

ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ имени В.А. ЭНГЕЛЬГАРДТА
РАН

На правах рукописи

Атретханы Камар-Сулу Нияз кызы

**«Иммунорегуляторные функции TNF в поддержании
супрессорного микроокружения при аутоиммунных и раковых
заболеваниях»**

Специальность 03.03.03 – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук,
профессор, академик РАН
Недоспасов Сергей Артурович

кандидат биологических наук
Друцкая Марина Сергеевна

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общая характеристика TNF	11
Сигнальный путь TNF	12
Физиологические функции TNF	14
1.2. Роль TNF в развитии рака	15
Миелоидные супрессорные клетки (MDSC).	16
Функции MDSC	16
Роль TNF в развитии MDSC	20
1.3. Роль TNF в развитии аутоиммунных заболеваний	21
Рассеянный склероз	22
Роль TNF в патогенезе РС и EAE	24
Т-регуляторные клетки.....	26
Функции Treg клеток	28
Роль TNF и NF- κ B в развитии Т-регуляторных клеток.....	30
TNF и TNFR2 как мишени для терапии аутоиммунных и раковых заболеваний	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
Животные.	35
Генотипирование.	35
Модель MCA 205 фибросаркомы.	36
Введение блокаторов мышам с опухолями.	36
Модель EAE.	37
Выделение иммунных клеток.	37
Цитофлуориметрический анализ.	37
Анализ супрессорной активности MDSC.	39
Анализ супрессорной активности Treg клеток.....	40
Статистический анализ.....	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	41
3.1 Влияние фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами на рост перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы и развитие MDSC.	42
3.1.1. Изучение динамики развития MDSC и роста MCA205 фибросаркомы у мышей дикого типа (C57BL/6) и мышей, гуманизированных по гену <i>TNF</i> (hTNFKI).	42

3.1.2. Фармакологическая нейтрализация TNF с помощью Инфликсимаба или Этанерцепта приводит к замедлению роста MCA205 фибросаркомы и снижению накопления MDSC в крови и во вторичных лимфоидных органах hTNFKI мышей	44
3.1.3. Фармакологическая нейтрализация TNF Инфликсимабом или Этанерцептом приводит к снижению супрессорной активности MDSC	49
3.2. Иммунорегуляторная функция TNF/TNFR2 в мышинной модели рассеянного склероза	52
3.2.1. Изучение динамики развития EAE у мышей дикого типа (C57BL/6), гуманизированных по гену TNF (hTNFKI) и дважды гуманизированных по генам TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI)	52
3.2.2. TNFR2 на T-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии	59
3.2.3. Генетическая инактивация TNFR2 на T-регуляторных клетках приводит к усилению клинических симптомов EAE и нарушению контроля Th17 клеток.	63
Обсуждение	67
Заключение	74
Выводы	76
Благодарности	77
Список литературы	78
Приложение 1	93

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TNF - фактор некроза опухоли

tmTNF – трансмембранный TNF

sTNF- растворимый TNF

TNFRs - рецептор фактора некроза опухоли

MDSC- миелоидные супрессорные клетки

Treg клетки - Т-регуляторные клетки

CCR - хемокиновый рецептор

ЕАЕ-экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит

ЦНС – центральная нервная система

MOG – миелин-олигодендроцитарный гликопротеин

РС – рассеянный склероз

Th – Т-хелпер

NO - оксид азота

ROS-активные формы кислорода

hTNFKI – гуманизированные мыши по гену TNF

hTNFKI x hTNFR2KI – гуманизированные мыши по генам TNF и TNFR2

IL - интерлейкин

FDC – фолликулярные дендритные клетки

IBD – воспалительные заболевания кишечника

GITR – glucocorticoid-induced TNF-related protein

CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

АПК- антиген-презентирующие клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Фактор некроза опухоли (TNF) - цитокин, который был открыт благодаря своей противоопухолевой активности. Изначально возлагались большие надежды на применение TNF в качестве противоопухолевого препарата, однако его действие оказалось токсичным для организма, и использование такой терапии стало возможно только в ограниченной системе. Далее годы исследований показали, что TNF обладает рядом важных функций для организма, в том числе участвует в развитии лимфоидных органов, иммунном ответе против инфекций и регуляции воспаления. Последняя функция TNF оказалась очень важной в контексте развития некоторых аутоиммунных и раковых заболеваний.

Как выяснилось, нарушенная регуляция TNF и его повышенная продукция может приводить к хроническому воспалению. При хроническом воспалении происходит активация различных сигнальных каскадов и транскрипционных программ, которые в дальнейшем могут дать селективное преимущество опухолевым клеткам и клетками опухолевого микроокружения. К примеру, через экспрессию генов факторов роста сосудов, протеаз, цитокинов и хемокинов может происходить расширение опухолевой ниши, а активные формы кислорода и азота, помимо ингибирования иммунного ответа, могут способствовать нестабильности генома за счет появления мутаций и эпигенетических изменений.

В последнее время появляются данные, что хроническое воспаление, в частности, повышенная продукция TNF, может способствовать развитию и накоплению миелоидных супрессорных клеток (MDSC), незрелых миелоидных клеток, участвующих в подавлении противоопухолевого иммунного ответа. При этом на данный момент активно разрабатывается иммунотерапия рака, направленная на активацию иммунного ответа против опухоли. В частности, эффективность действия блокаторов PD-1 и CTLA-4, направленных на ингибирование другого типа супрессорных клеток, Treg клеток, а также CAR-T-клеточной терапии, основанной на прямом таргетировании опухолевых клеток, показана в терапии некоторых типов раковых заболеваний. Наряду с этим, роль провоспалительных цитокинов в развитии опухолей активно исследуется, а их возможная блокировка или блокировка рецепторов или внутриклеточных сигнальных каскадов может рассматриваться как основа для новых подходов в иммунотерапии. Поэтому в первой части нашей работы исследуется действие фармакологической нейтрализации TNF с

помощью клинически применяемых блокаторов TNF человека на развитие MDSC в модели перевиваемой солидной опухоли у мышей с гуманизацией гена *TNF*.

В случае аутоиммунных заболеваний хроническое воспаление приводит к нарушению физиологических функций тканей, инфильтрации иммунными клетками сайта воспаления и развитию патологических процессов. Нейтрализация TNF широко применяется в терапии таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит, болезнь Крона, псориаз, но оказалась не только unsuccessful в лечении рассеянного склероза (РС), а наоборот, приводила к усилению симптомов заболевания. Вдобавок, у пациентов, принимающих на постоянной основе блокаторы TNF, со временем могут развиваться побочные эффекты, в том числе и демиелинизация.

Как выяснилось, TNF может обладать регуляторными свойствами, необходимыми для поддержания гомеостаза организма. Интересно, что широкий спектр действия TNF объясняется наличием двух рецепторов с широким профилем экспрессии на разных типах клеток и различиями в опосредуемых этими рецепторами сигнальными каскадами. Так, было показано, что за основные провоспалительные функции TNF ответственен сигнальный путь через TNFR1, тогда как роль TNFR2 на данный момент активно изучается. В ранних исследованиях было показано, что TNFR2 может играть защитную роль при нейровоспалении. Например, он участвует в процессах ремиелинизации за счет стимулирования пролиферации предшественников олигодендроцитов. При этом показана также защитная роль TNFR2 на клетках микроглии. Интересно, что экспрессия TNFR2 характерна для ряда супрессорных популяций, в том числе и для Т-регуляторных (Treg) клеток. Treg клетки - важная популяция Т-клеток, необходимая для осуществления гомеостаза в организме, подавления иммунного ответа и для контроля воспаления. Несмотря на то, что TNFR2 широко представлен на Treg клетках, его роль в контексте нейровоспаления не до конца изучена.

Изучение роли TNF и его рецепторов при различных заболеваниях необходимо для создания новых подходов терапии аутоиммунных заболеваний, к примеру, основанных на блокировке определенного TNF-сигнального пути, ответственного за патологическое состояние, не затрагивая при этом регуляторных свойств TNF.

Таким образом, целью нашего исследования было изучение роли TNF в поддержании супрессорного микроокружения при раковых и аутоиммунных заболеваниях.

В рамках этой работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние блокировки TNF на рост перевиваемой опухоли фибросаркомы MCA205, а также на накопление и функциональность MDSC, у мышей с гуманизацией гена *TNF*.
2. Изучить роль TNFR2 сигнального пути в Treg клетках в поддержании их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии
3. Изучить роль TNF-TNFR2 сигнального пути в Treg клетках в развитии нейровоспаления в мышинной модели рассеянного склероза.

Научная новизна работы

Работу проводили на уникальной линии мышей, гуманизированных по гену *TNF*, в которых было изучено действие клинически применяемых блокаторов TNF в модели перевиваемой солидной опухоли MCA205 фибросаркомы. Впервые было исследовано, как нейтрализация TNF с помощью Инфликсимаба, химерного антитела, состоящего из Fab фрагмента мыши и Fc части IgG1 человека, и Этанерцепта, фьюжн-белка, состоящего из двух молекул TNFR2 и Fc части IgG1 человека, влияет на накопление MDSC и их функциональную активность при росте перевиваемой солидной опухоли MCA 205 фибросаркомы. Было показано, что нейтрализация TNF обоими типами блокаторов приводит к замедлению роста опухоли и подавляет накопление MDSC в крови и в лимфоидных органах. При этом блокировка TNF не только способствует снижению количества MDSC, но также влияет на их супрессорные функции.

Кроме того, в этой работе впервые были охарактеризованы мыши с двойной гуманизацией системы лиганд-рецептор TNF-TNFR2 с возможностью генетической инактивации TNFR2 в определенном типе клеток. Также, впервые были охарактеризованы мыши с тканеспецифическим удалением TNFR2 на Т-регуляторных клетках. Было установлено, что TNFR2 участвует в поддержании супрессорного фенотипа Т-регуляторных клеток. Удаление TNFR2 приводит к снижению экспрессии ключевых молекул Treg клеток, участвующих в подавлении аутоиммунных реакций. Кроме того, была установлена протективная роль TNFR2 на Treg клетках в контроле нейровоспаления в мышинной модели рассеянного склероза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные результаты работы имеют важное значение как для фундаментальной иммунологии, так и для клинических исследований. Прежде всего, иммунотерапия представляет собой новую эру в разработке лекарств против аутоиммунных и раковых заболеваний. Однако для создания безопасных и эффективных прототипов антицитокиновых препаратов необходимо понимание молекулярных механизмов регуляции иммунного ответа, а также изучение роли ключевых цитокинов и их рецепторов в поддержании гомеостаза организма. При этом важной составляющей этой работы является создание животных моделей для доклинических испытаний разрабатываемых препаратов и оценки их эффективности в экспериментальных моделях *in vivo*.

В нашей работе были использованы гуманизированные по гену *TNF* мыши, которые позволили показать эффективность действия клинически применяемых блокаторов *TNF* в мышинной модели фибросаркомы. Кроме того, была подтверждена важность *TNF* в поддержании супрессорных свойств MDSC, популяции иммунных клеток, участвующих в развитии рака, и впервые показана эффективность нейтрализации *TNF* в подавлении MDSC *in vivo*. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что *TNF* и MDSC могут рассматриваться как потенциальные мишени для иммунотерапии рака.

Используя мышей с кондиционным удалением *TNFR2* на Treg клетках, была показана важная иммунорегуляторная роль *TNFR2* в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток. Кроме того, полученные данные о протективной роли *TNF/TNFR2* на Treg клетках при нейровоспалении указывают на необходимость создания более специфичных реагентов, которые будут ингибировать действие цитокина из патогенного источника, при этом сохраняя его иммунорегуляторные свойства.

Таким образом, результаты нашей работы указывают, что, с одной стороны, *TNF* может рассматриваться как потенциальная мишень для иммунотерапии рака, а с другой – системное удаление *TNF* может приводить к нежелательным последствиям, в частности, к развитию аутоиммунных проявлений в виде нейровоспаления.

Методология и методы исследования

Для изучения последствий фармакологической нейтрализации *TNF* в *in vivo* модели перевиваемой опухоли работу проводили на мышах, гуманизированных по гену *TNF* (*hTNFKI*). В качестве модели перевиваемой опухоли была использована клеточная линия MCA205 фибросаркомы мыши. Опухолевые клетки вводили подкожно *hTNFKI* мышам на

фоне фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами – Инфликсимабом или Этанерцептом, контрольной группе вводили фосфатный буфер (PBS). Эффект фармакологической блокировки TNF на накопление MDSC и их супрессорную активность оценивали методом проточной цитометрии и по способности MDSC ингибировать пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*.

Для изучения иммунорегуляторной роли TNF при нейровоспалении работу проводили на мышах с двойной гуманизацией системы лиганд-рецептор TNF-TNFR2 с возможностью кондиционного удаления TNFR2 в FoxP3⁺ клетках. В качестве модели нейровоспаления применяли широко распространенную мышиную модель рассеянного склероза –экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE). В этой модели индукцию заболевания осуществляли введением миелинового пептида MOG₃₅₋₅₅ в смеси с полным адъювантом Фрейнда и последующим двукратным введением коклюшного токсина для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Клинические симптомы заболевания оценивали по стандартному протоколу, последствия генетической инактивации TNFR2 в Т-регуляторных клетках на их супрессорную активность оценивали методом проточной цитометрии, в частности по способности подавлять пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*.

Достоверность результатов

Результаты работы были воспроизведены в двух и более независимых экспериментах. При формировании экспериментальных групп подбирали мышей соответствующего возраста и пола, а эксперименты с генетическим удалением TNFR2 проводили с мышами из того же помета (литтермейт-контроли), не несущими Стре-рекомбиназу. Методы исследования, мышиные модели заболеваний, а также статистическая обработка данных, приведенные в работе, соответствуют общепризнанным международным стандартам и являются корректными.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фармакологическая нейтрализация TNF клинически применяемыми блокаторами, Инфликсимабом или Этанерцептом, замедляет рост MCA205 фибросаркомы, подавляет накопление MDSC в организме и их супрессорную активность.
2. TNFR2 на Т-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии.

3. TNFR2 на Т-регуляторных клетках играет защитную роль в модели рассеянного склероза, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Личный вклад автора

В настоящей работе автором были выполнены эксперименты, связанные с изучением роли TNF в поддержании супрессорного микроокружения при развитии фибросаркомы и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и выполнении экспериментов, обработке и анализе результатов, написании публикаций и текста диссертации.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: 3rd Belgrade EFIS symposium on immunoregulation, Белград, Сербия, 24-28 мая 2015, Всероссийский форум имени В.И. Иоффе “Дни иммунологии в Санкт-Петербурге”, Санкт-Петербург, Россия, 1-4 июня 2015, 81st Cold Spring Harbor Symposium: Targeting Cancer, Колд Спринг Харбор, США, 1-6 июня 2016, 13th Spring School on Immunology, Этталь, Германия, 8-13 марта 2017, Second interdisciplinary congress on IL17, Мюнхен, Германия, 24-25 ноября 2017 года, III Всероссийский конгресс “Аутоиммунные и иммунодефицитные заболевания”, 16-17 ноября 2018 года, Конференция молодых ученых Института молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, III Международная конференция “Наука будущего” и форум “Наука будущего – наука молодых”, Сочи, Россия, 14-17 мая 2019 года. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 7 тезисов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика TNF

Фактор некроза опухоли, TNF – цитокин широкого спектра действия, участвующий в развитии лимфоидных органов, защите от инфекций и контроле воспаления. Такая многофункциональность TNF, в первую очередь, связана с наличием двух рецепторов, представленных на разных типах клеток, и различиями во внутриклеточных сигнальных каскадах от этих рецепторов. TNF экспрессируется как трансмембранный белок в виде гомотримера. Далее фермент TACE (TNF- α converting enzyme) за счет протеолитического разрезания может переводить трансмембранную форму TNF (tmTNF) в растворимую (sTNF). TNF взаимодействует с двумя разными рецепторами: TNFR1 и TNFR2. TNFR1 представлен почти на всех клетках, тогда как TNFR2 экспрессируется на определенных типах клеток, таких как нейроны, олигодендроциты, MDSC, T-регуляторные клетки и моноциты. Считается, что sTNF преимущественно взаимодействует с TNFR1, тогда как tmTNF может взаимодействовать с обоими рецепторами (Grell et al., 1995, Sedger et al., 2014). TNFR1 (p55) – рецептор, имеющий “death domain”, активация которого может приводить как к клеточной смерти (Varfolomeev et al., 2018), так и к запуску экспрессии провоспалительных генов, тогда как TNFR2 (p75) участвует в NF- κ B-зависимой клеточной пролиферации (Wajant et al., 2003). При этом, известно, что для TNF-опосредованной передачи сигнала существует так называемый “обратный сигналинг”, то есть трансмембранный TNF в этом случае выступает как рецептор, который при взаимодействии с TNFR1 или TNFR2 приводит к активации транскрипционного фактора NF- κ B в клетке, экспрессирующей tmTNF (Qu et al., 2017) (рис.1). Кроме того, существует родственный TNF цитокин - LT α_3 , который может взаимодействовать с обоими рецепторами TNF. Таким образом, многофункциональность TNF объясняется наличием разных рецепторов, отличающихся по паттерну и уровню экспрессии и типу передаваемого сигнала, возможности передачи этих сигналов как в растворимой, так и в мембранно-связанной форме, а также наличием обратного сигналинга и лиганда LT α_3 .

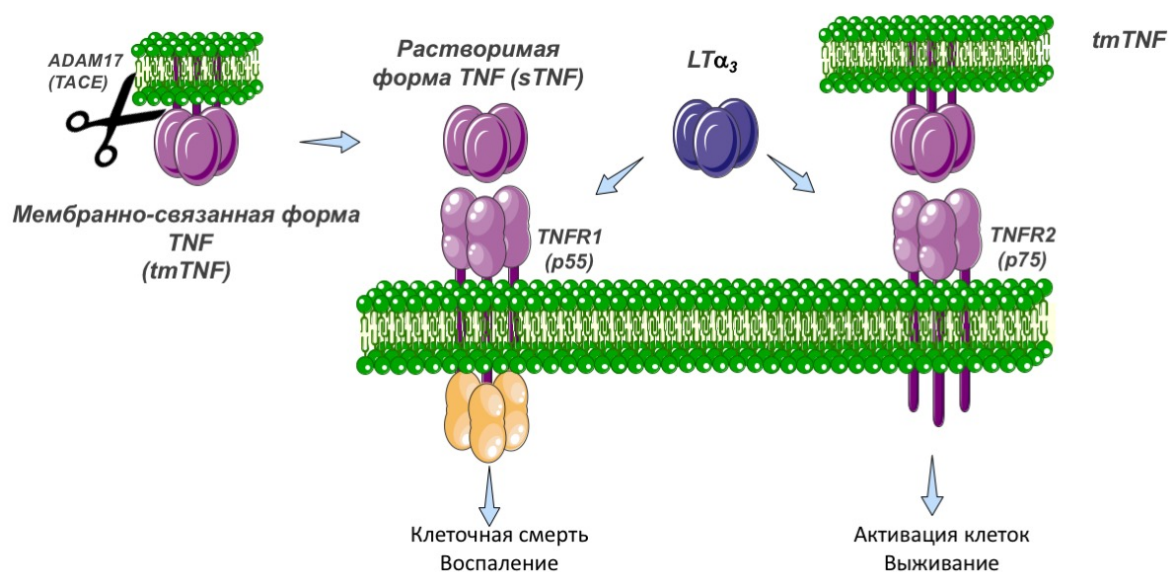


Рисунок 1. Общая схема взаимодействия лигандов с TNFR1/2.

Представлено схематическое изображение взаимодействия TNF и LT α_3 с рецепторами – TNFR1 и TNFR2.

Сигнальный путь TNF

В данной главе будет подробно рассматриваться активация сигнальных путей TNF (Рис. 2). При активации TNFR1 происходит рекрутирование DD-содержащих адаптеров, таких как TRADD, TRAF2 и RIPK1 (Sedger, et al., 2014). TRAF2, в свою очередь, ассоциирован с молекулами c-IAP1/2. Молекулы c-IAP1/2 представляют собой E3-лигазы (убиквитинлигазы), которые могут приводить к убиквитинилированию различных белков, в том числе RIPK1 и молекул cIAP1/2, по остаткам лизина в различных положениях. K63-убиквитинилирование RIPK1 приводит к взаимодействию RIPK1 с киназой TAK1 в комплексе TAB2/3. При этом также рекрутируются комплекс LUBAC, состоящий из белков HOIL-1L, HOIP и SHARPIN, к убиквитинлигазе cIAP1/2. LUBAC линейно полиубиквитинилирует NEMO (IKK γ) в положении M1 в комплексе с киназами IKK1/2 (IKK α/β). Далее киназа TAK1 фосфорилирует IKK2 (IKK β), который в дальнейшем фосфорилирует ингибитор транскрипционного фактора NF- κ B молекулу I κ B (Chen et al., 1995) с последующим убиквитинилированием E3-лигазой SCF (β -TrCP) в положении K48 молекулы I κ B, что в дальнейшем приводит к протеосомной деградации молекулы I κ B. Далее происходит транслокация активного комплекса NF- κ B, состоящего из p50/RelA (p65), в ядро и транскрипция провоспалительных генов, содержащих в своем промоторе

специфические сайты связывания с транскрипционным фактором NF- κ B. Кроме того, TAK1 может также активировать MAP-киназы, такие как JNK и p38, которые также участвуют в активации генов, ответственных за воспаление (Sabio et al., 2014). Помимо активации провоспалительных факторов, активация TNFR1 может приводить к клеточной гибели. В этом случае комплекс, состоящий из деубиквитинированного RIPK1 и TRADD, может диссоциировать от рецептора в цитоплазму и взаимодействовать с молекулами FADD, c-FLIP и про-каспазой-8, с последующим образованием каспазы-8 и активацией эффекторных каспаз, приводящих к индукции апоптоза. В случае ингибирования каспаз может происходить активация клеточной гибели по пути некроптоза. В этом случае деубиквитинированный RIPK1 взаимодействует с RIPK3, что приводит к фосфорилированию этих молекул, с дальнейшим связыванием и фосфорилированием псевдокиназы MLKL. Фосфорилирование псевдокиназы MLKL приводит к ее олигомеризации и транслокации в плазматическую мембрану, в этом случае нарушается проницаемость мембраны, приток положительно заряженных ионов, как Ca^{2+} , Na^+ , K^+ и дальнейшей гибели клетки по пути некроза. TNFR2, как было сказано ранее, не содержит доменов смерти, при его активации происходит рекрутирование молекул TRAF2/c-IAP1/2 и последующая активация NF- κ B сигнального пути через протеосомную деградацию молекулы I κ B (Varfolomeev, et al., 2018).

