $1,1 \pm 0,7\%$ ). 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. 12 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 маркеры, ассоциированные с идентификацией, супрессорной активностью и стабильностью данных клеток.

## 11. Индукция полноразмерного сплайс-варианта FoxP3 в Трег пациентов с боковым амиотрофическим склерозом

Для индукции экспрессии FoxP3FL Трег пациентов с БАС были трансфицированы ПСО #Инс2 и #Инс7, а также контрольными неспецифическими олигонуклеотидами #Кон1 и #Кон2. Экспрессия сплайс-варианта FoxP3FL в Трег, трансфицированных #Инс2 и #Инс7, составила 95,1 – 96,4% (рис. 13 А). В Трег, трансфицированных #Кон1 и #Кон2, уровень экспрессии FoxP3FL составил 11,1 – 44,1%.

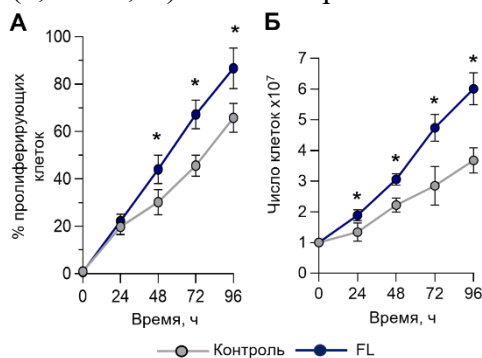


**Рисунок 13. Индукция экспрессии FoxP3FL в Трег пациентов с БАС.** (А) Результаты ПЦР демонстрируют индукцию FoxP3FL после трансфекции Трег #Инс2 и #Инс7. Приведены индивидуальные значения для контрольных клеток и клеток с индуцированной экспрессией FoxP3FL. (Б) Результаты вестерн-блоттинга демонстрируют индукцию FoxP3FL после трансфекции Трег #Инс2 и #Инс7. (В, Г) Количественно определенные денситометрией и нормализованные по GAPDH результаты вестерн-блоттинга. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. N = 4. \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

Индукция экспрессии FoxP3FL на белковом уровне была подтверждена вестерн-блоттингом (рис. 13 Б). Используя клон антитела 150D (специфичный эпитопу, кодируемому экзон 2), было показано, что среди контрольных клеток определялся низкий уровень белка FoxP3, содержащего данный эпитоп. Уровень данного белка был более чем в 5 раз выше после индукции сплайс-варианта FoxP3FL (рис. 13 В). Клон антитела 259D, который является специфичным эпитопу, расположенному после участка, кодируемого экзон 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. 13 Б, Г). Результаты эксперимента показали, что трансфекция Трег пациентов с БАС ПСО #Инс2 и #Инс7 позволяет получить клетки с селективной экспрессией сплайс-варианта FoxP3FL.

## 12. Проллиферативная активность Трег пациентов с БАС, селективно экспрессирующих FoxP3FL

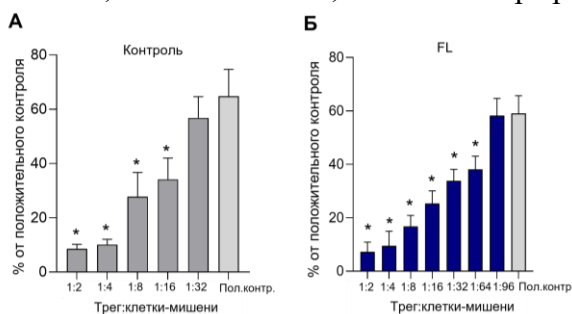
Трег с индуцированной экспрессией FoxP3FL отличались значительно более высокой долей пролиферирующих клеток в ходе культивирования (рис. 14 А): через 96 ч после трансфекции  $86,1 \pm 8,6\%$  Трег, экспрессирующих FoxP3FL, совершили деление по сравнению с  $65,8 \pm 6,3\%$  контрольных Трег. Было подсчитано общее количество клеток в течение 96 ч культивирования после трансфекции. 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. 14 Б).



**Рисунок 14. 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 контрольным клеткам по критерию Манна-Уитни.

## 13. Супрессорная активность Трег пациентов с БАС, селективно экспрессирующих FoxP3FL

Контрольные Трег подавляли пролиферацию  $CD4^+CD25^-$  Т-клеток в соотношении 1:16 (рис. 15 А), в то время как Трег с селективной экспрессией FoxP3FL подавляли клетки-мишени в соотношении 1:64 и, соответственно, были в четыре раза активнее (рис. 15 Б).



**Рисунок 15. Результаты реакции смешанных лимфоцитов.**  $CD4^+CD25^+$  Т-клетки, инкубированные в различных соотношениях совместно с (А) контрольными Трег или (Б) Трег, экспрессирующими FoxP3FL. (Б, Г) Пол. контр. — положительный контроль, клетки  $CD4^+CD25^-$ , культивируемые совместно с фидерными клетками.  $N = 4$ . \* –  $p < 0,05$  по критерию Манна-Уитни.