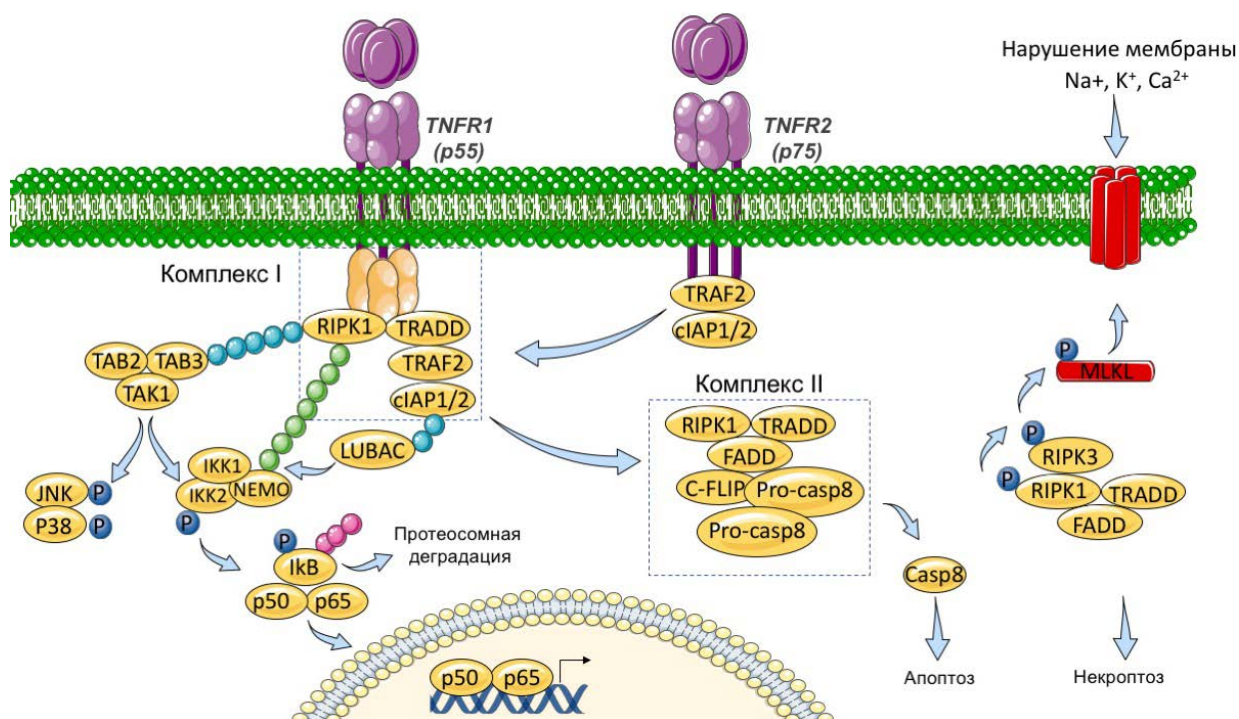


Рисунок 2. Сигнальный путь TNF. Представлено схематическое изображение TNFR1/2 сигнального пути

Физиологические функции TNF

Индукция воспаления в ответ на действие различных патогенов лежит в основе эффективного иммунного ответа. Основными медиаторами воспаления являются провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL-1 и IL-6. TNF активно участвует в воспалительной реакции на разных уровнях— локально и системно. Так, TNF активирует клетки врожденного иммунитета, такие как макрофаги и нейтрофилы, которые продуцируют различные эффекторные молекулы, в том числе активные формы кислорода, металлопротеиназы, провоспалительные цитокины и хемокины (O'Shea et al., 2002). Кроме того, TNF активирует эндотелиальные клетки, способствует активации молекул адгезии и инфильтрации иммунными клетками сайта воспаления.

Важная функция TNF заключается в локальной активации свертывания крови в мелких кровеносных сосудах, для того чтобы ограничить пораженный участок от общего кровотока, тем самым предотвращая попадание возбудителя в другие органы (van der Poll et al., 1996). Однако при сепсисе, когда инфекция попадает в кровеносное русло, происходит резкое повышение системного уровня TNF, приводящее к развитию септического шока. Мыши с делецией TNF или TNFR1 устойчивы к септическому шоку, но оказались чувствительны к бактериальным инфекциям (Bean et al., 1999, Pfeffer et al., 1993, Rothe et al., 1993). Оказалось, что важной функцией TNF является участие в формировании гранулем при бактериальной инфекции *M. tuberculosis*, при этом экспериментально было показано, что TNF из Т-клеток, но не макрофагов, необходим для контроля хронической инфекции (Allie et al., 2013). Еще одной важной функцией TNF является его участие в формировании вторичных лимфоидных органов (Endres et al., 1999, Tumanov et al., 2010, Winsauer et al., 2014). Удаление TNF или TNFR1 приводит к нарушению развития Пейеровых бляшек (Kuprash et al., 2005, Neumann et al., 1996). Помимо этого, у мышей наблюдаются нарушения в развитии герминальных центров лимфатических узлов и селезенки, сниженное количество В-клеточных фолликулов и фолликулярных дендритных клеток (FDC) (Victoratos et al., 2006)). Оказалось, что важную роль в развитии FDC играет TNF из В-клеток, который через TNFR1 на FDC участвует в их поддержании, активации и экспрессии ими хемокинов и молекул адгезии (Tumanov, et al., 2010, Victoratos, et al., 2006). Помимо иммунных функций TNF может участвовать в регуляции кровяного давления (Kroetsch et al., 2017), функции почек (Mehaffey et al., 2017) и фибрилляции предсердий.

1.2. Роль TNF в развитии рака

Несмотря на то что TNF впервые был открыт благодаря своей противоопухолевой активности, его роль в развитии рака неоднозначна (Carswell et al., 1975). С одной стороны, TNF может ограниченно использоваться в терапии меланом и сарком конечностей методом изолированной перфузии, но его системное применение невозможно из-за высокой токсичности, связанной с индукцией воспаления. С другой стороны, существует много сведений, что TNF, наоборот, может приводить к развитию рака. Так, например, в модели рака яичника опухолевая линия, нокаутная по TNF, характеризовалась меньшей инвазивностью, высоким уровнем клеточной гибели и пониженной экспрессией провоспалительных медиаторов, таких как VEGF, IL-6, CCL-2 (Kulbe et al., 2007). Мыши, дефицитные по TNF, устойчивы к развитию папиллом и плоскоклеточной карциномы в экспериментальной модели химически индуцированного рака кожи (Moore et al., 1999). Мыши, дефицитные по TNFR1, при воздействии азоксиметана и декстрана сульфата натрия имели менее выраженные признаки рака толстой кишки: пониженное количество нейтрофилов, макрофагов, меньшие повреждения слизистой оболочки кишечника (Popivanova et al., 2008). В другом исследовании была показана роль TNF в модели гепатоклеточной карциномы, блокировка данного цитокина приводила к супрессии опухолевого роста (Pikarsky et al., 2004).

Неоднозначная роль TNF в развитии рака может объясняться наличием нескольких сигнальных путей. Так, высокие дозы экзогенно добавленного TNF могут приводить к геморрагическому некрозу опухоли за счет цитотоксического воздействия TNF через TNFR1 на кровеносные сосуды опухолевого микроокружения (Havell et al., 1988). В то же время проопухолевая роль TNF может объясняться активацией транскрипционного фактора NF-κB и поддержанием хронического воспаления. Активация NF-κB приводит к экспрессии генов, в том числе IL-6, IL-8, IL-18, хемокинов, циклооксигеназы, молекул адгезии и других медиаторов воспаления. Кроме того, известно, что NF-κB необходим для клеточной пролиферации, активации ключевых факторов клеточного цикла (Cyclin-D1, c-Myc) и антиапоптотических белков (c-FLIP, BCL-2, cIAPs). Так, описано, что конститутивная экспрессия NF-κB в опухолевых клетках за счет tmTNF/TNFR2 сигнального пути обеспечивает их выживание (Zhang et al., 2008). Помимо этого, в последнее время появляются данные, что TNF необходим для миелоидных супрессорных клеток, особой популяции клеток, обеспечивающих супрессорное микроокружение опухоли.

Миелоидные супрессорные клетки (MDSC).

Миелоидные супрессорные клетки - гетерогенная популяция незрелых миелоидных клеток, способная подавлять противоопухолевый иммунный ответ. В норме незрелые миелоидные клетки под воздействием факторов роста дифференцируются в моноциты, гранулоциты или дендритные клетки. В патологических условиях, таких как воспаление, инфекции или раковые заболевания, происходит накопление незрелых миелоидных клеток за счет ингибирования их дифференцировки (Gabrilovich 2017). MDSC характеризуются ко-экспрессией поверхностных маркеров CD11b и Gr-1. На данный момент выделяют две субпопуляции MDSC: гранулоцитарную фракцию $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{low}$, продуцирующую высокий уровень ROS и низкий уровень NO, и моноцитарную $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$, экспрессирующую высокий уровень NO. При этом обе популяции экспрессируют аргиназу (Youn et al., 2008). У человека MDSC характеризуются экспрессией следующих маркеров: $LIN^-HLA-DR^-CD33^+CD11b^+$, но при различных видах рака они могут экспрессировать и дополнительные маркеры. К примеру, было показано, что моноцитарная фракция экспрессирует CD14, а гранулоцитарная – CD15 или CD66b (Gabrilovich 2017, Trikha et al., 2014).

Функции MDSC

Миелоидные супрессорные клетки ингибируют иммунный ответ через межклеточные взаимодействия с помощью различных молекул, синтезируемых на поверхности клетки, и короткоживущих медиаторов (Рис.3).

Во-первых, миелоидные супрессорные клетки могут ингибировать пролиферацию Т-клеток за счет локального снижения концентрации аминокислот аргинина и цистеина. MDSC активно производят ферменты аргиназу (Arg1), который конвертирует аргинин в орнитин и мочевину, и iNOS, конвертирующий аргинин в NO и цитруллин. Кроме того, MDSC активно метаболизируют предшественник цистеина. Недостаток аргинина и цистеина в сайте воспаления приводит к снижению Т-клеточной пролиферации, подавлению экспрессии CD3ζ-цепей комплекса TCR и снижению активации Т-клеток (Rodriguez et al., 2005, Srivastava et al., 2010).

Во-вторых, MDSC продуцируют активные формы кислорода и азота за счет работы NADPH-оксидазы и iNOS. К примеру, пероксинитрит, образованный за счет химической реакции между супероксид анион-радикалом и оксидом азота (NO), приводит к нитрованию и нитрозилированию различных аминокислот, тем самым создавая их

недостаток в сайте воспаления. Кроме того, он модифицирует компоненты TCR-комплекса, то есть непосредственно изменяет его структуру, и тем самым влияет на взаимодействие Т-клеточного рецептора с МНС, что в итоге может приводить к ингибированию специфического Т-клеточного ответа на опухолевый антиген. Активные формы кислорода могут приводить к подавлению экспрессии CD3 ζ -цепей комплекса TCR и различных цитокинов (Schmielau et al., 2001). Так, было показано, что NO блокирует IL-2 сигнальный путь и приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток (Mazzoni et al., 2002).

В-третьих, MDSC могут влиять на миграцию и жизнеспособность Т-клеток. MDSC экспрессируют на своей плазматической мембране молекулу ADAM17, которая способна расщеплять внешний домен CD62L за счет своей протеазной активности. CD62L- важная молекула адгезии, благодаря которой наивные лимфоциты могут попасть в лимфатические узлы и под воздействием антигена дифференцироваться в активированные клетки. Кроме того, CD62L позволяет наивным лимфоцитам попасть в сайт воспаления, например, в опухолевое микроокружение, где лимфоциты также могут активироваться. Таким образом, удаляя CD62L, MDSC способны предотвращать активацию наивных Т-клеток и блокировать их перемещение в сайт воспаления (Hanson et al., 2009). MDSC с помощью активных форм азота способны нитрозировать хемокин CCL2, модификация которого препятствует инфильтрации CD8⁺Т-клеток в опухолевую ткань (Molon et al., 2011).

В-четвертых, MDSC могут ингибировать функции NK-клеток, которые в свою очередь участвуют в противоопухолевом иммунном ответе. К примеру, гранулоцитарная субпопуляция миелоидных супрессорных клеток, обладающая CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻ фенотипом, непосредственно взаимодействует с NK-клетками и приводит к ингибированию экспрессии NKG2D рецептора в модели 4T1 перевиваемой опухоли (Elkabets et al., 2010). Другие исследователи показали, что MDSC могут уменьшать цитотоксичность NK-клеток, продукцию IFN- γ , а также экспрессию NKG2D через мембранносвязанный TGF- β (Li et al., 2009). У пациентов с гепатоклеточной карциномой также был отмечен вклад миелоидных супрессорных клеток в ингибирование функций NK-клеток. CD14⁺(HLA)-DR^{-low} клетки уменьшают цитотоксичность NK-клеток, ингибируют секрецию IFN- γ через межклеточное взаимодействие лигандов MDSC с рецептором NKp30 NK-клеток (Hoechst et al., 2009).

Еще один механизм поддержания опухолевой прогрессии связан с индукцией и экспансией Т-регуляторных клеток. В различных моделях авторы показали, что MDSC

способны к индукции Treg как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что MDSC, стимулированные IFN- γ , усиленно экспрессируют IL-10 и TGF- β , которые важны для индукции и активации Treg. Позже те же авторы показали, что MDSC, стимулированные IFN- γ , регулируют экспрессию CD40 и межклеточное взаимодействие CD40⁺MDSC с CD40L⁺ T-клетками в присутствии IL-10 и TGF- β , что приводит к экспансии и активации Treg клеток (Guiducci et al., 2005, Huang et al., 2006).

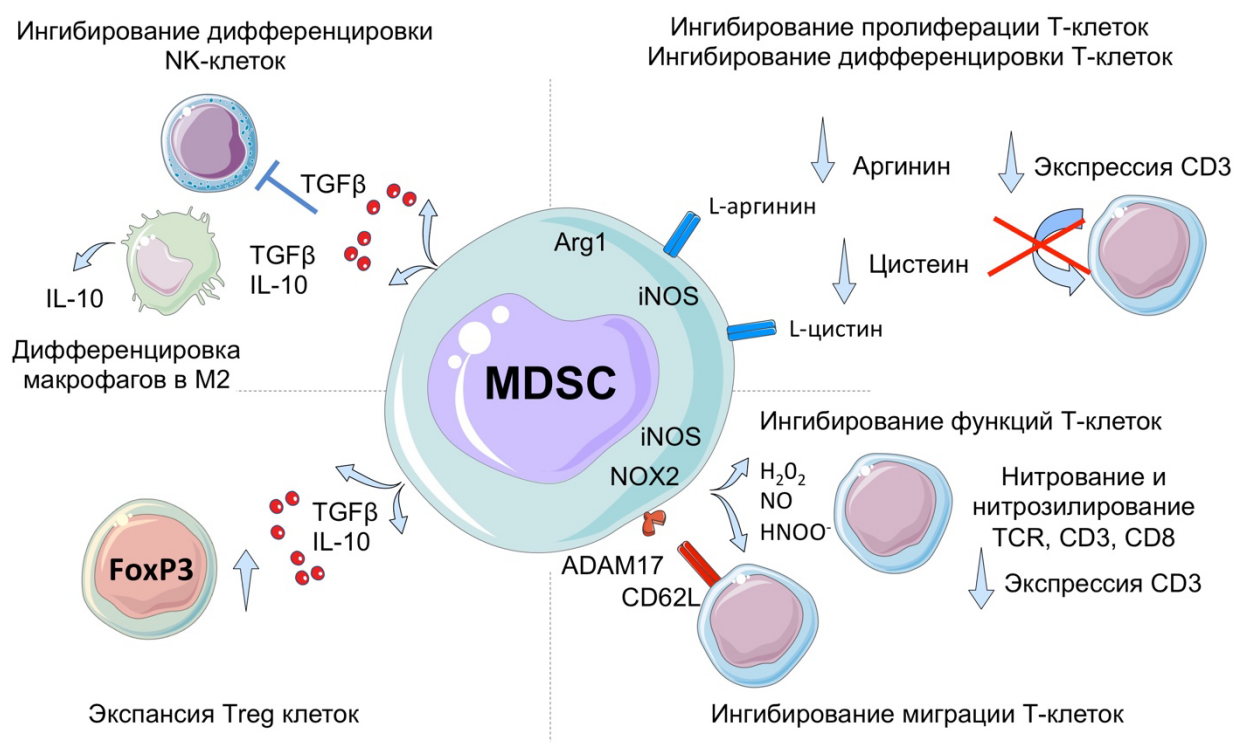


Рисунок 3. Механизмы ингибирования иммунного ответа миелоидными супрессорными клетками.

Миелоидные супрессорные клетки способны ингибировать клетки врожденного и адаптивного иммунитета различными способами. MDSC могут продуцировать противовоспалительные цитокины, такие как TGF- β и IL-10, приводящие к индукции M2 макрофагов, Т-регуляторных клеток, а также к ингибированию NK-клеток. MDSC могут подавлять Т-клеточный иммунный ответ за счет продукции аргиназы и iNOS, которые приводят к нехватке аргинина в сайте воспаления, уменьшению пролиферации Т-клеток и подавлению экспрессии CD3 комплекса. MDSC способны поглощать предшественник цистеина, тем самым уменьшая локальное содержание этой аминокислоты, недостаток которой приводит к ингибированию активации Т-клеток. Активные формы азота и кислорода, которые вырабатываются MDSC, способны изменять структуры CD3, CD8, TCR комплексов, что в итоге влияет на распознавание антигена Т-клеточным рецептором и передачу сигналов через костимуляторные молекулы. MDSC способны блокировать миграцию наивных Т-клеток в лимфоузлы и в сайты воспаления.

Таким образом, в процессе канцерогенеза наблюдается тесная взаимосвязь между клетками врожденного и адаптивного иммунитета с опухолевыми клетками. Формируется так называемое опухолевое микроокружение, представленное большим количеством клеток иммунной системы, которые вместо индукции противоопухолевого иммунного ответа способствуют опухолевой прогрессии (Atretkhany et al., 2016, Korneev et al., 2017). Миелоидные клетки являются важным компонентом микроокружения опухоли. Запуская различные сигнальные пути, они поддерживают жизнеспособность опухолевых клеток, способствуют их пролиферации, подавляют иммунный ответ против раковых клеток, приводят к ангиогенезу, метастазированию и разрастанию опухолевой ниши.

Несмотря на то что MDSC впервые были обнаружены у больных раком, а также у мышей, подверженных экспериментальному канцерогенезу, было показано, что их накопление происходит и при различных инфекциях (Gabrilovich et al., 2009). Так, например, при введении *Mycobacterium tuberculosis* в полном адьюванте Фройнда (Wang et al., 2010), при острой инфекции *Trypanosoma cruzi*, в модели воспаления с введением БЦЖ (Sade-Feldman et al., 2013), при острой и хронической инфекции *Listeria monocytogenes* и *Leishmania major*, а также при полимикробном сепсисе наблюдается системное накопление MDSC (Delano et al., 2007).

Накопление этих клеток наблюдается и в мышинных моделях аутоиммунных заболеваний, таких как артрит, рассеянный склероз, диабет (Fujii et al., 2013, Ioannou et al., 2012, Yin et al., 2010). В экспериментальной модели рассеянного склероза у мышей происходит увеличение количества MDSC. При этом показано, что эти клетки в процессе заболевания могут проходить через гематоэнцефалический барьер и накапливаться в центральной нервной системе (Zhu et al., 2007). Кроме того, MDSC не только ингибируют Т-клетки, вызывают экспансию Treg клеток, обеспечивают супрессорное микроокружение, но и участвуют в контроле Th17 клеток, которые играют ключевую роль в развитии EAE (Ioannou, et al., 2012).

В другом исследовании было показано, что гранулоцитарная популяция MDSC ингибирует рекрутирование и локальную пролиферацию В-клеток в ЦНС, тем самым снижая клинические симптомы EAE (Knier et al., 2018).

Таким образом, существует множество данных, что аккумуляция MDSC происходит не только в результате опухоль-ассоциированного воспаления, но и в других воспалительных процессах, сопряженных с инфекциями и аутоиммунными патологиями.

Роль TNF в развитии MDSC

Недавние исследования показали, что TNF важен для развития и активации миелоидных супрессорных клеток. Zhao et al. обнаружили, что перевиваемые опухолевые линии могут отторгаться при их введении TNF-дефицитным мышам, а регрессия опухоли коррелирует с замедленной динамикой развития миелоидных супрессорных клеток. В своей работе авторы показали, что снижение накопления MDSC обусловлено их гибелью. Оказалось, что TNF/TNFR2 сигнальный путь необходим для выживания MDSC за счет экспрессии антиапоптотических белков (Zhao et al., 2012).

В другом исследовании авторы показали, что MDSC экспрессируют TNFR2 на высоком уровне. При этом, именно tmTNF, но не sTNF, оказался важен для активации супрессорных функций MDSC. Кроме того, авторы заметили, что сами опухоли, экспрессирующие только tmTNF, растут более агрессивно, чем те, которые экспрессировали только sTNF (Hu et al., 2014). Другая группа исследователей также подтвердила значимость сигнального каскада, опосредуемого TNFR2, в регуляции MDSC. Так, MDSC, полученные из мышей, дефицитных по TNFR2, характеризуются пониженной экспрессией NO, необходимого для супрессорной активности MDSC, и IL-6 (Sander et al., 2010). Еще одна группа исследователей продемонстрировала, что TNF блокирует дифференцировку и усиливает супрессорные свойства MDSC в экспериментальной модели хронического воспаления. С появлением все большего количества данных о том, что TNF необходим для развития и функционирования MDSC, авторы исследования рассмотрели вопрос и о влиянии системной анти-TNF терапии на работу миелоидных супрессорных клеток, применяя фармакологическую блокировку TNF с помощью препарата – Этанерцепт, единственного клинически применяемого блокатора, нейтрализующего TNF мыши. Системная анти-TNF терапия подтвердила результаты, полученные на мышах с полным нокаутом по TNF. При фармакологической блокировке TNF происходило уменьшение содержания MDSC, подавление их супрессорной активности, уменьшение концентрации активных форм кислорода и азота, ускорение дифференцировки MDSC в другие клетки миелоидного ряда, восстановление работы T- и NK-клеток, что в итоге приводило к уменьшению признаков воспаления (Sade-Feldman, et al., 2013). В другом исследовании для MDSC была показана аутокринная регуляция TNF, необходимая для поддержания иммуносупрессорной активности за счет повышения экспрессии Nos2 (Schroder et al., 2018). Кроме того, было показано, что TNF необходим для развития гранулоцитарной популяции MDSC (Bauswein et al., 2018). MDSC, экспрессирующие TNFR2, могут участвовать в развитии метастазов. Так, мыши с

генетическим удалением TNFR2, характеризовались снижением метастазирования легочной карциномы Льюиса в печень, меньшим накоплением MDSC в печени, а также снижением их супрессорных функций. Интересно, что адоптивный перенос TNFR2⁺MDSC в нокаутных по TNFR2 мышей приводил к развитию метастатической болезни, как и у мышей дикого типа (Ham et al., 2015).

Таким образом, TNF является важным фактором для развития, пролиферации и выживании MDSC. Кроме того, именно TNF/TNFR2 сигнальный путь необходим для поддержания иммуносупрессорных функций MDSC. Результаты фармакологической нейтрализацией TNF в экспериментальной модели хронического воспаления указывают на возможность использования анти-TNF терапии для подавления супрессорных функций MDSC.

1.3. Роль TNF в развитии аутоиммунных заболеваний

Хроническое воспаление характерно не только для развития раковых заболеваний, но также является причиной проявления клинических симптомов аутоиммунных заболеваний. TNF – ключевой провоспалительный цитокин, нарушенная регуляция которого характерна для ряда аутоиммунных заболеваний. При этом системные блокаторы TNF широко применяются в терапии ревматоидного артрита, псориаза и воспалительных заболеваний кишечника (IBD) (Winsauer, et al., 2014). При чрезмерной продукции TNF происходит активация многих иммунных клеток, в частности, макрофаги и нейтрофилы могут выделять активные формы кислорода, продуцировать провоспалительные цитокины и хемокины. В ответ на TNF и хемокины происходит увеличение инфильтрации иммунными клетками сайта воспаления за счет активации эндотелиальных клеток и молекул адгезии (O'Shea, et al., 2002). При развитии ревматоидного артрита иммунные клетки инфильтрируют синовиальную оболочку суставов, где секретируют различные провоспалительные цитокины, хемокины, простагландины и тд. Кроме индукции воспаления, TNF может привлекать и активировать остеокласты, участвующие в резорбции кости, при этом ингибировать функцию остеобластов, ответственных за костную регенерацию (Udagawa et al., 2002). Трансгенные мыши с повышенной продукцией TNF характеризуются развитием спонтанного полиартрита и воспаления в кишечнике (Kontoyiannis et al., 1999). При этом повышенная продукция TNF только эпителиальными клетками кишечника может приводить к развитию воспаления и симптомов IBD у мышей в возрасте 16-20 недель (Roulis et al., 2011). А повышенная продукция TNF миелоидными клетками или T-

клетками, но не В-клетками, приводит к развитию клинических симптомов IBD у мышей в возрасте 5 месяцев (Kontoyiannis et al., 2002). На данный момент существуют различные классы блокаторов TNF, успешно применяющихся в терапии аутоиммунных заболеваний. Однако такая терапия имеет побочные эффекты, связанные с тем, что TNF, помимо своей ключевой роли в воспалении, обладает и важными иммунорегуляторными свойствами. К примеру, для пациентов на анти-TNF терапии характерны такие побочные эффекты, как анемия, реактивация туберкулеза и демиелинизация. Более того, системная нейтрализация TNF оказалась неуспешной в лечении рассеянного склероза (TLS group, 1999).

Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (РС) – хроническое нейровоспалительное заболевание, характеризующееся разрушением миелиновой оболочки нервных волокон спинного и головного мозга, нейродегенерацией и последующим нарушением проводимости нервных импульсов (Dendrou et al., 2015). Болезнь возникает в молодом и среднем возрасте и имеет широкий спектр неврологических симптомов заболевания за счет поражения различных участков центральной нервной системы (Compston et al., 2008). Основным признаком заболевания является скопление очагов демиелинизации, вызванное нарушением гематоэнцефалического барьера, инфильтрацией ЦНС эффекторными клетками иммунной системы и локальным воспалением (Hemmer et al., 2015). Клинические симптомы заболевания характеризуются нарушением таких процессов, как зрение, речь, чувствительность гладкой и поперечнополосатой мускулатуры, нарушение когнитивных функций и других (Dendrou, et al., 2015). Механизм развития заболевания до конца не изучен, существуют различные факторы, такие как генетическая предрасположенность, а также факторы внешней среды, влияющие на патогенез РС. При этом, нарушенная регуляция иммунного ответа также характерна для патогенеза РС. Так, в клинике у пациентов с РС наблюдается повышенное содержание различных провоспалительных цитокинов и хемокинов в спинномозговой жидкости (CSF) (Burman et al., 2014, Khaibullin et al., 2017). Механизмы развития РС активно изучаются в экспериментальных моделях этого заболевания у мышей.

Наиболее общепринятой мышинной моделью рассеянного склероза считается экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE). Индукцию заболевания осуществляют разными способами: при пассивной индукции производят адоптивный перенос Т-клеток из иммунизированных мышей в наивных, при активной - иммунизация нейроантигенами, к примеру, MOG (myelin oligodendrocyte protein), MBP (myelin basic

protein) или PLP (proteolipid protein), в адьюванте Фрейнда. Для увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера и дальнейшей инфильтрации ЦНС иммунными клетками осуществляют введение коклюшного токсина (Constantinescu et al., 2011).

Развитие заболевания можно разделить на несколько этапов: инициация, миграция и эффекторная фаза. На первом этапе происходит представление антигена антиген-презентирующими клетками и последующая дифференцировка наивных Т-клеток в патогенные Th17, Th1 или T_{GM-CSF} клетки, производящих IL-17A, IFN- γ и GM-CSF, соответственно, в зависимости от провоспалительного микроокружения (Korn et al., 2017). При этом действие провоспалительных цитокинов приводит к ингибированию Th2 и T-регуляторных клеток (Heink et al., 2017). После индукции эффекторных клеток адаптивного иммунитета, происходит их миграция в ЦНС, для этого под действием провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF, происходит активация сосудистого эндотелия, повышается экспрессия молекул адгезии, секреция хемокинов и их рецепторов. Т-клетки могут мигрировать в ЦНС за счет взаимодействия интегрина $\alpha 4\beta 1$ на Т-клетках с молекулами адгезии ICAM-1 и VCAM-1 на эндотелиальных клетках. Для Т-регуляторных и Th17 клеток характерна миграция в ЦНС за счет CCR6-CCL20 сигнального пути (Sonar et al., 2017). Далее в ЦНС происходит реактивация Т-клеток в ответ на презентацию антигена дендритными клетками (Mundt et al., 2019). В дальнейшем патогенные Т-клетки продуцируют GM-CSF, IFN- γ , IL-17A, что приводит к инфильтрации эффекторных клеток врожденного иммунитета и активации резидентных клеток мозга. В свою очередь резидентные клетки мозга, такие как астроциты, микроглия, а также инфильтрирующие моноциты и нейтрофилы могут производить различные провоспалительные цитокины, активные формы кислорода и азота, тем самым способствуя повышению уровня воспаления и дальнейшей демиелинизации и повреждению нейронов (Рис.4).

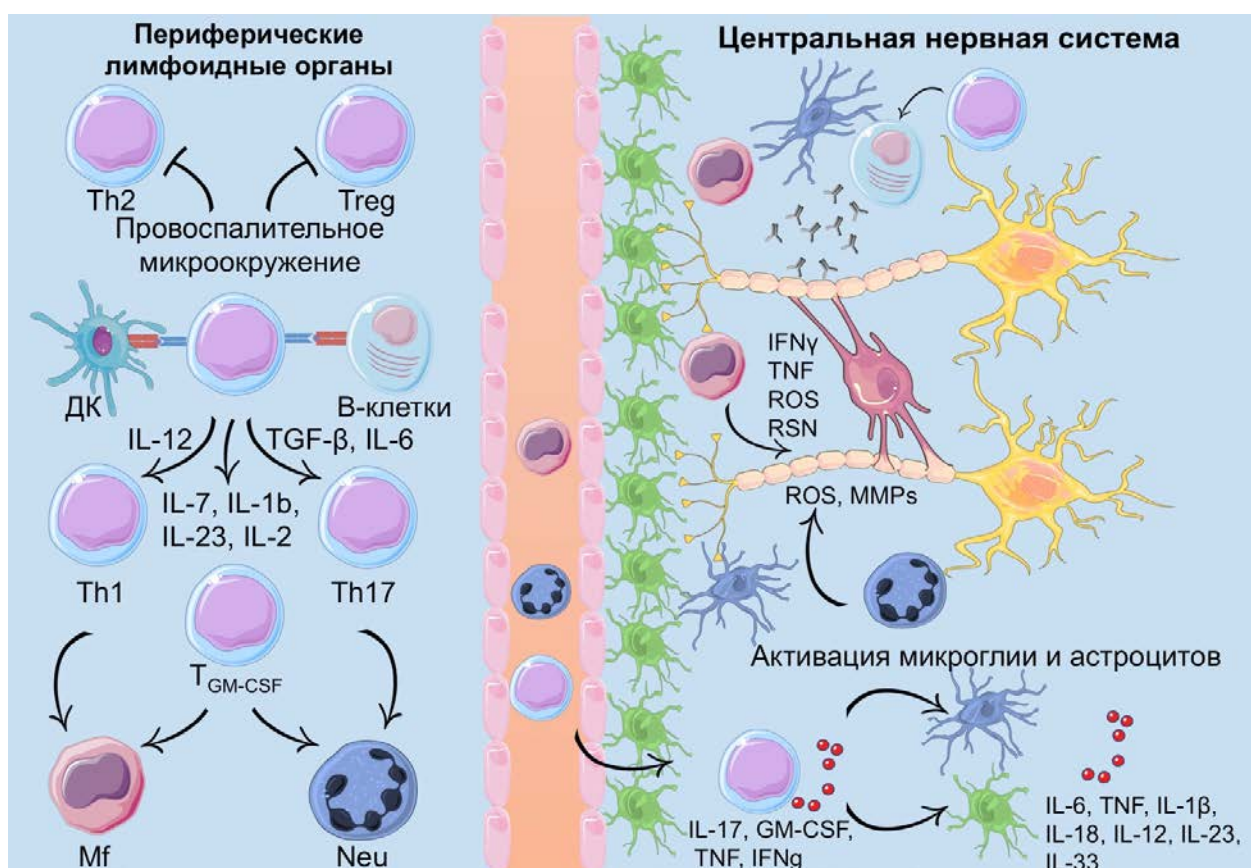


Рисунок 4. Развитие нейровоспаления

В периферических лимфоидных органах происходит представление антигена наивным Т-клеткам, которые под действием IL-12 и IL-6 в комбинации с TGF-β дифференцируются в Th1 и Th17 клетки, соответственно. Под действием цитокинов IL-7, IL-1β, IL-23 и IL-2 происходит поляризация наивных Т-клеток в T_{GM-CSF}. Под действием провоспалительного микроокружения происходит ингибирование Th1 и Treg клеток, а также повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера. Патогенные Т-клетки мигрируют в ЦНС, где в дальнейшем происходит их реактивация, и последующее привлечение миелоидных клеток, таких как макрофаги и нейтрофилы, и активация резидентных клеток мозга, таких как астроциты и микроглия. Инфильтрирующие иммунные клетки, а также резидентные клетки, вырабатывают активные формы кислорода, азота, металлопротеиназы, провоспалительные цитокины и другие эффекторные молекулы, приводящие к гибели олигодендроцитов, демиелинизации и последующему повреждению аксонов нейронов.

Роль TNF в патогенезе РС и ЕАЕ

Роль TNF в развитии рассеянного склероза неоднозначна. У пациентов с РС наблюдается повышенное содержание провоспалительных цитокинов, в том числе и TNF (Burman, et al., 2014, Khaibullin, et al., 2017). Однако клинические испытания блокатора Lenercept, представляющего собой слитный из двух молекул растворимой формы TNFR1

и Fc части IgG1 человека, в рассеянном склерозе были приостановлены из-за усиления клинических симптомов и демиелинизации у пациентов на анти-TNF терапии (TLS group, 1999). Интересно, что в более поздних исследованиях с использованием метода полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) был выявлен однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене TNFRSF1A, кодирующем TNFR1, ассоциированный с развитием рассеянного склероза, но не других аутоиммунных заболеваний, таких как артрит, IBD или псориаз. Оказалось, что этот полиморфизм rs1800693 приводит к экспрессии растворимой формы TNFR1 (sTNFR1), которая может, наоборот, блокировать действие TNF (Gregory et al., 2012). Таким образом, генетические данные согласуются с результатами, полученными из клинических испытаний, и указывают о возможной протективной роли TNF при РС.

Роль TNF в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита также неоднозначна и зависит от типа клеток, продуцирующих этот цитокин, и от рецептора, участвующего в сигнальном пути. Так, было показано, что растворимая форма TNF (sTNF) и активация TNFR1-сигнального пути могут приводить к развитию EAE (Eugster et al., 1999, Steeland et al., 2017), тогда как трансмембранная форма TNF (tmTNF) и TNFR2 играют протективную роль в развитии нейровоспаления (Alexoroulou et al., 2006, Ruuls et al., 2001, Tsakiri et al., 2012). В недавних исследованиях была показана детальная роль TNFR2 в развитии EAE. Так, при использовании мышей с кондиционным удалением TNFR2, была обнаружена протективная функция TNFR2 на олигодендроцитах. Оказалось, что TNFR2-сигнальный путь необходим для пролиферации предшественников олигодендроцитов, которые в свою очередь участвуют в процессах ремиелинизации (Madsen et al., 2016). В другом исследовании было показано, что удаление TNFR2 на клетках микроглии приводит к усилению инфильтрации ЦНС и возникновению клинических симптомов на более ранних этапах, тогда как генетическая инактивация TNFR2 на моноцитах, наоборот, снижает симптомы заболевания, демиелинизацию и инфильтрацию ЦНС (Gao et al., 2017). Также была изучена роль TNF из различных клеточных источников. Так, TNF из моноцитов и макрофагов, но не из микроглии, необходим для инициации EAE, а TNF из Т-клеток может участвовать в контроле Т-клеточного иммунного ответа на периферии (Kruglov et al., 2011, Wolf et al., 2017). В то время как функции TNFR2 на миелоидных клетках были частично исследованы, роль TNFR2 на Т-клетках, в особенности Treg клетках, малоизучена.

Т-регуляторные клетки

Регуляция иммунной системы является важным процессом, необходимым для поддержания гомеостаза в организме. Надлежащий контроль воспаления и осуществления эффекторных функций необходимы, с одной стороны, для эффективной нейтрализации действия патогенов, с другой – для предотвращения аутоиммунных проявлений.

Т-регуляторные клетки (Treg) - субпопуляция Т-клеток, основная функция которых заключается в индукции анергии на собственные антигены, а также контроле силы и продолжительности иммунного ответа против чужеродных антигенов (Lu et al., 2017). Treg клетки могут развиваться как в тимусе (tTreg) при сильном и непродолжительном взаимодействии TCR с антигеном в комплексе с МНС, так и на периферии (pTreg) из Т-клеток в присутствии антигена и супрессорного микроокружения (Tanoue et al., 2016). При этом они характеризуются экспрессией транскрипционного фактора FoxP3, который, в свою очередь, вместе с различными ко-факторами, которые могут быть как транскрипционными факторами, так и модификаторами хроматина, регулирует транскрипцию генов, ответственных за подавление и регуляцию иммунного ответа (Li et al., 2016).

FoxP3 - важный транскрипционный фактор для Treg клеток, мутации в гене FoxP3 могут приводить к развитию тяжелых иммунопатологий и аутоиммунных реакций как у мышей, так называемый *scurfy* фенотип, так и у людей - IPEX-синдром (Х-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии). Ген FoxP3 находится на Х-хромосоме, состоит из 11 экзонов, промотора, а также трех энхансеров: CNS1, CNS2, CNS3 (консервативные некодирующие последовательности). Индукция транскрипции и последующее поддержание экспрессии FoxP3 зависит от активности вышеперечисленных энхансеров. Так, для первичной индукции гена FoxP3 необходима активация CNS3 транскрипционным фактором REL при активации TCR (Feng et al., 2015). Активация CNS3 приводит к эпигенетическим модификациям и активации промотора FoxP3 и дальнейшей транскрипции гена. Далее происходит развитие Treg клеток и деметилирование энхансера CNS2, в том числе за счет IL-2-STAT5 сигнального пути. CNS2 может взаимодействовать с различными транскрипционными факторами, такими как FoxP3, RUNX1, NFAT и др, что приводит к стабильной экспрессии FoxP3, в том числе и при делении клетки (Zheng et al., 2010). В свою очередь, CNS1 необходим для индукции pTreg клеток, которые дифференцируются из Т-клеток на периферии. Дифференцировка наивных Т-клеток в Treg клетки происходит в несколько этапов: под воздействием чужеродного антигена может активироваться путь TCR-REL-CNS3, при этом необходима

активация TGF- β -SMAD3 и сигнального пути ретиноевой кислоты (Benson et al., 2007, Coombes et al., 2007). Факторы SMAD, RXR3/RAR взаимодействуют с CNS1, что приводит к индукции транскрипции FoxP3 (Tanoue, et al., 2016).

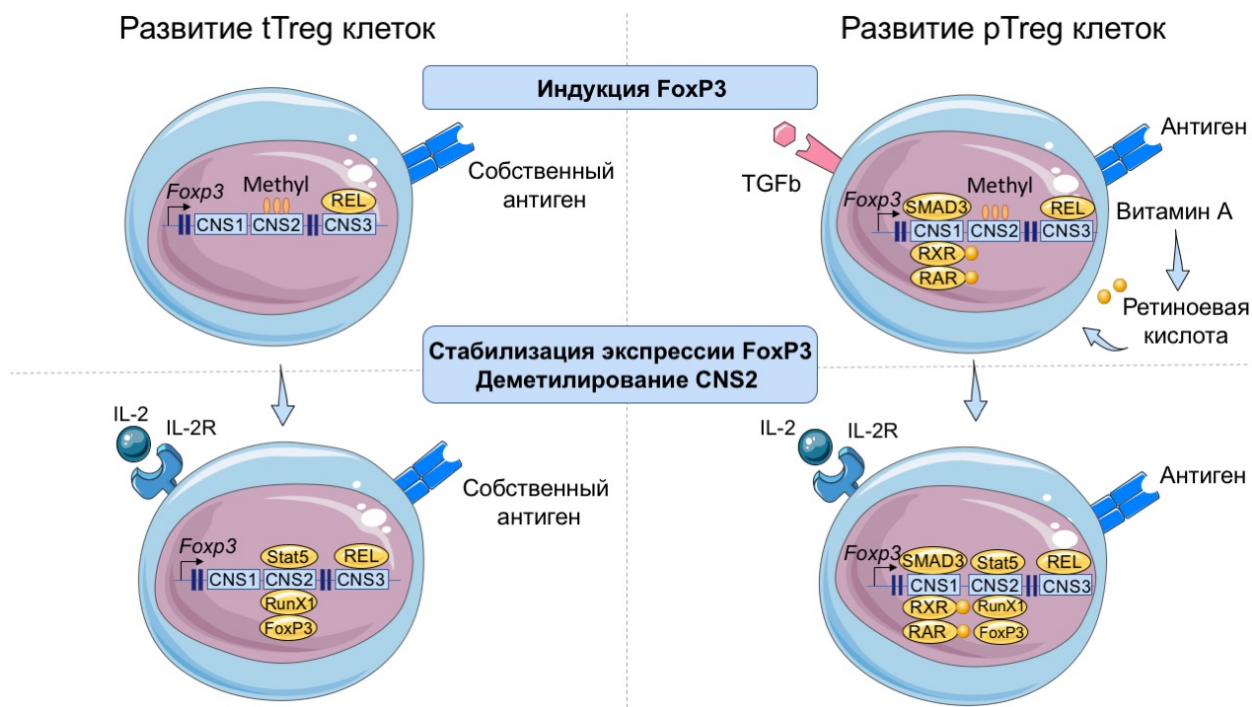


Рисунок 5. Развитие Treg клеток в тимусе и на периферии

Развитие tTreg клеток происходит в тимусе при сильном взаимодействии TCR на предшественниках Treg клеток с собственным антигеном в комплексе с MHC-II на mTEC (медуллярные тимусные эпителиальные клетки) или АПК. При сильной активации TCR комплекса активируется REL, который взаимодействует с CNS3 и приводит к экспрессии FoxP3. Далее происходит деметилирование участка CNS2 и взаимодействие с различными транскрипционными факторами для стабилизации и поддержания экспрессии FoxP3. Развитие pTreg происходит на периферии. Например, в кишечнике дифференцировка T-клеток в Treg клетки происходит за счет взаимодействия TCR с микробным антигеном в MHC-II в присутствии сигналов от TGF- β и ретиноевой кислоты. Далее происходит экспрессия FoxP3 за счет взаимодействия SMAD3, активированного TGF- β , и рецепторного комплекса ретиноевой кислоты RAR/RXR с CNS1, и REL с CNS3. Стабилизация экспрессии FoxP3 происходит за счет IL2-STAT5 сигнального пути. При этом микробные метаболиты, такие как бутират, участвуют в ремоделировании хроматина и деметилировании CNS2 за счет ингибирования гистондеацетилаз.

FoxP3 может активировать транскрипцию генов-мишеней различными способами: непосредственное взаимодействие FoxP3 с промотором гена (Рис.6А), опосредованное взаимодействие FoxP3 с транскрипционными факторами (Рис.6Б), индукция экспрессии

транскрипционных факторов и дальнейшее опосредованное взаимодействие с промотором (Рис.6В), а также взаимодействие с эпигенетическими модификаторами, которые способствуют связыванию комплексов FoxP3 и транскрипционных факторов генов-мишеней (Рис.6Г) (Kitagawa et al., 2013). Важными кофакторами FoxP3 являются транскрипционные факторы NFAT, RUNX1, IRF4, GATA3, REL, RORc и др. К примеру, взаимодействие FoxP3 с IRF4 необходимо для регуляции Th2 – иммунного ответа. FoxP3 также может подавлять транскрипцию генов. Показано, что взаимодействие FoxP3 с генами *Il2*, *Ifng* приводит к деацетилированию гистона H3. И наоборот, FoxP3 приводит к активации экспрессии молекул супрессии, как GITR, CD25, CTLA-4 за счет индукции ацетилирования гистонов вблизи участков промотора. Для FoxP3 показано взаимодействие с молекулами, участвующими в эпигенетических модификациях, в частности, с гистонацетилтрансферазами TIP60 и p300, а также гистондеацетилазой 7 (HDAC7) (Lee et al., 2018).

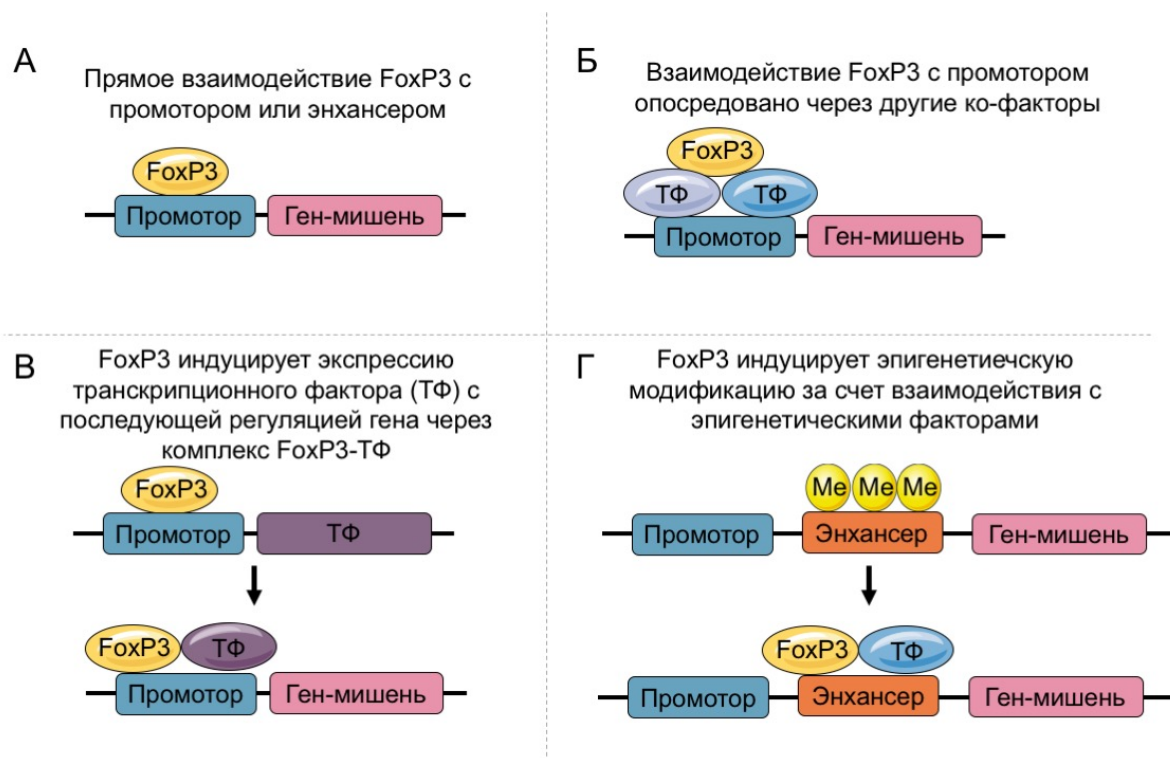


Рисунок 6. Схематическое изображение FoxP3-зависимой регуляции экспрессии генов

На рисунке представлено прямое (А) или опосредованное через другие ко-факторы (Б) взаимодействие FoxP3 с промотором гена-мишени. Также представлена регуляция экспрессии генов через экспрессию транскрипционного фактора гена-мишени (В), а также взаимодействие с эпигенетическими факторами (Г).

Функции Treg клеток

Treg клетки могут подавлять иммунный ответ разными способами (Рис.7).

Во-первых, они способны ингибировать взаимодействие антиген-презентирующих клеток (АПК) с Т-клетками за счет конкурентного связывания с МНС-II и CD80/86 на АПК через молекулы Lag-3 и CTLA-4 на Treg клетках, соответственно (Liang et al., 2008, Wing et al., 2008)

Во-вторых, Treg клетки могут продуцировать различные противовоспалительные цитокины, такие как IL-10, IL-35, TGF- β , которые, взаимодействуя с соответствующими рецепторами на поверхности клетки, способны ингибировать ее активацию и подавлять экспрессию провоспалительных факторов (Collison et al., 2007, Rubtsov et al., 2008, Shevach 2009).

В-третьих, Treg клетки способны подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток за счет ограничения факторов пролиферации или нарушения метаболических путей. К примеру, Treg клетки на более высоком уровне экспрессируют молекулу CD25, α -цепь IL-2 рецептора, необходимого для дифференцировки и клональной экспансии эффекторных Т-клеток (Chinen et al., 2016). Кроме того, они несут на своей поверхности молекулы CD39 и CD73, обладающие эктонуклеотидазной активностью, которые могут влиять на метаболизм Т-клеток. В частности, АТФ, являющийся источником энергии для многих биохимических реакций, гидролизует при взаимодействии с CD39 или CD73 на Treg клетках, а аденозин, образующийся в результате каталитической реакции, способен подавлять иммунный ответ (Deaglio et al., 2007).