## 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. Особое место в реализации иммунного ответа занимают Трег, регулирующие функционирование аутоактивированных лимфоцитов, поддерживающие иммунный гомеостаз и предотвращающие развитие аутоиммунных реакций. Показано, 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. Селективную экспрессию индивидуальных сплайс-вариантов FoxP3 удалось получить при помощи ПСО, способных индуцировать АС экзонов 2 или 7. 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 теломеразу в клетках-мишенях. Включение или делеции экзонов приводили к изменению эффективности подавления Трег теломеразы в таргетных клетках. 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 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 FоxP3. 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 FоxP3 в сторону экспрессии сплайс-вариантов с делециями экзона 7 и с делециями экзонов 2 и 7. По сравнению со здоровыми донорами экспрессия сплайс-вариантов FоxP3FL и FоxP3Δ2 снижена в Трег пациентов всех групп.
2. Селективная экспрессия индивидуальных сплайс-вариантов FоxP3 достигается путём применения пары переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, модулирующих АС пре-мРНК FоxP3 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 FоxP3, 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 FоxP3FL приводит к увеличению синтеза мембранного маркёра CD127<sup>low</sup>, маркёров супрессорной активности CD39 и CD223, а также маркёра стабильности Трег Helios. Индукция делеционных вариантов приводит к значительному снижению синтеза маркёров CD127<sup>low</sup>, 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 FоxP3 приводит к селективной экспрессии полноразмерного сплайс-варианта FоxP3FL и вызывает увеличение пролиферативной и супрессорной активности Трег пациентов с боковым амиотрофическим склерозом.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в научных журналах

1. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., **Blinova V.G.**, Abramova A.A., Shishparenok A.N., Eliseeva D.D. Induction of FoxP3 Pre-mRNA Alternative Splicing to Enhance the Suppressive Activity of Regulatory T Cells from Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients // *Biomedicines*. – 2024. – V. 12(5). – 1022.
2. **Blinova V.G.**, Zhdanov D.D. Many Faces of Regulatory T Cells: Heterogeneity or Plasticity? // *Cells*. – 2024. – V. 13(11). – 959.
3. **Blinova V.G.**, Gladilina Y.A., Abramova A.A., Eliseeva D.D., Vtorushina V.V., Shishparenok A.N., Zhdanov D.D. Modulation of Suppressive Activity and Proliferation of Human Regulatory T Cells by Splice-Switching Oligonucleotides Targeting FoxP3 Pre-mRNA // *Cells*. – 2024. – V. 13(1). – 77.
4. **Blinova V.G.**, Vasilyev V.I., Rodionova E.B., Zhdanov D.D. The Role of Regulatory T Cells in the Onset and Progression of Primary Sjögren’s Syndrome // *Cells*. – 2023. – V. 12(10). – 1359.
5. **Блинова В. Г.**, Гладиллина Ю. А., Елисеева Д.Д., Лобаева Т.А., Жданов, Д.Д. Повышенная супрессорная активность трансформированных ex vivo регуляторных Т-клеток в сравнении с нестимулированными клетками того же донора // *Биомедицинская химия*. – 2022. – Т. 68(1). – С. 55-67.
6. **Blinova V.G.**, Novachly N.S., Gippius, S.N., Hilal A., Gladilina Y.A., Eliseeva D.D., Zhdanov D.D. Phenotypical and Functional Characteristics of Human Regulatory T Cells during Ex Vivo Maturation from CD4+ T Lymphocytes // *Applied Sciences*. – 2021. – V. 11(3). – 5776.

### Материалы конференций

1. **Блинова В.Г.** Сплайс-варианты FoxP3 в регуляторных Т-клетках пациентов с аутоиммунными заболеваниями // *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2025»* / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. – 2025.
2. Жданов Д.Д., **Блинова В.Г.**, Гладиллина Ю.А., Шишпарёнок А.Н., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д. Модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами для индукции пролиферации и супрессорной активности регуляторных Т-клеток пациентов с аутоиммунными заболеваниями // *Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине; Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024 г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор*. – 2024. – С.345-346.

3. Жданов Д.Д., **Блинова В.Г.**, Гладиллина Ю.А., Абрамова А.А., Шишпарёнок А.Н., Елисеева Д.Д. Избирательная индукция сплайс-вариантов FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами как подход к модуляции активности регуляторных Т-клеток человека для целей регенеративной терапии // Биохимия человека: материалы всероссийской конференция с международным участием, 17–19 октября 2024 г. / под общей редакцией В.С. Покровского. — М.: Е-ното. – 2024. – С. 96.
4. **Блинова В.Г.**, Гладиллина Ю.А., Шишпарёнок А.Н., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д., Жданов Д.Д. Роль сплайс-вариантов FoxP3 в супрессорной активности регуляторных Т-клеток: подход к регенеративной терапии рассеянного склероза // Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием «Биомедицинская химия: наука и практика», Москва: Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича. – 2024. – С.30.
5. Жданов Д.Д., **Блинова В.Г.**, Гладиллина Ю.А., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д. Стратегия увеличения супрессорной активности регуляторных Т-клеток с целью создания персонализированного клеточного продукта для регенеративной терапии аутоиммунных заболеваний // Международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития", выпуск 21, 25 сентября 2023, Москва. – 2023. – С. 62.
6. Жданов Д.Д., **Блинова В.Г.**, Гладиллина Ю.А., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д. «Модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами как подход к увеличению супрессорной активности регуляторных Т-клеток для регенеративной терапии рассеянного склероза» // Материалы международного конгресса CRISPR-2023 Академгородок, Новосибирск, Россия 11–13 сентября 2023 года. Гены и Клетки Том XVIII, Приложение. – 2023. – С. 15.