В-четвертых, Treg клетки за счет продукции гранзимов могут приводить к клеточной смерти эффекторных Т-клеток (Gondek et al., 2005, Grossman et al., 2004). Кроме того, для Treg характерна коэкспрессия молекул для поддержания супрессорного фенотипа. Так, было показано, что молекула GITR необходима для активации NF- κ B сигнального пути, участвующего в стабилизации белка FoxP3 (Vasanthakumar et al., 2017). Кроме того, в недавнем исследовании было показано, что Treg клетки способны поддерживать гомеостаз жировой ткани с помощью специального фермента HPGD. В этом исследовании было обнаружено, что Treg клетки активно производят фермент HPGD, катаболизирующий простагландин E₂ (PGE₂) в метаболит 15-кето PGE₂, который через PPAR γ рецептор на конвенциональных Т-клетках приводит к их ингибированию (Schmidleithner et al., 2019).

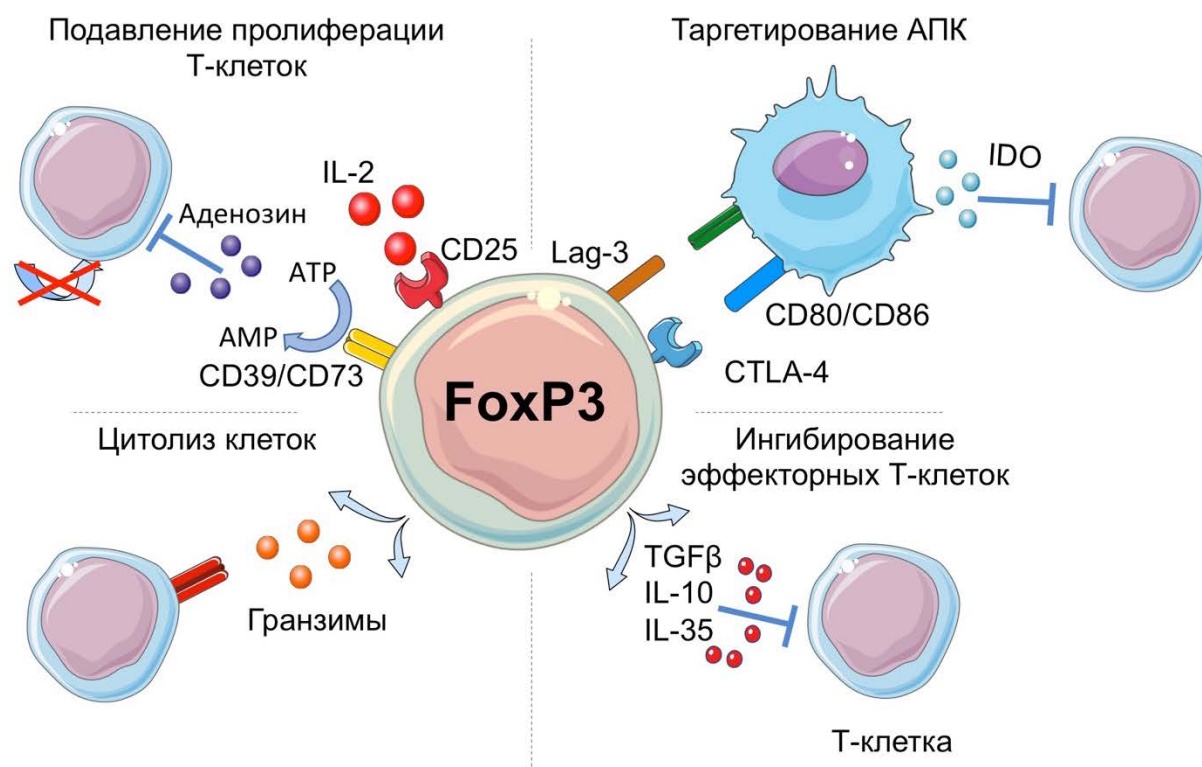


Рисунок 7. Механизмы ингибирования иммунного ответа Treg клетками.

Treg клетки имеют более высокую экспрессию молекулы CD25 (IL2R α) по сравнению с другими типами Т-клеток и конкурируют за взаимодействие с IL-2, недостаток которого приводит к снижению пролиферации Т-клеток. Treg клетки экспрессируют молекулы CD39 или CD73, катаболизирующие АТФ с выделением аденозина, ингибирующего пролиферацию Т-клеток. Treg клетки ингибируют АПК через CTLA-4, конкурируя с костимуляторной молекулой CD28 за взаимодействие с CD80 или CD86. При этом происходит экспрессия молекулы IDO, которая участвует в катаболизме триптофана и ингибирует пролиферацию Т-клеток. Treg клетки экспрессируют молекулу Lag3, взаимодействующую с МНС-II на ДК, что приводит к подавлению созревания ДК. Treg клетки могут продуцировать противовоспалительные цитокины, такие TGF β , IL-10, IL-35, участвующие в подавлении функций Т-клеток. Treg клетки могут продуцировать гранзимы А и В, участвующие в клеточном цитолизе

Роль TNF и NF- κ B в развитии Т-регуляторных клеток

Роль TNF в развитии Т-регуляторных клеток неоднозначна. Как ранее было подробно описано, TNF может приводить к активации транскрипционного фактора NF- κ B. Роль этого фактора в развитии Treg клеток достаточно исследована. Семейство NF- κ B состоит из 5 белков: p65 (RelA), c-Rel, p105/p50, p100/p52 и RelB. Активация NF- κ B может происходить по двум путям: канонический (классический) и неканонический (альтернативный). Ранее была рассмотрена активация канонического пути NF- κ B. В этом случае происходит фосфорилирование и последующая деградация I κ B, после чего

активный гетеродимер NF-κB, состоящий из молекул p65 или c-Rel, связанного с p50, транслоцируется в ядро. Тогда как неканонический (или альтернативный) сигнальный путь включает активацию NIK-киназы, которая приводит к процессированию молекулы p100 в активную форму p52, которая и образует активный гетеродимер с белком RelB. При этом как канонический, так и неканонический сигнальные пути NF-κB очень важны для развития Treg клеток, а генетическое удаление различных субъединиц NF-κB приводит к развитию воспаления и аутоиммунных реакций (Grinberg-Bleyer et al., 2018). Было выяснено, что канонический NF-κB участвует как в развитии Treg клеток, так и в поддержании их супрессорных свойств. Так, ранее было отмечено, что c-Rel необходим для развития Treg клеток в тимусе за счет взаимодействия с CNS3 и дальнейшей индукцией экспрессии FoxP3 в предшественниках T-регуляторных клеток (Isomura et al., 2009, Long et al., 2009). При этом генетическое удаление c-Rel в Treg клетках приводило к небольшому воспалению у мышей в возрасте 8-9 месяцев, заключающемся в экспансии и инфильтрации эффекторных T-клеток в неиммунных органах. В то же время удаление другой субъединицы канонического пути NF-κB, p65, в Treg клетках было более критичным и способствовало развитию сильного воспаления и последующей гибели мышей в возрасте от 5 до 15 недель. Авторы этой работы продемонстрировали, что p65 необходим для поддержания супрессорных свойств Treg клеток за счет непосредственного воздействия на экспрессию Treg-специфических генов. При этом гибель животных была ассоциирована с лимфопролиферативным синдромом, спленомегалией, инфильтрацией лимфоцитами неиммунных органов и экспансией эффекторных T-клеток (Oh et al., 2017). В другом исследовании было показано, что активация p65 в ответ на лиганды суперсемейства TNF необходима для поддержания супрессорных свойств эффекторных и тканеспецифических Treg клеток (Vasanthakumar, et al., 2017).

Таким образом, NF-κB сигнальный путь необходим для дифференцировки, активации и поддержания функции Treg клеток, при этом такие лиганды, как TNF и GITR, могут участвовать в их активации. Кроме того, стимулирование Treg клеток с помощью TNF усиливало их супрессорные свойства *in vitro* (Chen et al., 2007). В другом исследовании была показана роль TNFR2 в поддержании экспрессии FoxP3 в Treg клетках (Chen et al., 2013).

Однако существует ряд исследований, в которых, наоборот, показана роль TNF в ингибировании функций Treg клеток. К примеру, было обнаружено, что TNF может способствовать деградации FoxP3 через каспазу-8 (Gao et al., 2015). Valencia et al

наблюдали ингибирование экспрессии FoxP3 в Treg клетках в ответ на TNF. Кроме того, в этом исследовании было показано, что Treg клетки у пациентов с ревматоидным артритом имеют сниженную способность подавлять Т-клеточную пролиферацию, которая частично восстанавливается после анти-TNF терапии (Valencia et al., 2006). Также было показано, что анти-TNF терапия способствует восстановлению функций Treg клеток у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника и артритом (Boschetti et al., 2011, Nie et al., 2013).

Как ранее было отмечено, для Treg клеток характерна повышенная экспрессия TNFR2. При этом считается, что TNFR2 может служить маркером наиболее супрессорной популяции Treg клеток (Chen et al., 2010, Chen et al., 2008). Однако детально роль TNFR2 на Treg клетках пока не была изучена. Возможно, различное действие TNF на Treg клетки объясняется вовлеченностью двух разных рецепторов. Понимание этого процесса лежит в основе разработки новой более специфичной терапии, которая блокировала бы негативный эффект TNF при аутоиммунных заболеваниях, не затрагивая его протективную функцию на Treg клетках.

TNF и TNFR2 как мишени для терапии аутоиммунных и раковых заболеваний

Как ранее было отмечено, нейтрализация TNF активно используется в терапии аутоиммунных заболеваний, таких как болезнь Крона, псориаз, аутоиммунный артрит. В настоящий момент одобрены к применению пять блокаторов TNF: Инфликсимаб, Адалимумаб, Голимумаб, Этанерцепт и Цертолизумаб. Инфликсимаб — это химерное антитело, которое состоит из Fab фрагмента мыши и константного региона IgG1 человека. Адалимумаб и Голимумаб - полные человеческие антитела класса IgG1. Цертолизумаб представляет собой гуманизированный Fab фрагмент, химически связанный с полиэтиленгликолем. Этанерцепт — это слитный белок, состоящий из двух молекул TNFR2 и Fc части от IgG1 человека. Эти блокаторы отличаются не только структурой, но и механизмом ингибирования и, как следствие, дозировкой. При этом они связывают и нейтрализуют sTNF примерно с одинаковой эффективностью, хотя Этанерцепт представляет собой димер, и считается, что его эффективность связывания с тримерной формой sTNF может быть снижена, так как ранее было показано, что Этанерцепт менее эффективно блокирует tmTNF (Van Hauwermeiren et al., 2011). Кроме того, Этанерцепт единственный препарат, который кроме TNF связывает и растворимую форму лимфотоксина. Главной проблемой применения антицитокиновой терапии является системность воздействия, такие препараты неспецифически блокируют TNF, который выполняет и физиологическую, и патологическую функции. Поэтому такая терапия

обладает рядом побочных эффектов и нежелательных последствий. Кроме того, сами блокаторы, отличающиеся структурой, могут по-разному воздействовать на иммунную систему, к примеру, было показано, что введение Адалиумаба может приводить к экспансии Т-регуляторных клеток (Nguyen et al., 2016).

Для изучения действия различных блокаторов человека и тестирования их эффективности в терапии аутоиммунных заболеваний были созданы мышинные линии, гуманизированные по гену *TNF* (hTNF). Так, были получены трансгенные мыши с повышенной продукцией hTNF, которые спонтанно развивают хронический полиартрит (Keffer et al., 1991). Недостаток такой системы заключается в невозможности изучения действия блокаторов в других модельных заболеваниях, для которых анти-TNF терапия показала свою эффективность. В нашей лаборатории также были созданы мыши с гуманизацией гена *TNF*, с помощью гомологичной рекомбинации, позволившие изучить действие различных блокаторов TNF в мышинных моделях сепсиса, бактериальной инфекции (Efimov et al., 2016, Ollerios et al., 2015). Несмотря на свидетельства о возможном нарушении взаимодействия hTNF с mTNFR2 (Bossen et al., 2006), в данных модельных системах разницы в развитии заболеваний между мышами, гуманизированными по гену *TNF*, и диким типом не обнаружено. В дальнейшем в лаборатории были созданы мыши с дополнительной гуманизацией TNFR2, которые позволяют изучать действие агонистов или антагонистов hTNFR2. Схема гуманизации и получение мышей описаны в секции материалы и методы. Кроме того, существуют также мыши только с гуманизацией TNFR1 или TNFR2, в которых авторы продемонстрировали снижение нейровоспаления при использовании агониста TNFR2 в модели NMDA-индуцированной нейродегенерации (Fischer et al., 2018). Помимо этого, они показали эффективность активации TNFR2 в мышинной модели артрита, заключающуюся в экспансии Treg клеток и снижении клинических симптомов заболевания. При этом, агонизм TNFR2 также показал эффективность в мышинной модели травмы ЦНС за счет улучшения двигательной активности при активации TNFR2 (Gerald et al., 2019). В качестве агониста был использован реагент EHD2-scTNF_{R2}, представляющий собой гексамер TNF, олигомеризованный с помощью CH2 домена IgE. Другой группой ученых был использован схожий подход в активации TNFR2 с использованием реагентов STAR2 или TNCscTNF80, представляющего собой нонамер TNF, олигомеризованный с помощью tenascin-C. В мышинной модели заболевания трансплантат против хозяина (GvHD) профилактическое введение агониста TNFR2 приводило к экспансии Treg клеток и увеличивало выживаемость мышей (Chopra et al., 2016). Авторы также

продемонстрировали эффективность агониста TNFR2 в мышинной модели артрита, заключающуюся в снижении клинических симптомов и воспаления в суставах (Lamontain et al., 2019). При этом эффект антагонистов TNFR2 на рост и развитие рака активно изучается в экспериментальных моделях на мышах, а также на опухолевых клетках из пациентов *in vitro*. Так, было обнаружено, что нейтрализация TNFR2 совместно с активацией рецептора врожденного иммунитета TLR-9 ингибирует рост перевиваемой опухоли кишечника CT26, а антагонисты hTNFR2 приводят к ингибированию пролиферации раковых клеток яичников и Т-клеточной лимфомы (Torrey et al., 2017, Torrey et al., 2019).

Таким образом, на данном этапе роль TNF и TNFR2 в развитии супрессорного микроокружения активно изучается. В нескольких модельных системах было показано что TNF/TNFR2 сигнальный путь может представлять собой потенциальную мишень для терапии аутоиммунных и раковых заболеваний. При этом использование мышей гуманизированных по гену *TNF*, позволяет изучать эффект нейтрализации TNF с помощью клинических блокаторов на рост опухоли и его микроокружение. В то время как функции TNFR2 в развитии MDSC были показаны в более ранних работах, роль TNFR2 на Treg клетках неоднозначна и требует дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные.

Работу проводили на мышах в возрасте 8-12 недель дикого типа (C57BL/6), гуманизированных по гену *TNF* (hTNFKI), дважды гуманизированных мышах по *TNF* и *TNFR2* (hTNFKI x hTNFR2KI) и дважды гуманизированных по *TNF* и *TNFR2* с делецией *TNFR2* в Treg клетках (hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTreg}) на генетической основе C57BL/6. Животных разводили и содержали в «specific pathogen free» (SPF) условиях на базе питомника для лабораторных животных SPF-категории «Пушино», ФИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Гуманизированные мыши по гену *TNF* были созданы с помощью метода гомологичной рекомбинации по стандартному протоколу, где мышинный ген *TNF* был полностью заменен на ген *TNF* человека (Olleros, et al., 2015).

Гуманизация рецептора также осуществлялась методом гомологичной рекомбинации, в этом случае происходила частичная гуманизация экзонов 2-6 гена *TNFR2*, ответственных за кодирование внеклеточных участков *TNFR2*, необходимых для взаимодействия с hTNF. Кроме того, происходило дополнительное внесение loxP сайтов для дальнейшего Cre-зависимого вырезания *TNFR2*. При такой схеме гуманизации мышинная внутриклеточная часть, необходимая для передачи сигнала, сохраняется.

Гомозиготные hTNFR2KI мыши были скрещены с ранее полученными hTNFKI мышами с последующим выводением гомозиготной линии мышей, гуманизированных по генам *TNF* и *TNFR2*. Кроме того, путем скрещивания с линией мышей, несущих Cre-рекомбиназу под контролем промотора FoxP3, были получены мыши с удалением hTNFR2 в Treg клетках.

Все манипуляции с мышами выполняли согласно правилам работы с лабораторными животными, утвержденным в Федерации Европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA).

Генотипирование.

Генетический материал выделяли из образцов хвоста или ушей с использованием протеиназы К. Генотипирование мышей осуществляли методом ПЦР по стандартному протоколу с использованием праймеров, указанных в Таб.1

Таблица 1. Список праймеров, использованных для генотипирования мышей

Allele	Name	Sequence	Fragment length
hTNFR2 KI	hTNFR2KI-FW	5'-cagagagaacccagaggagg-3'	203bp
	hTNFR2KI-RV	5'-accctagtcattgtctgcagg-3'	
mTNFR2 WT	hTNFR2KI-FW	5'-cagagagaacccagaggagg-3'	476bp
	mTNFR2-RV	5'-ggcactcgtacccagggtcc-3'	
hTNFR2 KO	hTNFR2KI-FW	5'-cagagagaacccagaggagg-3'	303bp
	hTNFR2KO-RV	5'-gagactcaactcttctacacttg-3'	
FoxP3-Cre	FoxP3-Cre-FW	5'-ctgcttccttcacgacattcaac-3'	368bp
	FoxP3-Cre-RV	5'-aagtgccttggtgcgagtgagagc-3'	
hTNF-KI/WT	hTNFKI 1	5'-atgtaccgcagtcgaagatag-3'	335bp (KI)
	hTNFKI 2	5'-ttgagtcctgaggcctgtgtt-3'	472bp (Wt)
	hTNFKI 3	5'-tggtgtataggaccctgagaa-3'	

Модель МСА 205 фибросаркомы.

Протокол культивирования клеточной линии был адаптирован из статьи (Zhao, et al., 2012). Вкратце, опухолевую линию культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco) с содержанием 10% FBS (Hyclone), L-глутамина (2 мМ) (Gibco), 100 U/мл пенициллина (Gibco), 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco) в культуральном флаконе на 75 мм² из расчета 2*10⁵ клеток/мл при 37°C, 5% CO₂. Каждые 2-3 дня клетки пересаживали в новый флакон с полной заменой среды. Экспоненциально растущие опухолевые клетки собирали, отмывали от среды и вводили мышам подкожно в количестве 1x10⁶ клеток в 200 мкл PBS. Через каждые 2-3 дня измеряли рост опухоли, как l*w*h.

Введение блокаторов мышам с опухолями.

Для фармакологической блокировки TNF *in vivo* применяли препараты Этанерцепт (Пфайзер Айрленд Фармасьюткилз, Ирландия, J17413) и Инфликсимаб (Шеринг-Плау Бринни Компани, Ирландия, 3RMKA86001). Мыши получали инъекцию Этанерцепта и Инфликсимаба из расчета 10 мкг/г каждые 3 дня. На 7-ой день эксперимента мышам вводили 1x10⁶ опухолевых клеток МСА205 фибросаркомы в 200 мкл PBS.

Модель ЕАЕ.

Индукцию заболевания осуществляли подкожным введением 100 мкг миелинового пептида MOG₃₅₋₅₅ (Anaspec) в смеси с полным адъювантом Фрейнда (Sigma Aldrich) дополненной *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) в концентрации 5 мг/мл и последующим двукратным введением 200 нг коклюшного токсина (Sigma Aldrich) для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера. Развитие заболевания оценивали ежедневно по стандартному протоколу, где 0 – отсутствие клинических симптомов заболевания, 1 – отсутствие тонуса хвоста, 1,5 – частично нарушенный рефлекс переворачивания, 2 – полностью нарушенный рефлекс переворачивания, 2,5 – нарушение походки с хромотой, 3 – парез задних конечностей, 3,5 – паралич задних конечностей, 4 – парез передних конечностей, 4,5 – паралич передних конечностей, 5 – потеря двигательной активности

Выделение иммунных клеток.

Для выделения клеток из крови, 100-150 мкл крови лизировали в 3 мл ACK Lysing buffer (Kruisbeek 2001). Для выделения клеток из селезенки и лимфатических узлов органы перетирали с помощью сита с размером пор 70 мкм, эритроциты лизировали в ACK Lysing buffer.

Клетки, инфильтровавшие ЦНС, сепарировали центрифугированием на градиенте плотности перколла (GE Healthcare, 30/37/70) после выделения из спинного и головного мозга мышей по стандартному протоколу (Mufazalov et al., 2016). Вкратце, мышам проводили транскардиальную перфузию, далее выделяли спинной и головной мозг с последующей механической гомогенизацией и ферментативным выделением с помощью ферментов коллагеназы II в концентрации 1,5 мг/мл (Gibco) и 50 мкг/мл дезоксирибонуклеазы I (Roche). После этого останавливали ферментативную реакцию большим объемом PBS с FBS (2%), дополнительно гомогенизировали образцы пропусканием суспензии через шприц с иглой 18G (1,2 x 40 мм). Суспензию клеток осаждали (300g, 4°C, 7 минут) и растворяли в 70% изотоническом растворе перколла. Далее получившуюся суспензию подслаивали под градиент перколла (30/37) с последующим центрифугированием при 500 g, 25°C, 50 минут.

Цитофлуориметрический анализ.

Клеточные суспензии окрашивали с помощью флуоресцентно-меченных антител (Таблица 2) и анализировали на приборах BD FACSCanto II или BD LSRFortessa.

Для внутриклеточного окрашивания клетки стимулировали РМА (50 нг/мл, Sigma Aldrich) и иономицином (500 нг/мл, Sigma Aldrich) в течение 4 часов. Для детекции антиген-специфичных клеток в модели ЕАЕ клетки активировали MOG₃₅₋₅₅ пептидом (20 мкг/мл, Анаспес) в течение 6 часов. Активацию клеток осуществляли в присутствии брефельдина при конечной концентрации 3 мкг/мл в полной среде Advanced RPMI 1640 (Gibco) при 37°C, 5% CO₂.

Для окрашивания клетки рассаживали в 96-луночный планшет и осаждали центрифугированием (300g, 4°C, 7 минут). После этого проводили блокировку неспецифического связывания с помощью антител к FcγR в PBS с FBS (2%) в течение 25 минут при 4°C, далее отмывали от FcγR - блокирующих антител и осаждали клетки центрифугированием (300g, 4°C, 7 минут). После этого добавляли антитела на поверхностные маркеры (Таблица 2) в PBS с FBS (2%) и инкубировали в течение 25 минут при 4°C. Для детекции мертвых клеток использовали Fixable Viability Dye (eBioscience). Для внутриклеточного окрашивания цитокинов и транскрипционных факторов клетки фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали антителами в пермеабелизирующем буфере в течение 1 часа (eBioscience FoxP3 kit). Далее клетки отмывали, осаждали центрифугированием, растворяли в нужном объеме PBS и анализировали на проточном цитометре.

Для детекции NO и ROS клетки, окрашенные с антителами к поверхностным маркерам, инкубировали с реагентами carboxy-H2DCFDA (Thermo Fisher Scientific) и DAF-FM diacetate (Thermo Fisher Scientific), соответственно, в конечной концентрации 1 мкМ в PBS с FBS (2%) в течение 25 минут при 25°C. Далее клетки отмывали, осаждали центрифугированием, растворяли в нужном объеме PBS и анализировали на проточном цитометре.

Таблица 2. Список антител, использованных для определения популяций иммунных клеток методом проточной цитофлуориметрии

Антиген/Маркер/Реагент	Клон	Производитель
Fixable Viability Dye		eBioscience
TCRb	H57-597	BioLegend
CD45	30-F11	eBioscience
CD4	RM4-5	BioLegend
	GK1.5	eBioscience
CD8	53-6.72	eBioscience
CD45R (B220)	RA3.6B2	eBioscience
CD25	7D4	eBioscience

	PC61	BD Bioscience
GITR	DTA-1	BioLegend
CD304 (Nrр-1)	3E12	BioLegend
CCR6	29-2L17	BioLegend
CD152 (CTLA-4)	UC10-4F10-11	BD Bioscience
CD103	2E7	BioLegend
mTNFR2	TR75-54	eBioscience
hTNFR2	REA520 3G7A02	Miltenyi Biotec BioLegend
FoxP3	FJK-16s	eBioscience
Helios	22F6	BioLegend
CD44	IM7	eBioscience
CD62L	MEL-14	eBioscience
CD154 (CD40L)	MR1	BioLegend
IL-17A	eBio17B7	eBioscience
GM-CSF	MP1-22E9	BioLegend
IFN γ	XMG1.2	eBioscience
Streptavidin		eBioscience
GR-1	RB6-8C5	eBioscience
Ly6G	1A8	eBioscience
F4/80	BM8	eBioscience
B220	RA3-6B2	eBioscience
Ly6C	HK 1.4	eBioscience
CD11b	M1/70	eBioscience
CD45	30-F11	eBioscience
CD16/CD32	93	eBioscience

Анализ супрессорной активности MDSC.

Т-клетки выделяли из наивных мышей с помощью магнитной сепарации с использованием CD4 MicroBeads (L3T4, Miltenyi Biotec) по стандартному протоколу (Miltenyi Biotec). Далее, Т-клетки окрашивали CFSE (5 мкМ, Molecular Probes) и культивировали в присутствии MDSC, выделенных из мышей с опухолями на фоне введения Этанерцепта, Инфликсимаба или PBS в течение 3-4 дней, в соотношении 1:5 в полной среде RPMI 1640 при 37°C, 5% CO₂. Для стимуляции Т-клеточной пролиферации использовали антитела к CD3 (клон 145-2C11, DRFZ) и антитела к CD28 (клон 37.51, DRFZ) в конечной концентрации 1 мкг/мл и 6 нг/мл, соответственно. CD11b⁺Gr-1⁺ клетки выделяли методом магнитной сепарации с использованием MDSC isolation kit согласно стандартному протоколу (Miltenyi Biotec). Анализ пролиферации проводили на приборе BD FACSCanto II по разбавлению метки CFSE.

Анализ супрессорной активности Treg клеток.

Определение функционального статуса Treg клеток осуществляли по стандартному протоколу (Collison et al., 2011). Для этого наивные CD4⁺ Т-клетки выделяли методом магнитной сепарации (Naïve kit, Miltenyi) из селезенки и лимфатических узлов и окрашивали CellTrace Violet (CTV, Thermo Fisher) в концентрации 5 мкМ согласно стандартному протоколу производителя. CD4⁺CD25⁺ Treg клетки также выделяли методом магнитной сепарации (Treg isolation kit, Miltenyi) из селезенки и лимфатических узлов hTNF α × hTNFR2KI и hTNF α × hTNFR2^{ΔTreg} мышей. CTV-окрашенные Т клетки культивировали с Treg клетками в полной среде RPMI 1640 в присутствии антител к CD3 (клон 145-2C11, DRFZ) и CD28 (клон 37.51, DRFZ) в конечной концентрации 1 мкг/мл и 6 нг/мл, соответственно, в течение 3-4 дней, при 37°C и 5% CO₂. Пролиферацию Т-клеток оценивали по разбавлению метки CTV на проточном цитометре.

Статистический анализ

Статистический анализ был проведен в программе GraphPad Prism с помощью тестов 1-way ANOVA, 2-way ANOVA или t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при *p < 0.05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Работа по исследованию иммунорегуляторных функций TNF в поддержании супрессорного микроокружения состояла из двух частей.

Первая часть работы посвящена исследованию эффекта фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами на рост перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы и развитие супрессорного микроокружения. Для этого работу проводили на уникальной линии мышей с гуманизацией гена *TNF* (hTNFКI). Была отработана модель опухолевого роста у hTNFКI мышей. Изучена динамика роста опухоли на фоне фармакологической блокировки TNF Инфликсимабом или Этанерцептом. Было изучено влияние нейтрализации TNF на накопление MDSC *in vivo* и их супрессорные свойства *ex vivo*.

Во второй части работы была исследована роль TNF/TNFR2 сигнального пути в мышинной модели рассеянного склероза. Для этого работу проводили на hTNFКI и дважды гуманизированных мышах по TNF и TNFR2 (hTNFКI х hTNFR2КI), а также дважды гуманизированных hTNFКI х hTNFR2КI мышах с возможностью кондиционного удаления TNFR2 в Т-регуляторных клетках (hTNFКI х hTNFR2КI ΔT_{reg}^{s}). В качестве мышинной модели рассеянного склероза в работе использовали MOG₃₅₋₅₅ – индуцированный экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). На первом этапе была подробно изучена динамика ЕАЕ у hTNFКI и hTNFКI х hTNFR2КI мышей с последующим анализом основных популяций иммунных клеток на периферии и в центральной нервной системе. Далее была изучена динамика заболевания ЕАЕ у мышей с делецией TNFR2 в Т-регуляторных клетках, было изучено влияние генетического удаления TNFR2 на экспрессию супрессорных молекул Тreg клеток. Кроме того, была изучена супрессорная активность Тreg клеток *in vitro*.

3.1 Влияние фармакологической нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами на рост перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы и развитие MDSC.

3.1.1. Изучение динамики развития MDSC и роста MCA205 фибросаркомы у мышей дикого типа (C57BL/6) и мышей, гуманизированных по гену *TNF* (hTNFKI).

Ранее было показано, что TNF важен для развития и накопления MDSC, популяции незрелых миелоидных клеток, участвующих в подавлении противоопухолевого иммунитета. Нейтрализация мышиногo TNF с помощью моноклональных антител приводила к замедлению роста фибросаркомы FB61 и снижению процентного содержания MDSC в селезенке в мышах линии BALB/c (Zhao, et al., 2012). В нашей работе мы решили изучить последствия нейтрализации TNF клинически применяемыми блокаторами, Этанерцептом или Инфликсимабом, на рост MCA205 фибросаркомы и развитие MDSC у мышей, гуманизированных по гену *TNF* (hTNFKI). Основная сложность, связанная с изучением этих мышей, заключается в возможном нарушении передачи сигнала человеческим TNF через мышиный рецептор TNFR2 (Bossen, et al., 2006). При этом ранее было показано, что эффективный TNFR2 сигнальный путь необходим для роста опухолей, в том числе и для фибросаркомы, а также для накопления MDSC (Zhao, et al., 2012). Для того, чтобы выяснить возможно ли дальнейшее изучение эффекта нейтрализации TNF с помощью клинически применяемых блокаторов в гуманизированных по гену *TNF* мышах, был осуществлен сравнительный анализ роста опухолей и накопления MDSC у hTNFKI и мышей дикого типа C57BL/6. Для этого hTNFKI и C57BL/6 мышам вводили 1×10^6 опухолевых клеток MCA 205 фибросаркомы. Рост опухоли оценивали каждые 3-5 дней, накопление MDSC в крови оценивали с помощью проточной цитометрии по маркерам CD11b и Gr-1 (Рис. 8). Было обнаружено, что динамика роста опухоли MCA205 фибросаркомы не отличается между hTNFKI и C57BL/6 мышами (Рис. 9 А). С помощью проточной цитометрии мы оценили накопление MDSC в крови по маркерам CD11b и Gr-1. Содержание MDSC через 2-3 недели было сопоставимо у мышей дикого типа и гуманизированных по гену *TNF* и составляет 30-40 % (Рис. 9 Б).

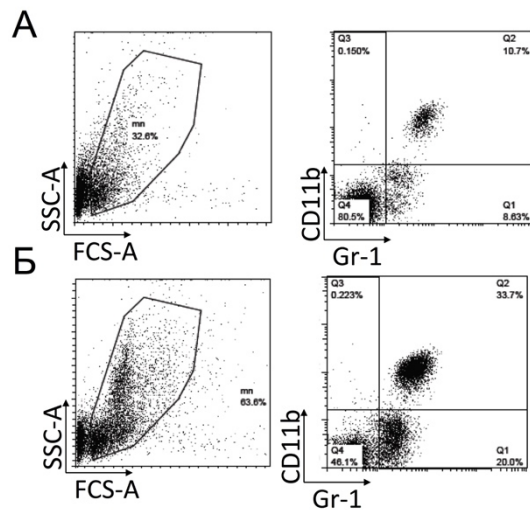


Рисунок 8. Распределение популяций клеток крови по CD11b и Gr-1 маркерам у здоровых мышей без опухолей (А) и мышей, после введения опухолевых клеток через 2-3 недели (Б).

Мышам вводили 1×10^6 МСА 205 опухолевых клеток подкожно. Накопление миелоидных клеток изучали методом проточной цитофлуориметрии на приборе Guava easyCyte 8HT. Окрашивание клеток проводили с использованием эпитопспецифических антител к поверхностным маркерам Gr-1 и CD11b

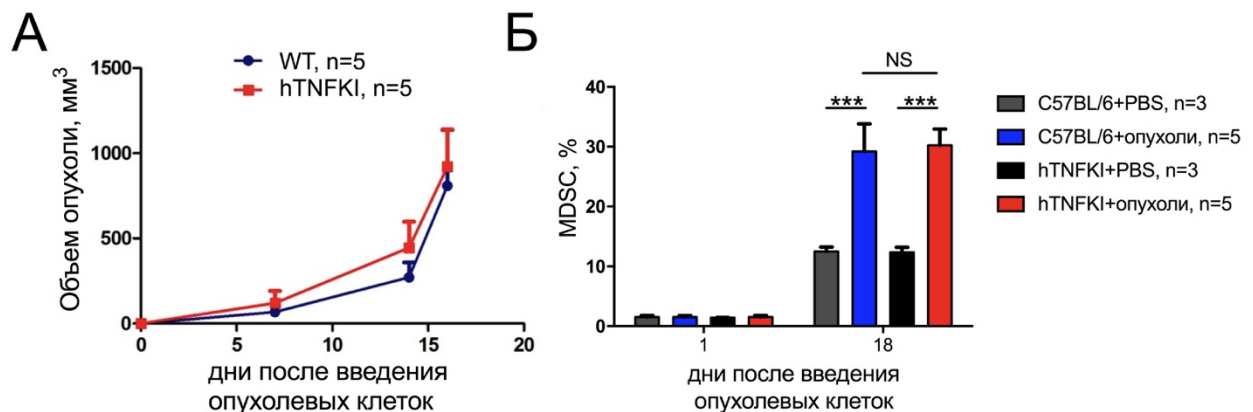


Рисунок 9. Гуманизация TNF не влияет на рост MCA205 фибросаркомы и накопление MDSC

А) Динамика роста опухолей при подкожном введении 1×10^6 клеток МСА 205 фибросаркомы мышам дикого типа (C57BL/6, синяя линия) и гуманизированным по TNF (hTNFKI, красная линия). Рост опухоли оценивали каждые три дня, объем опухоли вычисляли как $l \times w \times h$. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли со стандартным отклонением в группе из 5 мышей. Б) Процентное содержание MDSC в крови на первый и 18-день после введения опухолевых клеток мышам дикого типа C57BL/6 (синий столбик) и гуманизированным по TNF hTNFKI (красный столбик). Содержание MDSC также оценивали в мышах дикого типа C57BL/6 (серый столбик) и гуманизированных по TNF hTNFKI (черный столбик) без опухолей. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 2 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 2-way ANOVA теста. Различия считались достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Таким образом, генетическая замена мышиноного гена *Tnf* на человеческий не влияет на рост MCA205 фибросаркомы и накопление MDSC *in vivo*. Поэтому такая система может быть использована для дальнейшего изучения эффектов клинически применяемых блокаторов TNF на рост перевиваемой опухоли и накопление MDSC.

3.1.2. Фармакологическая нейтрализация TNF с помощью Инфликсимаба или Этанерцепта приводит к замедлению роста MCA205 фибросаркомы и снижению накопления MDSC в крови и во вторичных лимфоидных органах hTNFКI мышей

Для изучения последствий нейтрализации hTNF на рост MCA205 фибросаркомы и накопление MDSC использовали клинически доступные блокаторы Этанерцепт и Инфликсимаб. Блокаторы вводили из расчета 10 мкг/г каждые три дня в течение одного месяца, на 7 день антицитокиновой терапии мышам вводили опухолевые клетки, а далее отслеживали динамику опухолевого роста и накопления миелоидных супрессорных клеток на периферии, а также воздействие блокировки TNF на супрессорные свойства MDSC (Рис.10).

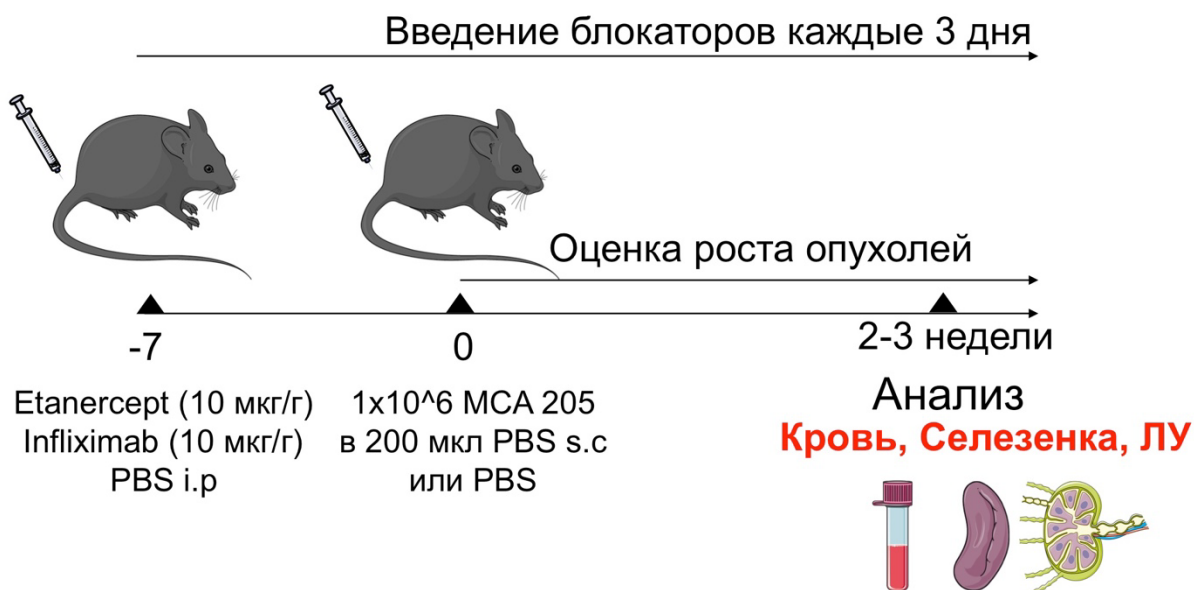


Рисунок 10. Схема эксперимента

hTNFКI мыши получали инъекцию Этанерцепта или Инфликсимаба из расчета 10 мкг/г каждые три дня. На 7-ой день эксперимента мышам вводили 1x10⁶ опухолевых клеток в 200 мкл PBS. Объем опухолей измеряли каждые 2-3 дня. Через 2-3 недели после введения опухолевых клеток проводили анализ содержания MDSC в крови и во вторичных лимфоидных органах, оценивали супрессорные свойства MDSC, а также Т-клеточный иммунный ответ на периферии методом проточной цитометрии.

Мы обнаружили, что нейтрализация TNF блокаторами Этанерцептом или Инфликсимабом подавляет рост MCA205 фибросаркомы. Так, через 2-3 недели объем

опухоли достигал 500-600 мм³ при подкожном введении опухолевых клеток (Рис.11А). Введение блокаторов Этанерцепта или Инфликсимаба значительно замедляло динамику роста опухолей. Объем опухолей на фоне нейтрализации TNF не превышал 200 мм³ через 2-3 недели после введения опухолевых клеток, при этом анализ площади под кривой (AUC) роста опухолей также показал эффективность нейтрализации TNF для замедления роста MCA205 фибросаркомы (Рис.11 Б)

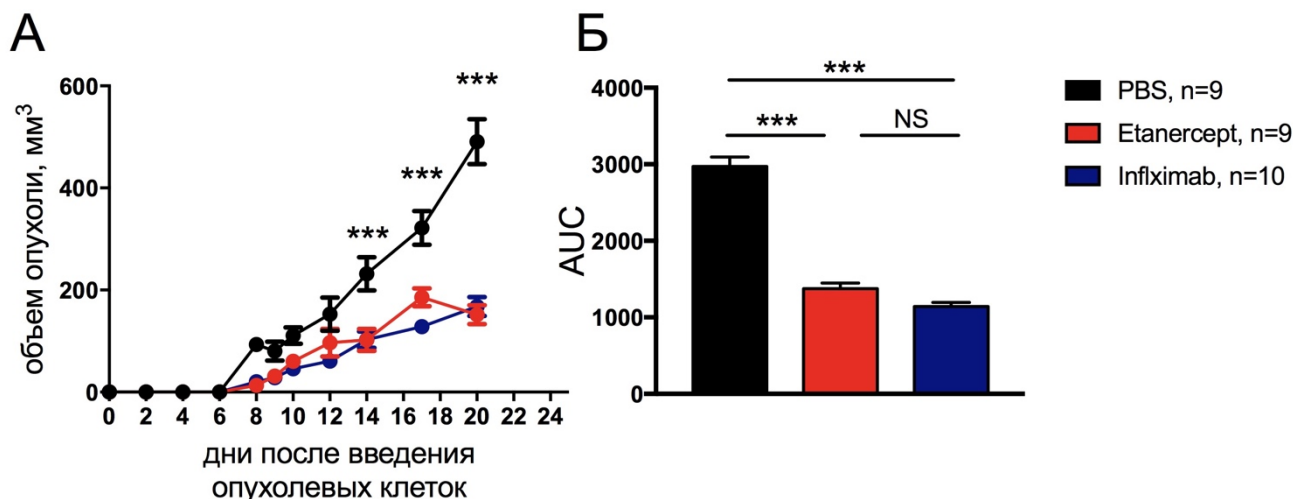


Рисунок 11. Нейтрализация TNF приводит к снижению роста опухоли MCA205 фибросаркомы

А) Динамика роста опухоли у hTNFКI мышей на фоне нейтрализации TNF блокаторами Этанерцептом (красная линия) или Инфликсимабом (синяя линия) и без нейтрализации TNF с введением PBS в качестве контроля (черная линия). Блокаторы из расчета 10 мкг/г вводили за неделю до введения опухолевых клеток и продолжали курс антител каждые 3 дня. Опухолевые клетки вводили подкожно в 200 мкл PBS/мышь. Рост опухоли оценивали каждые два-три дня, объем опухоли вычисляли как $l \times w \times h$. Каждая точка представляет собой среднее значение объема опухоли со стандартным отклонением в группе из 9-10 мышей Б) Площадь под кривой (Area under curve, AUC), рассчитанная для (А). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way (Б) и 2-way ANOVA теста (А). Различия считали достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Далее мы исследовали влияние фармакологической нейтрализации TNF на накопление MDSC в крови при развитии MCA205 фибросаркомы. Стратегия выделения популяции MDSC в крови с помощью проточной цитофлуориметрии представлена на Рис.1 в Приложении 1.

Было обнаружено, что фармакологическая нейтрализация TNF приводит к снижению процентного содержания MDSC, что коррелирует с замедлением опухолевого

роста (Рис.12). При введении блокаторов Этанерцепта или Инфликсимаба процентное содержание MDSC в крови через 2-3 недели после введения опухолевых клеток достигало в среднем 15-20 %, тогда как в контрольной группе этот показатель достигал 30-40% (Рис.12 А). Относительное содержание MDSC в крови мышей на 1 и 20 дни после введения опухолевых клеток показаны на рис.12 Б.

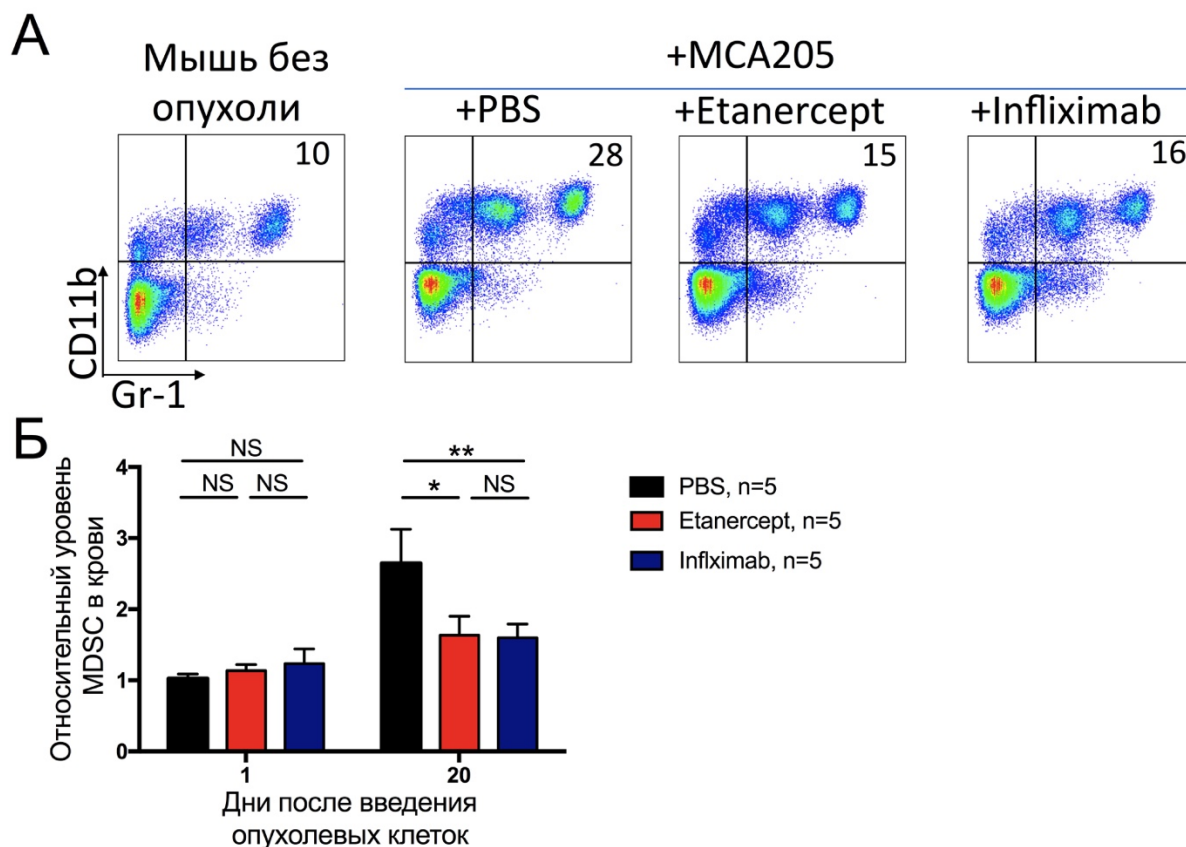


Рисунок 12. Нейтрализация TNF приводит к снижению накопления MDSC в крови у мышей с MCA205 фибросаркомой

А) Репрезентативные дот-плоты с процентным содержанием MDSC в крови у здоровых мышей без опухоли, мышей с опухолями без нейтрализации TNF и с нейтрализацией TNF блокаторами Этанерцептом или Инфликсимабом через 2-3 недели после введения MCA205 фибросаркомы. Б) Относительный уровень MDSC в крови в первый и 20 день после введения опухолевых клеток мышам, получавшим PBS (черный), Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Каждый столбик представляет собой отношение между группами мышей с опухолями к группе здоровых мышей на фоне нейтрализации TNF блокаторами Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий) или без нейтрализации TNF с введением PBS в качестве контроля (черный). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в трех независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 2-way ANOVA теста. Различия считались достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Таким образом, фармакологическая блокировка TNF приводит к замедлению роста фибросаркомы MCA205, а также препятствует накоплению MDSC в крови *in vivo*. Следующим шагом в нашем исследовании было изучение влияния фармакологической нейтрализации TNF на накопление различных популяций миелоидных клеток и Т-клеток при развитии MCA205 фибросаркомы. Стратегия выделения популяции MDSC в лимфоидных органах с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис. 2 в Приложении 1.

Было обнаружено уменьшение количества MDSC в лимфатических узлах и селезенке на 20 день после введения опухолевых клеток на фоне нейтрализации TNF (Рис.13 Б). При этом нейтрализация TNF с помощью Инфликсимаба, но не Этанерцепта, приводила к достоверному снижению процентного содержания MDSC в лимфатических узлах и селезенке (Рис.13 А). Кроме того, нейтрализация TNF не приводила к изменению количества и процентного содержания $CD11b^+F4/80^+$ макрофагов и $B220^+$ В-клеток в лимфоидных органах (данные не представлены).

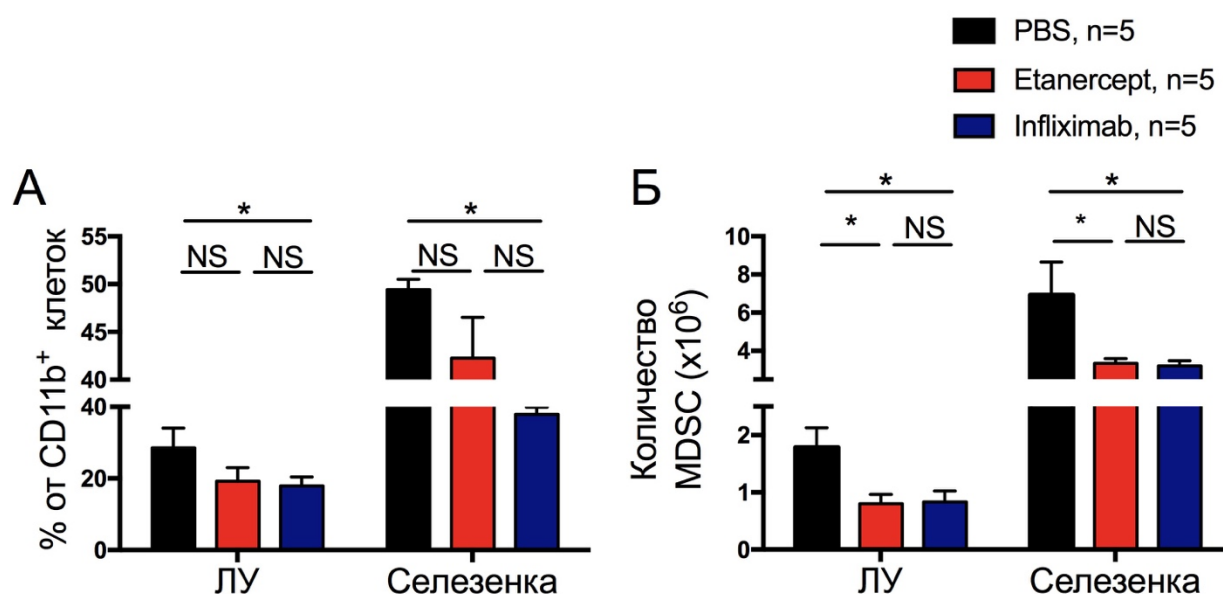


Рисунок 13. Нейтрализация TNF приводит к снижению количества MDSC в лимфоидных органах у мышей с MCA205 фибросаркомой

А) Процентное содержание MDSC ($Ly6G^+Ly6C^+$) от $CD11b^+F4/80^+$ клеток у опухолевых мышей на фоне нейтрализации TNF с помощью блокаторов Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий), и без нейтрализации TNF (черный) на 20 день после введения MCA205 фибросаркомы в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке. Б) Количество MDSC в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница)

Известно, что наряду с миелоидными клетками, Т-клетки могут участвовать в формировании супрессорного опухолевого микроокружения и способствовать развитию раковых заболеваний. Так, Treg клетки за счет ингибирования иммунного ответа и продукции противовоспалительных цитокинов могут играть проопухолевую роль. Роль Th17 клеток неоднозначна, с одной стороны, они выделяют провоспалительные цитокины IL-17, IL-23 и привлекают нейтрофилы в сайт воспаления, тем самым участвуют в поддержании хронического воспаления, с другой – показана их роль в привлечении цитотоксических Т-клеток (Asadzadeh et al., 2017). Th1 клетки могут ингибировать ангиогенез, привлекать и активировать цитотоксические Т-клетки и NK-клетки, которую способны напрямую убивать опухолевые клетки. В связи с этим, в наших исследованиях было проанализировано содержание ключевых популяций Т-клеток на фоне МСА 205 фибросаркомы в условиях фармакологической нейтрализации TNF. Стратегия анализа популяций Т-клеток в лимфоидных органах с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис.3. в Приложении 1.

При нейтрализации TNF блокаторами Этанерцептом или Инфликсимабом на 20 день после введения опухолевых клеток происходит увеличение количества $CD8^{+}IFN-\gamma^{+}$ клеток в лимфатических узлах (Tc1 клетки) у hTNFKI мышей (Рис.14).

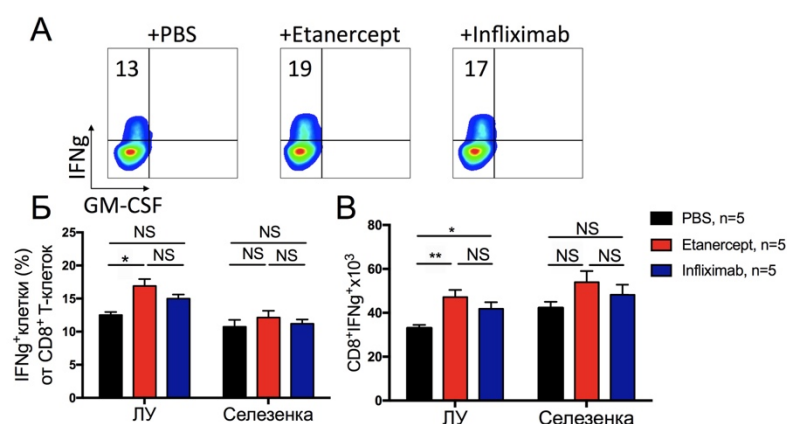


Рисунок 14. Нейтрализация TNF приводит к увеличению количества $CD8^{+}IFN-\gamma^{+}$ Т-клеток (Tc1) в лимфатических узлах при развитии опухоли МСА205 фибросаркомы.

А) Репрезентативные дот-плоты с процентным содержанием $IFN-\gamma^{+}$ клеток от $CD8^{+}$ Т-клеток, рестимулированных РМА/иономицином, в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке у мышей с опухолями без нейтрализации TNF (черный) и с нейтрализацией TNF с помощью Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий) на 20 день после введения МСА205 фибросаркомы. Б) Процентное содержание и количество (В) Tc1 клеток в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке у мышей с опухолями без нейтрализации TNF (черный) и с нейтрализацией TNF с помощью Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий) на 20 день после введения МСА205 фибросаркомы. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

При этом нам не удалось детектировать наличие Th17 клеток по экспрессии цитокина IL-17A (Рис. 3 в Приложении 1), а содержание CD4⁺IFN- γ ⁺ (Th1 клеток), а также FoxP3⁺Treg клеток не отличалось между контрольной группой и группами мышей с блокировкой TNF (данные не представлены).

Таким образом, нейтрализация TNF на фоне роста фибросаркомы MCA 205 приводит к уменьшению накопления MDSC во вторичных лимфоидных органах, а также к увеличению количества Tc1 клеток в лимфатических узлах.

3.1.3. Фармакологическая нейтрализация TNF Инфликсимабом или Этанерцептом приводит к снижению супрессорной активности MDSC

Ранее было отмечено, что MDSC способствуют опухолевому росту за счет подавления пролиферации и функций Т-клеток. Выделение активных форм кислорода и азота является одним из способов подавления иммунного ответа MDSC. Для исследования этого вопроса была изучена продукция NO и ROS MDSC из крови мышей на фоне нейтрализации TNF на 20 день после введения опухолевых клеток MCA205 фибросаркомы. Стратегия выделения NO⁺ и ROS⁺ популяций MDSC с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис.4. в Приложении 1.

Фармакологическая нейтрализация TNF подавляет продукцию активных форм азота моноцитарной популяцией MDSC (Рис. 15 А). При этом введение Этанерцепта, но не Инфликсимаба, приводит к снижению процентного содержания ROS⁺ популяции MDSC (Рис. 15 Б).

Далее мы оценили влияние фармакологической блокировки TNF на способность MDSC подавлять Т-клеточную пролиферацию. Для этого была получена суспензия MDSC клеток методом магнитной сепарации из селезенки мышей с опухолями на фоне блокировки TNF и без нейтрализации TNF. После этого MDSC культивировали совместно с Т-клетками в присутствии активирующих сигналов и оценивали пролиферацию Т-клеток по степени разбавления метки CFSE. Стратегия выделения популяций для анализа Т-клеточной пролиферации с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис. 5 в Приложении 1.

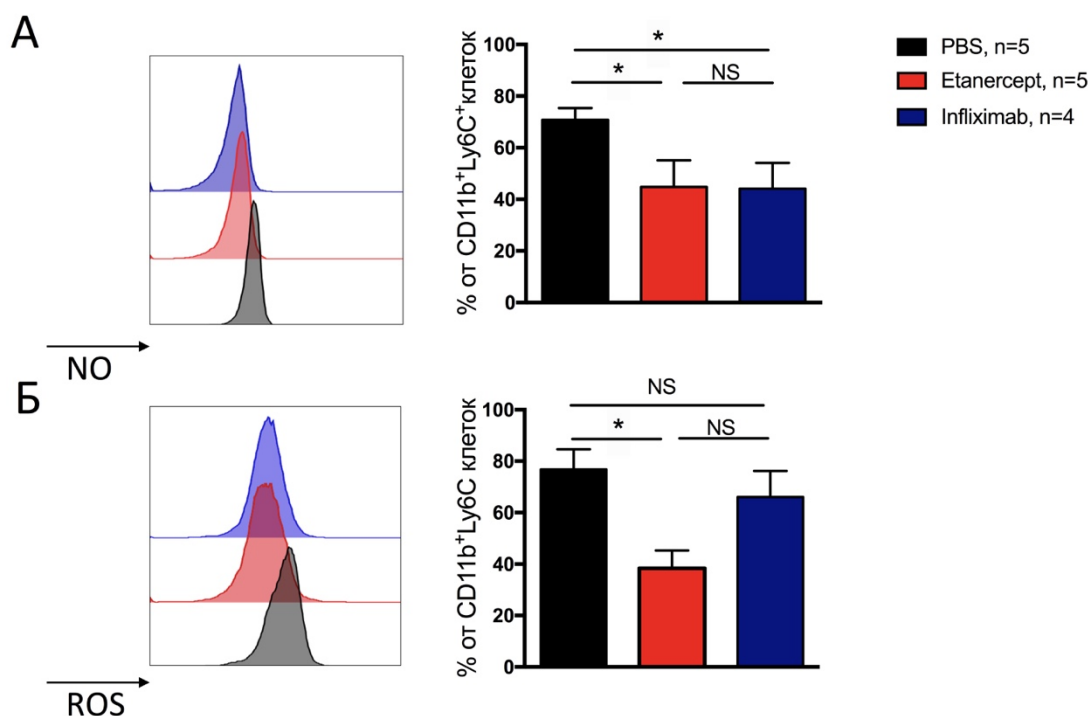


Рисунок 15. Нейтрализация TNF снижает уровни ROS и NO в MDSC крови hTNFКI мышей с MCA205 фибросаркомой

А) Репрезентативные гистограммы и процентное содержание NO⁺ популяции MDSC в крови мышей с MCA205 фибросаркомой без нейтрализации TNF (черный), и на фоне введения блокаторов Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Б) Репрезентативные гистограммы и процентное содержание ROS⁺ популяции MDSC в крови мышей с MCA205 фибросаркомой без нейтрализации TNF (черный), и на фоне введения блокаторов Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в двух независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Оказалось, что MDSC, выделенные из селезенки мышей с MCA205 фибросаркомой без нейтрализации TNF, эффективно ингибируют пролиферацию Т-клеток (Рис.16 А). В то же время MDSC, выделенные из мышей с опухолями, подверженных блокировке TNF, не ингибировали Т-клеточную пролиферацию (Рис.16 В, Г). В качестве контролей использовали Т-клетки без добавления MDSC, которые активно пролиферировали в ответ на активирующий стимул, и Т-клетки без активации (Рис.16 Б). В результате мы показали, что MDSC не способны ингибировать Т-клеточную пролиферацию на фоне блокировки TNF, что свидетельствует о нарушении их супрессорных свойств (Рис.16 Д).

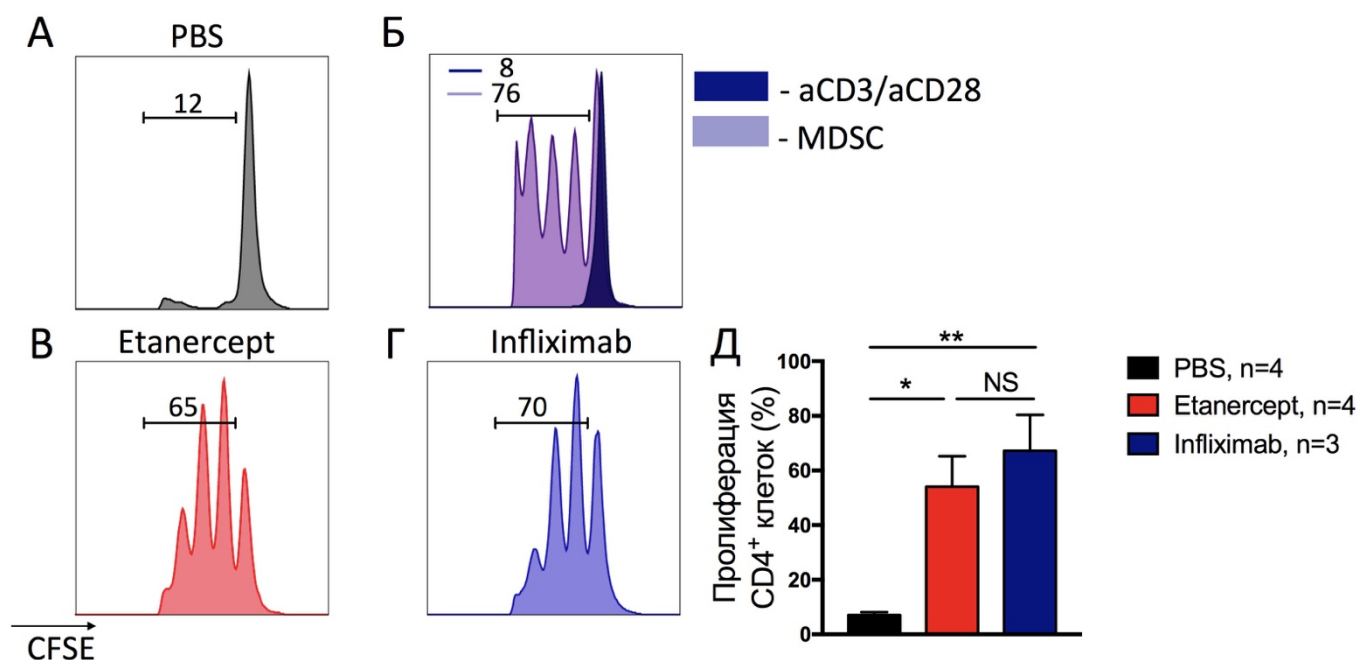


Рисунок 16. Фармакологическая нейтрализация TNF подавляет супрессорные функции MDSC

Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток в присутствии MDSC, выделенных из опухолевых мышей без нейтрализации TNF (А), на фоне блокировки TNF с помощью Этанерцепт (В) или Инфликсимаб (Г). Б) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток без активации (темно-синий) или без добавления MDSC (фиолетовый) Д) Процентное содержание пролиферации CD4⁺ клеток от VD⁻ клеток, инкубированных с MDSC, выделенных из опухолевых мышей без нейтрализации TNF (черный), на фоне блокировки TNF с помощью Этанерцепт (красный) или Инфликсимаб (синий). Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA теста. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Таким образом, мы обнаружили, что введение блокаторов TNF приводит к снижению роста опухоли, ассоциированному с меньшим накоплением MDSC, нарушением их супрессорных свойств и увеличением количества цитотоксических Т-клеток в лимфоидных органах. Тем самым мы показали, что TNF действительно важен для накопления MDSC и поддержания их супрессорных функций при росте перевиваемой опухоли MCA205 фибросаркомы. Результаты этой работы могут иметь клиническое значение для поиска новых мишеней для иммунотерапии рака и создания более эффективных блокаторов.

3.2. Иммунорегуляторная функция TNF/TNFR2 в мышинной модели рассеянного склероза

3.2.1. Изучение динамики развития EAE у мышей дикого типа (C57BL/6), гуманизированных по гену TNF (hTNFKI) и дважды гуманизированных по генам TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI)

В предыдущем разделе мы показали, что нейтрализация TNF может приводить к снижению роста MCA205 фибросаркомы. При этом блокаторы TNF широко применяются в терапии аутоиммунных заболеваний, но имеют ряд побочных эффектов. Кроме того, анти-TNF терапия оказалась неэффективной в лечении рассеянного склероза, что свидетельствует о возможной защитной роли TNF при нейровоспалении.

Изучение регуляторных функций TNF необходимо для создания новых подходов терапии аутоиммунных заболеваний, в которых будет блокироваться только патогенный источник TNF. В предыдущих экспериментах было обнаружено, что гуманизация гена *TNF* не влияет на развитие опухоли и накопление MDSC. Тем не менее, нельзя исключать факт, что возможный неполноценный сигналинг hTNF через mTNFR2 может влиять на развитие EAE. При этом ранее было показано, что TNFR2 сигнальный путь играет протективную роль в модели EAE, а его генетическое удаление приводило к усилению клинических симптомов EAE, демиелинизации, а также к уменьшению супрессорных свойств Treg клеток.

На первом этапе для исследования возможной защитной функции TNF при нейровоспалении было изучено, как гуманизация TNF, и возможная неполноценная передача сигнала через mTNFR2 может влиять на развитие EAE. Для этого мышам дикого типа (C57BL/6), гуманизированным по гену *TNF* (hTNFKI) и дважды гуманизированным по TNF и TNFR2 (hTNFKI x hTNFR2KI), вводили MOG-пептид в полном адьюванте Фрейнда с последующим введением коклюшного токсина в день индукции и на второй день после индукции заболевания. Клинические симптомы заболевания оценивали начиная с 9-ого дня после индукции EAE (Рис. 17). Было обнаружено, что гуманизация гена TNF приводит к усилению клинических симптомов EAE, тогда как дополнительная гуманизация рецептора TNFR2 в hTNFKI мышах снижает симптомы EAE до уровня заболевания у мышей дикого типа (рис. 18).

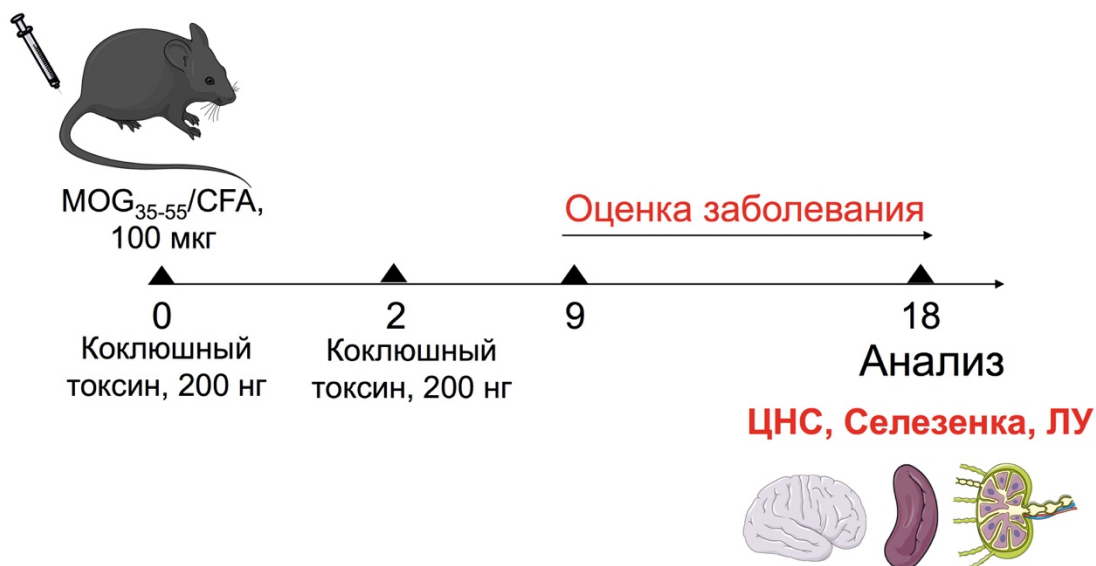


Рисунок 17. Схема индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита

Мышам подкожно вводили 100 мкг MOG₃₅₋₅₅ в полном адьюванте Фрейнда с последующим внутрибрюшинным введением коклюшного токсина в количестве 200 нг/мышь в день введения MOG-пептида и на второй день эксперимента. Клинические симптомы EAE оценивали с 9-ого дня.

Анализ инфильтрации ЦНС, иммунный ответ в ЦНС и на периферии исследовали на эффекторной фазе через 2-3 недели после индукции заболевания.

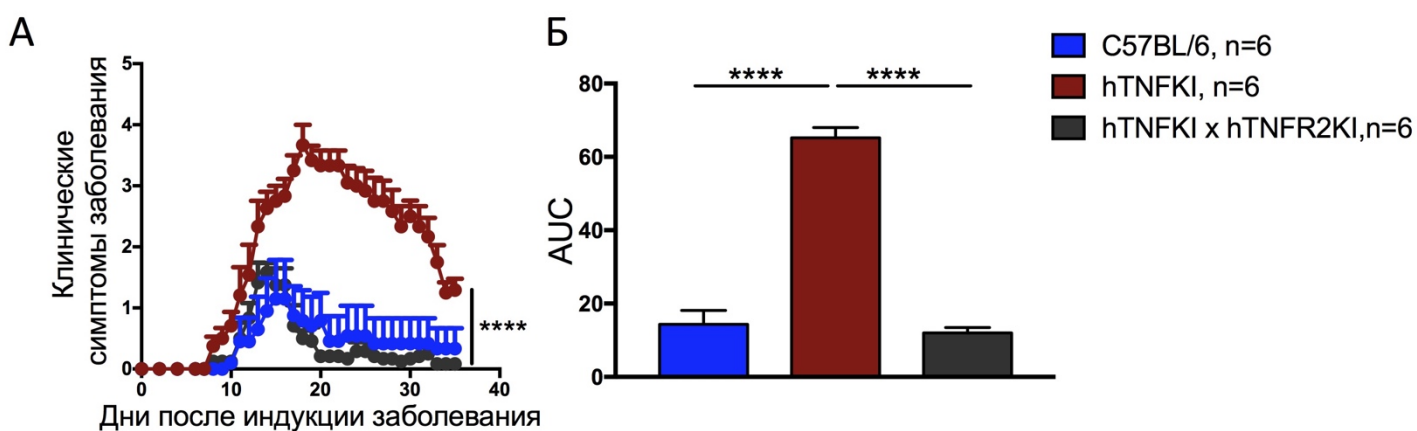


Рисунок 18. hTNFКI мыши развивают более сильные клинические симптомы EAE по сравнению с мышами дикого типа C57BL/6 и дважды гуманизированными мышами hTNFКI x hTNFR2КI.

А) Динамика клинических симптомов EAE у мышей дикого типа C57BL/6 (голубой), hTNFКI (бордовый) и hTNFКI x hTNFR2КI мышей (серый) Б) Площадь под кривой (area under curve), рассчитанная для А. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA (Б) и 2-way ANOVA тестов. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).



А) Динамика клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа С57BL/6 (голубой), hTNFКI (бордовый) и hTNFКI х hTNFR2KI (серый) Б) Количество клеток в селезенке и

Далее мы исследовали содержание различных популяций Т-клеток, таких как Treg, Th1,

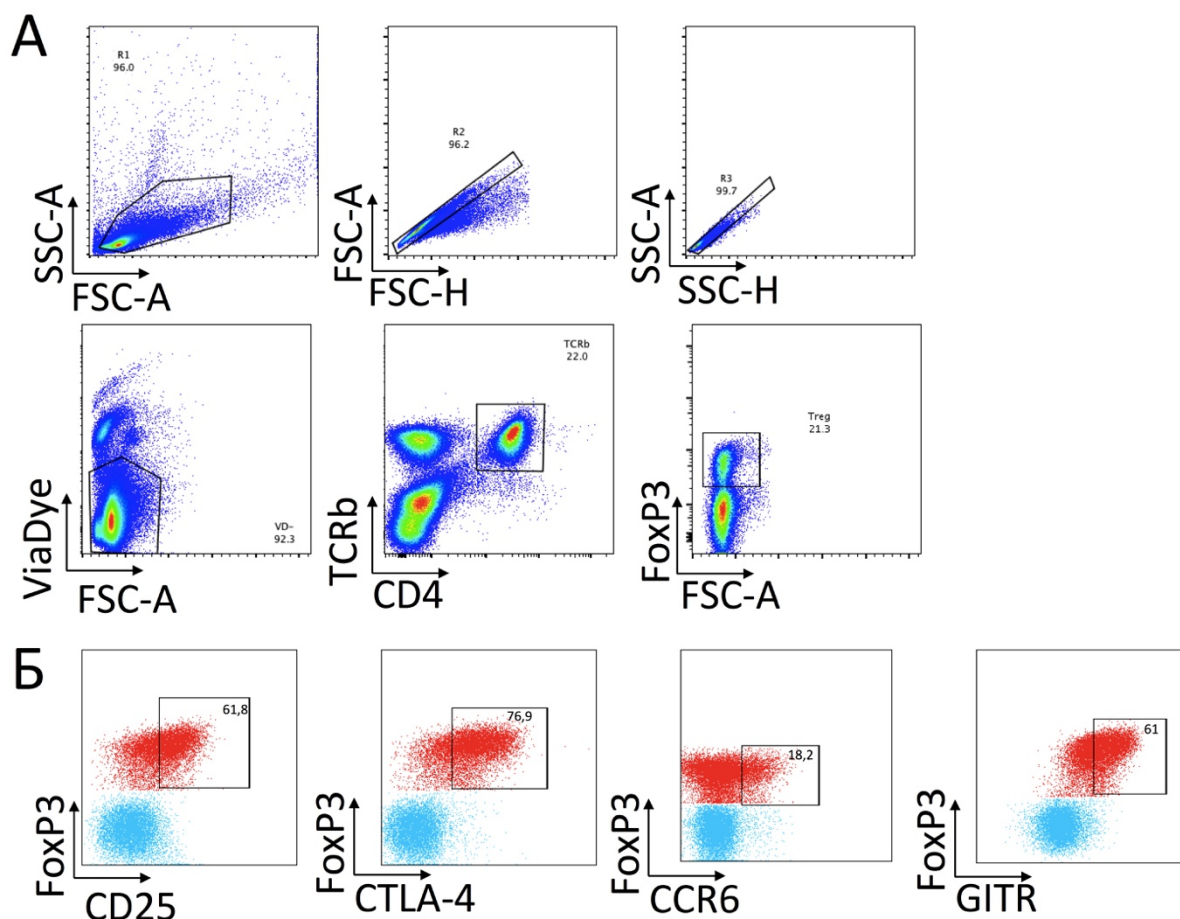


Рисунок 20. Стратегия выделения популяций для цитофлуориметрического анализа Treg клеток в лимфоидных органах и ЦНС

Клетки окрашивали эпитопспецифическими антителами к TCRb, CD4, FoxP3, CD25, CTLA-4, CCR6, GITR. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. Treg клетки определяли как $VD^-TCRb^+CD4^+FoxP3^+$ (А). Б) Показано гейтирование и процентное содержание $CD25^+$, $CTLA-4^+$, $CCR6^+$ и $GITR^+$ популяций Т-регуляторных клеток от $FoxP3^+$ клеток, где красным показана $FoxP3^+$ популяция, а голубым – $FoxP3^-$ популяция. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software

Было обнаружено сниженное содержание Т-регуляторных клеток на периферии и в ЦНС у $hTNFKI$ мышей по сравнению с диким типом и $hTNFKI \times hTNFR2KI$ мышами. При этом уровень экспрессии белка FoxP3 в Т-регуляторных клетках на периферии, но не в ЦНС, снижен у $hTNFKI$ мышей (Рис.21).

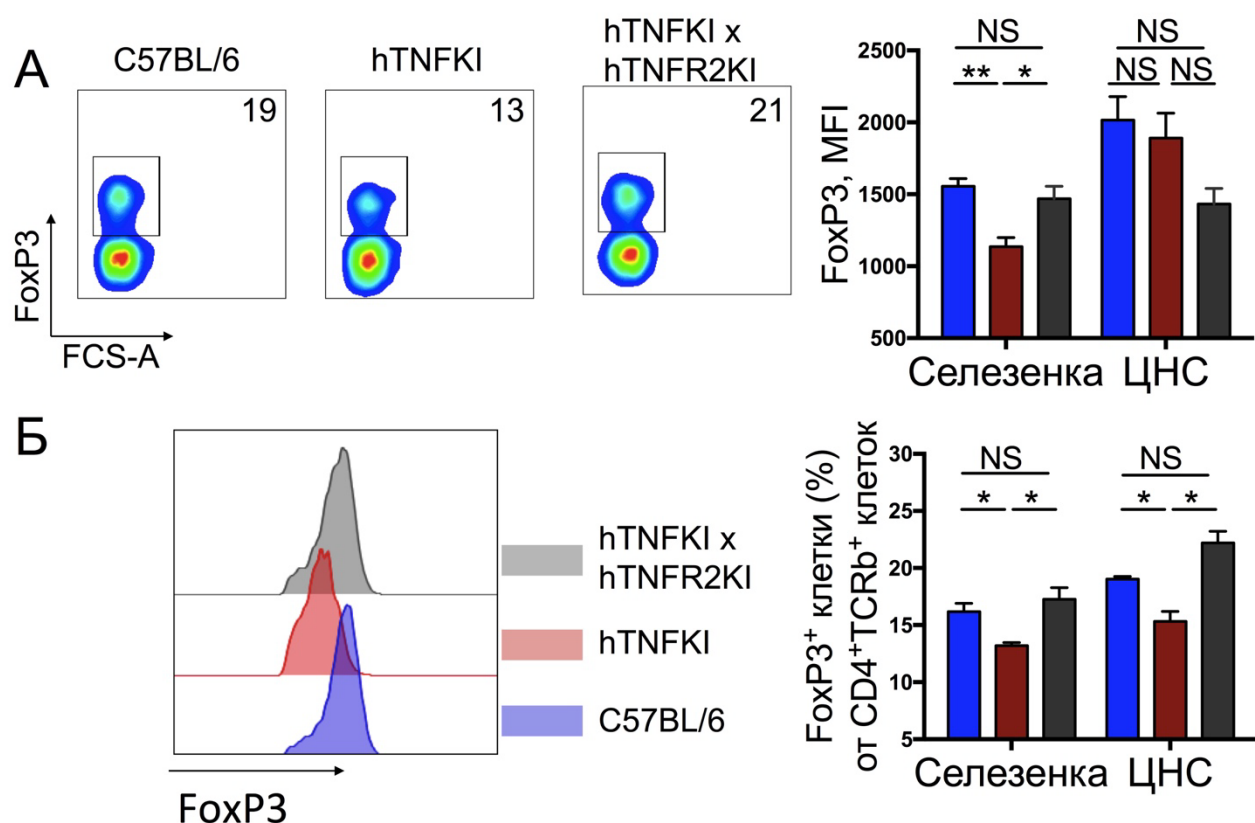


Рисунок 21. hTNFKI мыши имеют сниженное процентное содержание Treg клеток по сравнению с мышами дикого типа и hTNFKI x hTNFR2KI мышами на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Репрезентативные дот-плоты с процентным содержанием FoxP3⁺ клеток в селезенке и ЦНС Б) Репрезентативные гистограммы и средние интенсивности флуоресценции (MFI) FoxP3 от VD⁺TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA. Различия считали достоверными при **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 *****p* < 0.0001; NS, non-significant (недостоверная разница).

Мы также изучили уровень экспрессии супрессорных молекул по интенсивности флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. Было обнаружено, что у Treg клеток в лимфатических узлах hTNFKI мышей на эффекторной фазе ЕАЕ снижены экспрессия молекул CD25, CTLA-4, но не GITR, по сравнению с мышами дикого типа (Рис.22). При этом в hTNFKI x hTNFR2KI мышях также наблюдается снижение экспрессии CD25 на Treg клетках по сравнению с Treg клетками из мышей дикого типа (Рис.22 А).

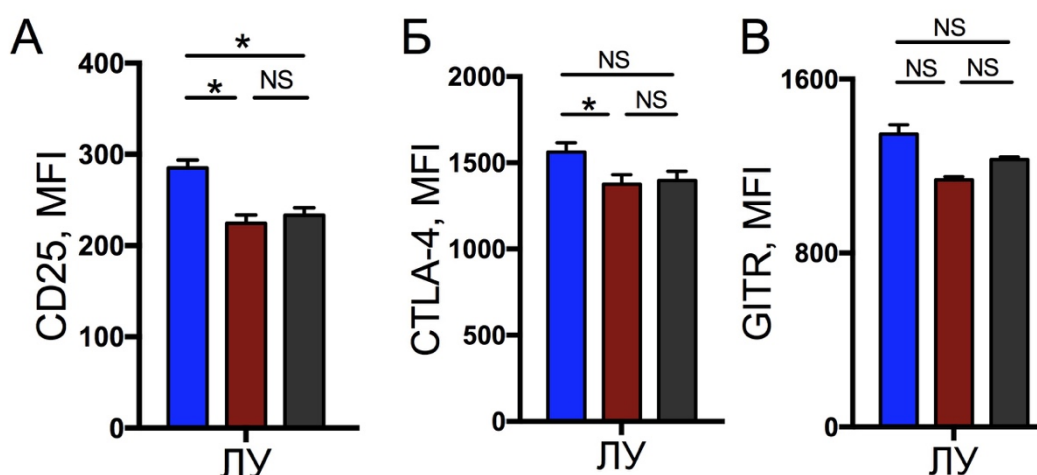


Рисунок 22. Анализ экспрессии супрессорных молекул в Treg клетках в мышах дикого типа (голубой), hTNFKI (бордовый) и hTNFKI x hTNFR2KI (серый) на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Средние интенсивности флуоресценции молекул CD25 (А), CTLA-4 (Б), GITR (В) от $VD^{-}TCRb^{+}CD4^{+}FoxP3^{+}$ клеток. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA. Различия считали достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

При этом в лимфатических узлах процентное содержание CD25⁺, CTLA-4⁺, GITR⁺ Treg клеток было неизменным между тремя группами мышей (Рис.23 А-В), тогда как процентное содержание CCR6⁺ Treg клеток снижено у hTNFKI мышей по сравнению с мышами дикого типа и hTNFKI x hTNFR2KI мышами (Рис.23 Г). CCR6 – хемокиновый рецептор, необходимый для миграции Treg клеток в ЦНС. Нарушение миграции Treg клеток в ЦНС при нейровоспалении может приводить к усилению заболевания за счет недостаточного ингибирования иммунного ответа в сайте воспаления. Для развития ЕАЕ важными патогенными клетками являются Th17, Th1 и T_{GM-CSF} . Кроме того, было исследовано процентное содержание патогенных Т-клеток на периферии и в ЦНС. Стратегия выделения популяций Т-клеток с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис.6 в Приложении 1.

Содержание MOG-специфических Th17-клеток, но не Th1 и T_{GM-CSF} клеток, было повышено в ЦНС у hTNFKI мышей по сравнению с мышами дикого типа и hTNFKI x hTNFR2KI (Рис.24 Б). При этом на периферии наблюдалось повышение содержания Th1 клеток у hTNFKI мышей, но не у мышей дикого типа и hTNFKI x hTNFR2KI мышей (Рис.24 Г).

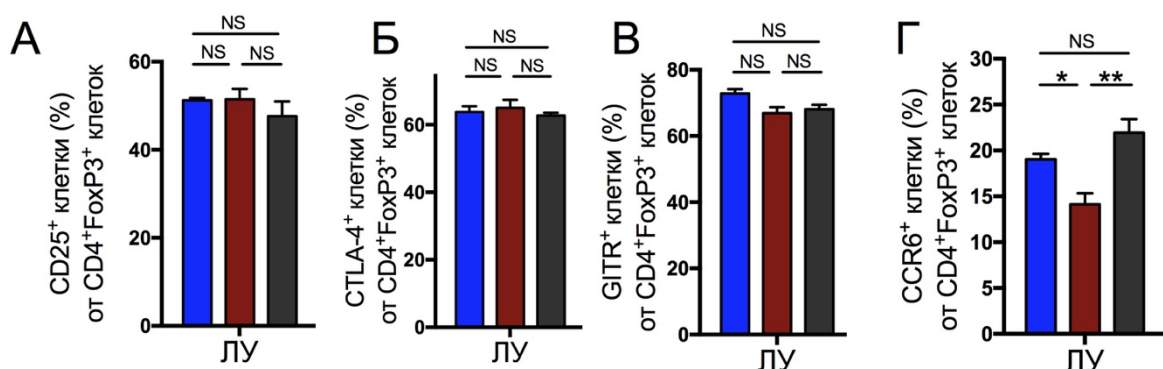


Рисунок 23. hTNFKI мыши имеют сниженное процентное содержание CCR6⁺Treg клеток, но не CD25⁺, CTLA-4⁺, GITR⁺ Treg клеток на эффекторной фазе ЕАЕ.

Процентное содержание CD25⁺ (А), CTLA-4⁺ (Б), GITR⁺ (В), CCR6⁺ (Г) клеток от VD⁻TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток у мышей дикого типа (синий), hTNFKI (бордовый) и hTNFKI x hTNFR2KI (серый). Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью 1-way ANOVA. Различия считали достоверными при *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 ****p < 0.0001; NS, non-significant (недостоверная разница).

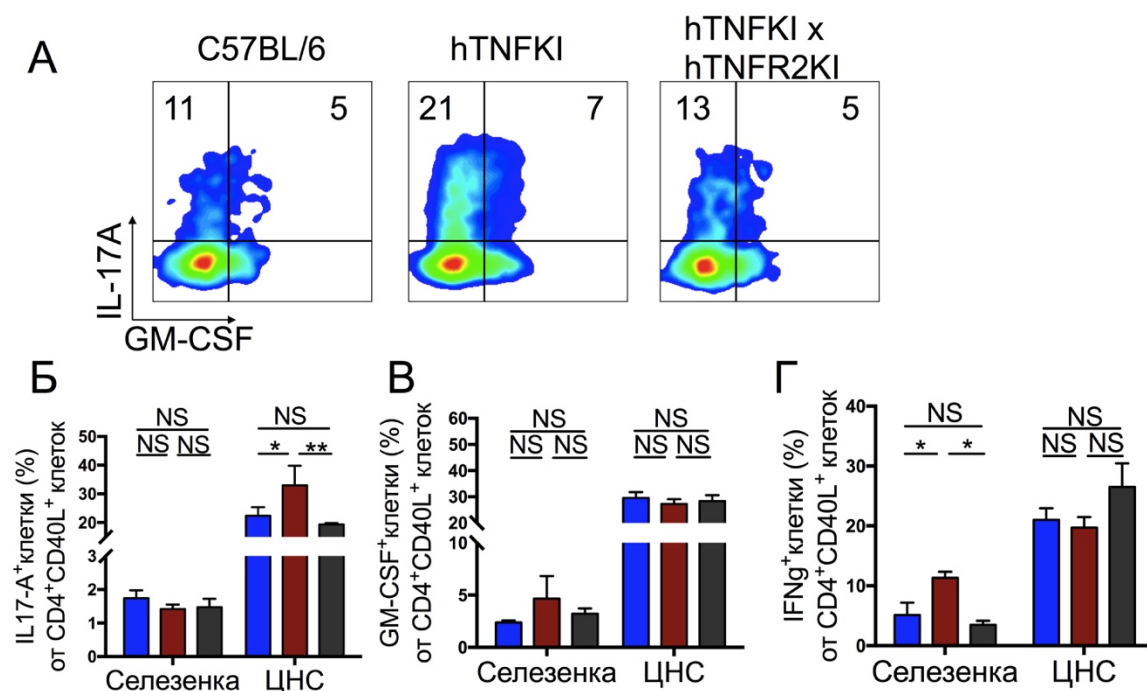


Рисунок 24. hTNFKI мыши имеют повышенное процентное содержание Th17 клеток в ЦНС и Th1 клеток в селезенке на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Репрезентативные дот-плоты с процентным содержанием IL-17A⁺ и GM-CSF⁺T клеток у C57BL/6, hTNFKI и hTNFKI x hTNFR2KI мышей. Процентное содержание IL-17A⁺ (Б), GM-CSF⁺ (В) и IFN-γ⁺ (Г) T-клеток от CD4⁺CD40L⁺ клеток, рестимулированных MOG-пептидом в присутствии брэфельдина. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью теста 1-way ANOVA. Различия считали достоверными при *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 ****p < 0.0001; NS, non-significant (недостоверная разница).

Таким образом, мы обнаружили, что гуманизация TNF приводит к усилению клинических симптомов EAE, что указывает о возможном нарушении TNF/TNFR2 сигнального пути, которое нивелируется после дополнительной гуманизации TNFR2 и восстановления сигнального каскада TNF/TNFR2 (Рис.19). При этом у hTNFKI мышей наблюдается снижение процентного содержания Treg клеток, пониженная экспрессия сигнатурных молекул Treg клеток, таких как FoxP3, CD25, CTLA-4, что может свидетельствовать о нарушении супрессорных свойств Treg клеток (Рис.21, Рис.22). При этом уменьшение процентного содержания CCR6⁺ Treg клеток может указывать на нарушение миграции Treg клеток в ЦНС, где им необходимо регулировать иммунный ответ (Рис.23 Г). Действительно, процентное содержание Th17 клеток в ЦНС повышено у мышей с одиночной гуманизацией, при этом также повышена общая инфильтрация ЦНС иммунными клетками (Рис.24 Б). Таким образом, мы показали, что TNFR2 сигнальный путь играет протективную роль при нейровоспалении и, возможно, опосредует поддержание супрессорных свойств Treg клеток.

3.3.2. TNFR2 на Т-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии

Ранее мы показали, что hTNFKI мыши развивают более сильные клинические симптомы EAE по сравнению с мышами дикого типа и hTNFKI x hTNFR2KI мышами, в том числе, характеризуются повышенной инфильтрацией ЦНС иммунными клетками (Рис.26). При этом в условиях нарушенного TNFR2 сигнального пути происходит снижение доли Treg клеток, а также пониженная экспрессия FoxP3, важного транскрипционного фактора, необходимого для осуществления супрессорных свойств Treg клеток. При этом последние данные также свидетельствуют о возможной иммунорегуляторной роли TNF, опосредованной TNFR2, в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток. Тем не менее, на сегодняшний день детальный механизм влияния TNFR2 на свойства Т-регуляторных клеток не известен.

Для исследования этого вопроса в нашей лаборатории были созданы гуманизированные мыши по генам TNF и TNFR2 с возможностью кондиционного удаления hTNFR2 в FoxP3⁺ Т-регуляторных клетках (hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs}). Было показано, что удаление TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к накоплению эффекторных CD44^{hi}CD62L^{lo} Т-клеток (Рис.25 А), а также Т-регуляторных клеток на периферии (Рис.25 Б) в нормальном состоянии. Кроме того, у мышей с удалением TNFR2 на Treg клетках наблюдается

снижение доли $CD25^+$ Treg клеток, а также $CCR6^+$ Treg клеток, но не $GITR^+$ и $CTLA-4^+$ Treg клеток (Рис.25 В-Е).

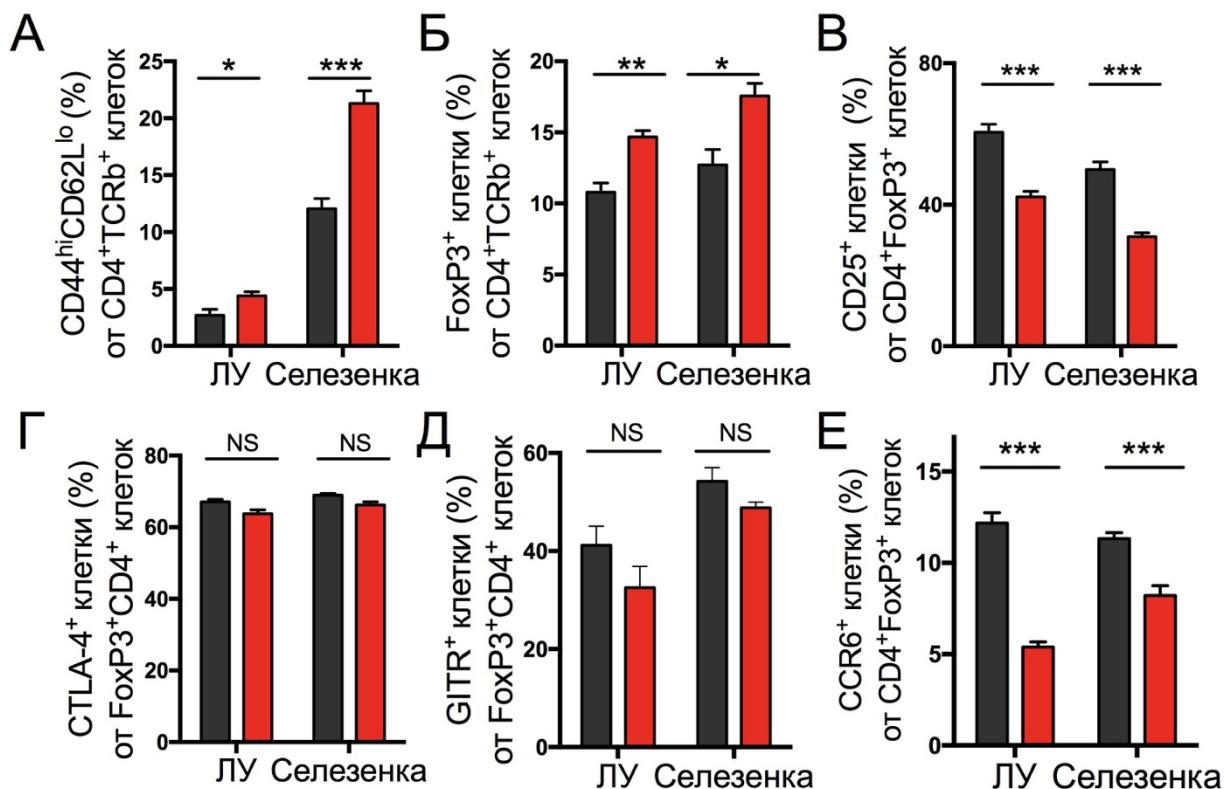


Рисунок 25. Анализ процентного содержания популяций Т-клеток в hTNFκI x hTNFR2κI (серый) и hTNFκI x hTNFR2κI^{ΔTregs} (красный) мышах в норме.

Процентное содержание $CD44^{hi}CD62L^{lo}$ Т-клеток (А) и $FoxP3^+$ клеток (Б) от $CD4^+TCRb^+VD^-$ клеток в лимфатических узлах (ЛУ) и селезенке. Процентное содержание $CD25^+$ (В), $CTLA-4^+$ (Г), $GITR^+$ (Д), $CCR6^+$ (Е) клеток от $VD^-TCRb^+CD4^+FoxP3^+$ клеток. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Далее, была оценена экспрессия различных маркеров Т-регуляторных клеток, необходимых для подавления иммунного ответа с помощью проточной цитофлуориметрии по интенсивности флуоресценции. Оказалось, что удаление TNFR2 приводит к снижению экспрессии $FoxP3$, $CD25$, $CTLA-4$ и $GITR$, важных молекул, участвующих в поддержании супрессорного фенотипа Т-регуляторных клеток (Рис. 26). Снижение экспрессии супрессорных молекул на Treg клетках может приводить к нарушению их функций. Для подтверждения этого предположения была исследована

способность Treg клеток, выделенных из дважды гуманизированных мышей и мышей hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} ингибировать пролиферацию Т-клеток в функциональном тесте *in vitro*.

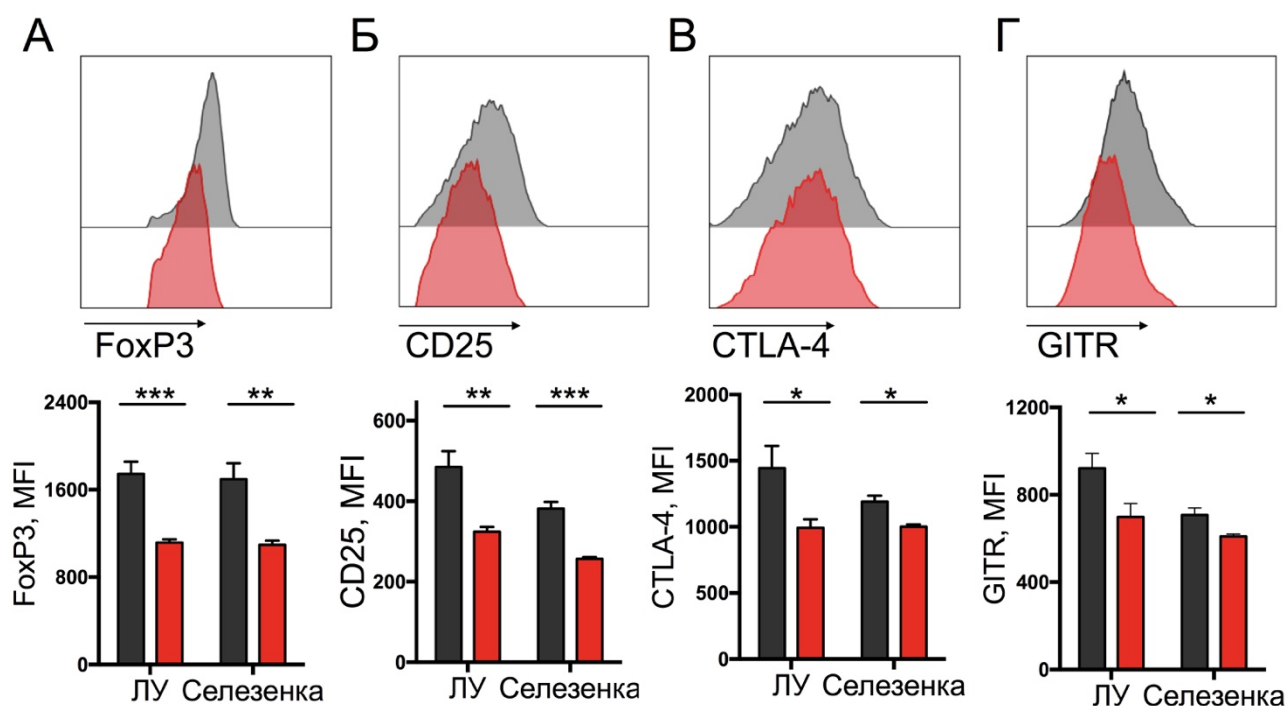


Рисунок 26. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к снижению экспрессии супрессорных молекул в норме.

А) Репрезентативные гистограммы и средние интенсивности флуоресценции (MFI) молекул FoxP3 (А), CD25 (Б), CTLA-4 (В), GITR (Г) от VD⁺TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница)

Для этого были выделены Treg клетки из вторичных лимфоидных органов дважды гуманизированных и hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей методом магнитной сепарации. После этого Treg клетки культивировали совместно с наивными Т-клетками, окрашенными флуоресцентной меткой, в присутствии активирующих сигналов. По степени разбавления флуоресцентной метки CTV оценивали пролиферацию Т-клеток в присутствии Treg клеток. Стратегия выделения популяций для анализа Т-клеточной

пролиферации с помощью цитофлуориметрического метода представлена на Рис.7 в Приложении 1.

Было обнаружено, что Treg клетки, выделенные из вторичных лимфоидных органов дважды гуманизированных мышей эффективно ингибируют пролиферацию Т-клеток (Рис.27 А, Г). Однако у Treg клеток, выделенных из hTNFКI х hTNFR2КI^{ΔTregs} мышей, способность к подавлению пролиферации снижена в несколько раз по сравнению с контрольной группой (Рис.27 Б, Г). В качестве технических контролей использовали Т-клетки без добавления Treg клеток, которые активно пролиферировали в ответ на активирующий стимул и Т-клетки без активации (Рис.27 В).

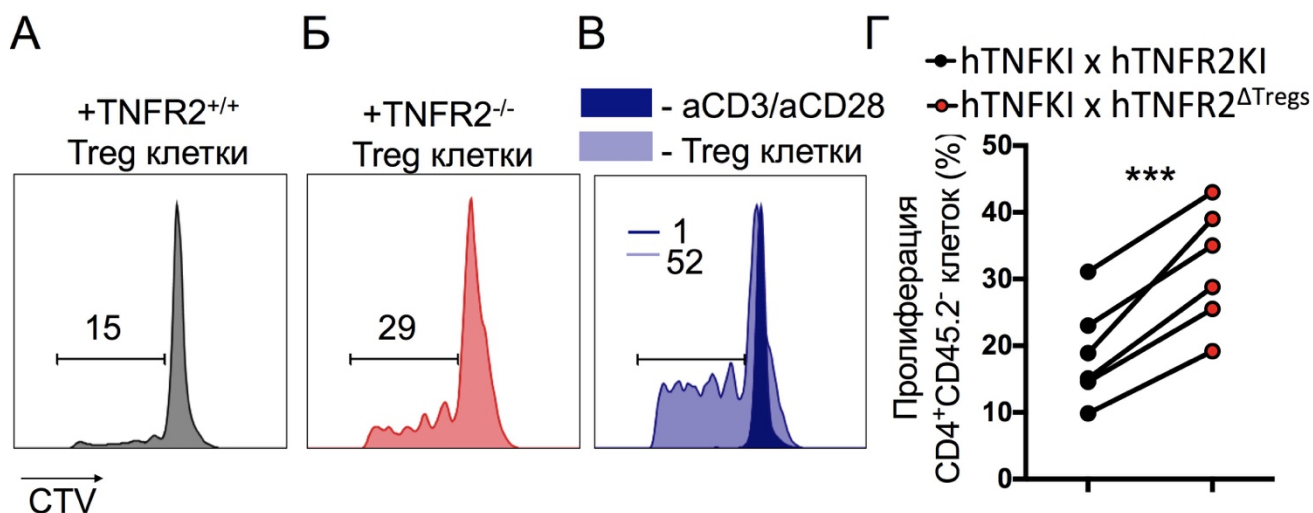


Рисунок 27. TNFR2 на Treg клетках необходим для подавления пролиферации Т-клеток

А) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток в присутствии Treg клеток, выделенных из hTNFКI х hTNFR2КI (А) и hTNFКI х hTNFR2КI^{ΔTregs} мышей (Б). В) Репрезентативные гистограммы пролиферации Т-клеток без активации (темно-синий) или без добавления Treg клеток (фиолетовый). Г) Процентное содержание пролиферации CD4⁺CD45.2⁻ клеток от VD- клеток, инкубированных с Treg клетками, выделенными из hTNFКI х hTNFR2КI и hTNFКI х hTNFR2КI^{ΔTregs} мышей. Представлены данные 6 независимых экспериментов по изучению пролиферации Т-клеток в присутствии Treg клеток из hTNFКI х hTNFR2КI (черный) и hTNFКI х hTNFR2КI^{ΔTregs} (красный) мышей. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

Таким образом, было показано, что TNFR2 участвует в поддержании фенотипа Т-регуляторных клеток и необходим для осуществления их супрессорных функций в нормальном состоянии.

3.2.3. Генетическая инактивация TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ и нарушению контроля Th17 клеток.

На предыдущем этапе было обнаружено, что TNFR2 необходим для поддержания супрессорных свойств Treg клеток в нормальном состоянии. Далее была исследована роль TNFR2 на Т-регуляторных клетках в контроле нейровоспаления в модели ЕАЕ. Для этого индуцировали заболевание у дважды гуманизированных мышей и hTNFKI х hTNFR2KI^{ΔTregs}. Было обнаружено, что кондиционное удаление TNFR2 на Т-регуляторных клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ (Рис. 28 А). Анализ ЦНС на пике заболевания выявил повышение общего количества инфильтрирующих клеток (Рис. 28 Б).

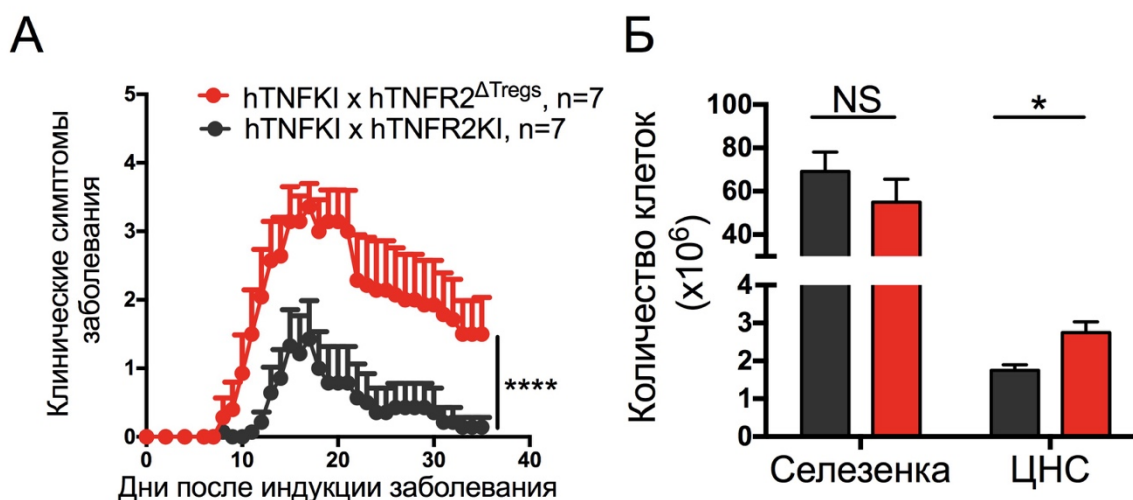


Рисунок 28. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к усилению клинических симптомов ЕАЕ и инфильтрации ЦНС.

А) Динамика клинических симптомов ЕАЕ у hTNFKI х hTNFR2KI (серый) hTNFKI х hTNFR2KI^{ΔTregs} (красный) мышей. Б) Количество клеток в селезенке и инфильтрация ЦНС у hTNFKI х hTNFR2KI (серый) и hTNFKI х hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента (Б) и 2-way ANOVA тестов (А). Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Далее исследовали фенотип Treg клеток и экспрессию супрессорных молекул у hTNFKI х hTNFR2KI^{ΔTregs} мышей в сравнении с дважды гуманизированными мышами на эффекторной фазе ЕАЕ. Было обнаружено, что мыши с делецией TNFR2 на Treg клетках

характеризуются сниженным содержанием $CD25^+$ и $CCR6^+$ Treg клеток как на периферии, так и в ЦНС по сравнению с контрольными мышами (Рис. 29 Б, Д). Кроме того, наблюдали небольшое снижение доли $GITR^+$ Treg клеток у $hTNFKI \times hTNFR2KI^{\Delta Tregs}$ мышей (Рис. 29 Г). Помимо этого, так же, как и в нормальном состоянии, удаление $TNFR2$ приводит к снижению экспрессии $FoxP3$, $CD25$, $CTLA-4$ и $GITR$ на Т-регуляторных клетках как на периферии, так и в ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ, что свидетельствует о нарушении супрессорных свойств Treg клеток (Рис. 30). Кроме того, было обнаружено, что у $hTNFKI \times hTNFR2KI^{\Delta Tregs}$ мышей наблюдается повышение процентного содержания MOG-специфических $Th17$ клеток, но не $Th1$ и T_{GM-CSF} клеток, в селезенке и ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ (Рис.31 А)

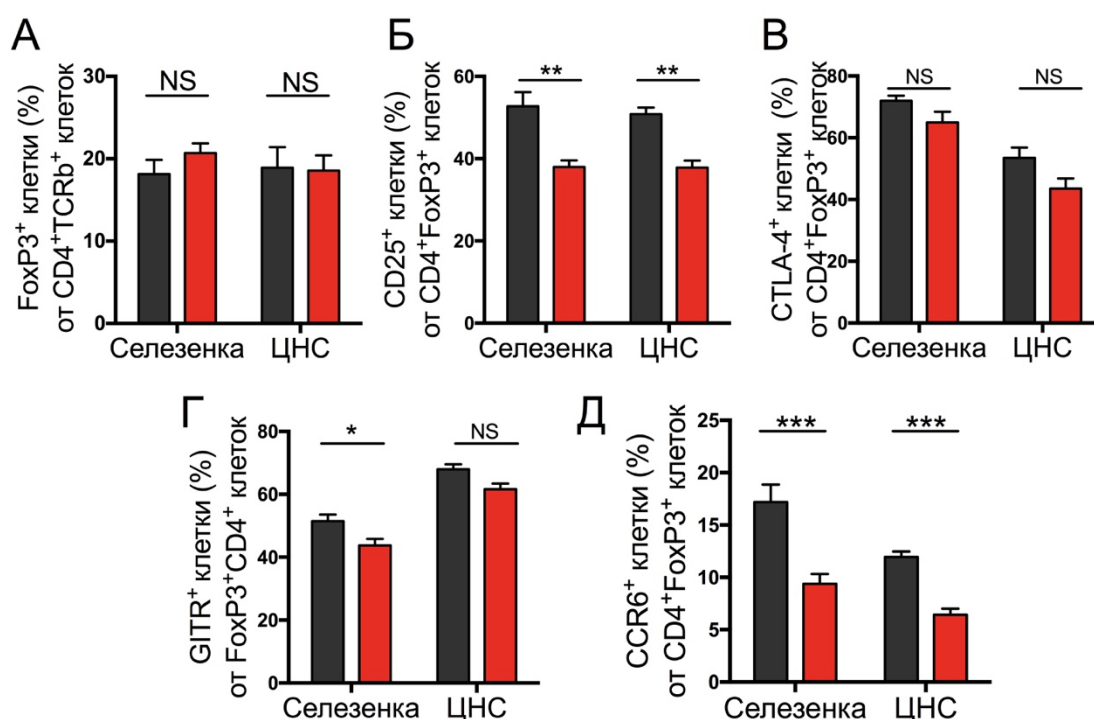


Рисунок 29. Анализ процентного содержания популяций Treg клеток в $hTNFKI$ и $hTNFR2KI$ (серый) и $hTNFKI \times hTNFR2KI^{\Delta Tregs}$ (красный) мышах на эффекторной фазе ЕАЕ.

Процентное содержание $FoxP3^+$ клеток (А) от $CD4^+TCRb^+VD^-$ клеток в селезенке и ЦНС. Процентное содержание $CD25^+$ (Б), $CTLA-4^+$ (В), $GITR^+$ (Г), $CCR6^+$ (Д) клеток от $VD^-TCRb^+CD4^+FoxP3^+$ клеток. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ $****p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

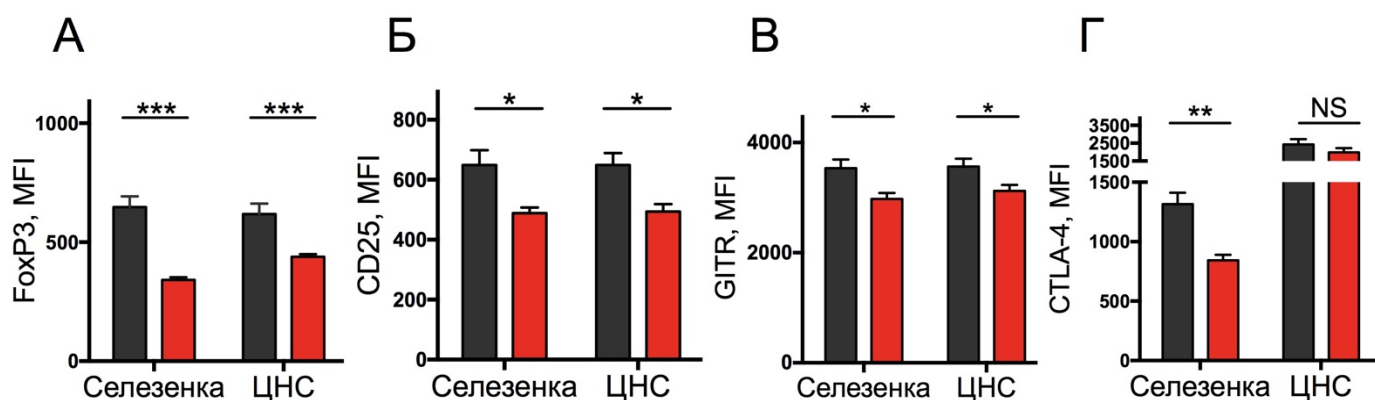


Рисунок 30. Анализ экспрессии супрессорных молекул Treg клеток у hTNFκI и hTNFR2κI (серый) и hTNFκI x hTNFR2κI^{ΔTregs} (красный) мышей на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Средние интенсивности флуоресценции (MFI) молекул FoxP3 (А), CD25 (Б), CTLA-4 (В), GITR (Г) от VD⁻TCRb⁺CD4⁺FoxP3⁺ клеток. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, non-significant (недостоверная разница).

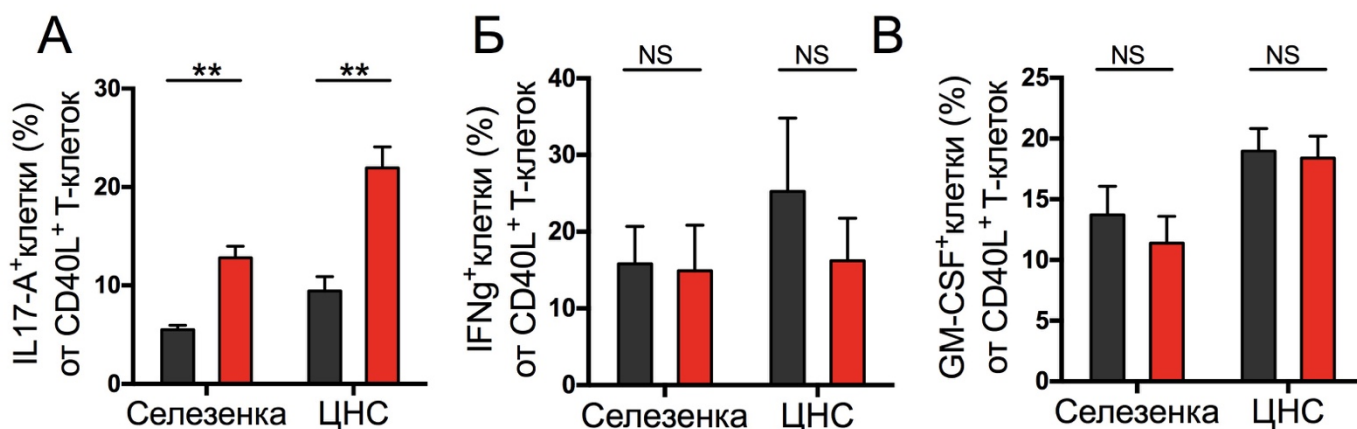


Рисунок 31. Удаление TNFR2 на Treg клетках приводит к повышению процентного содержания Th17 клеток в селезенке и ЦНС на эффекторной фазе ЕАЕ.

А) Процентное содержание IL-17A⁺ (А), IFN-γ⁺ (Б) и GM-CSF⁺ (В) Т-клеток от CD4⁺CD40L⁺ клеток, рестимулированных MOG-пептидом в присутствии брефельдина. Результаты представлены как среднее значение ± SEM и подтверждены в 3 независимых экспериментах. В каждой группе представлено по 4 мыши. Статистический анализ был проведен с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; NS, nonsignificant (недостоверная разница).

Таким образом, было обнаружено, что TNFR2 на Treg клетках играет протективную роль при нейровоспалении. Было показано, что TNFR2 участвует в поддержании фенотипа T-регуляторных клеток, способствует миграции в сайт воспаления за счет поддержания CCR6⁺Treg клеток и обеспечивает контроль патогенных Th17 клеток в модели EAE.

Обсуждение

Иммунотерапия, направленная на изменение и модулирование иммунного ответа, является перспективным направлением в создании лекарственных препаратов против раковых и аутоиммунных заболеваний. В последнее время большое внимание уделяется изучению молекулярных механизмов действия провоспалительных цитокинов. Поскольку детальное понимание регуляции цитокиновой системы и иммунного ответа необходимо для создания более специфичных реагентов и снижения побочных эффектов существующей терапии.

Действительно, для многих цитокинов характерно плеiotропное влияние на организм. К примеру, TNF, изначально открытый как противоопухолевый агент, обладает рядом важных физиологических функций, необходимых для поддержания гомеостаза. А его повышенная продукция, наоборот, может приводить к развитию раковых и аутоиммунных заболеваний.

В настоящее время активно изучается роль микроокружения опухоли, которое состоит из клеток иммунной системы, фибробластов и кровеносных сосудов, в развитии самой опухоли и опухолевой ниши. Оказалось, что важной популяцией опухолевого микроокружения являются миелоидные супрессорные клетки (MDSC). В нескольких работах с использованием генетических систем было показано, что TNF может способствовать развитию MDSC (Sander, et al., 2010, Zhao, et al., 2012). Так, генетическая инактивация TNF или TNFR2 приводила к снижению роста перевиваемой опухолевой линии FB61 фибросаркомы и накоплению MDSC. Кроме того, было показано, что TNF способствует выживанию MDSC за счет стимулирования экспрессии антиапоптотических белков (Zhao, et al., 2012).

В настоящей работе было выдвинуто предположение, что фармакологическая нейтрализация TNF может подавлять супрессорные свойства MDSC и тем самым влиять на развитие опухоли. При этом в литературе известно, что нейтрализация TNF с помощью моноклональных антител в мышинной модели солидной опухоли FB61 фибросаркомы приводила к снижению роста опухоли и доли MDSC в селезенке мышей линии BALB/c (Zhao, et al., 2012). В другой экспериментальной системе введение блокатора Этанерцепт на раннем этапе BCG-индуцированного хронического воспаления приводило к снижению количества MDSC и уменьшению их супрессорных свойств (Sade-Feldman, et al., 2013).

В связи с этим, представлялось интересным изучить действие клинически применяемых блокаторов TNF человека на рост и развитие опухоли у hTNFKI мышей. Однако нельзя было исключить, что эти мыши будут иметь нарушенный TNFR2 сигнальный путь, так

как в более ранних биохимических исследованиях было показано ослабленное взаимодействие hTNF с mTNFR2 по сравнению с hTNFR2 (Bossen, et al., 2006). При этом TNFR2 сигнальный каскад показан как критический для аккумуляции MDSC и роста перевиваемой солидной опухоли (Zhao, et al., 2012). Тем не менее, мы не обнаружили разницы в динамике роста MCA205 фибросаркомы и количестве MDSC у мышей дикого типа C57BL/6 и гуманизированных по гену *TNF* hTNFKI мышей (Рис.9 А, Б). Кроме того, опухоль-ассоциированное накопление MDSC при введении опухолевой линии EL4 Т-клеточной лимфомы не отличалось у мышей дикого типа и hTNFKI (данные не представлены). Таким образом, мыши с гуманизацией по гену *TNF* развивают опухоли и опухоль-ассоциированные MDSC с той же динамикой как мыши дикого типа, что делает возможным изучение последствий фармакологической нейтрализации TNF человеческими блокаторами в этих мышах.

Действительно, было обнаружено, что введение блокаторов TNF, таких как Этанерцепт или Инфликсимаб, приводит к снижению роста опухоли и накопления MDSC. Интересно, что блокатор Этанерцепт, представляющий собой слитный белок из TNFR2 и Fc части IgG1, может нейтрализовать действие не только TNF, но и растворимой формы лимфотоксина ($LT\alpha_3$). Несмотря на то, что введение обоих блокаторов снижало рост опухоли и накопление MDSC (Рис.11, Рис.12), были обнаружены небольшие различия в эффекте нейтрализации TNF с двумя типами блокаторов. Так, фармакологическая нейтрализация TNF Этанерцептом или Инфликсимабом приводила не только к снижению количества MDSC в крови и во вторичных лимфоидных органах (Рис.13), но и к увеличению количества цитотоксических Т-клеток, выделенных как $CD8^+IFN-\gamma^+$ клетки (Тс1 клетки) (Рис.14 В). При этом введение Этанерцепта, но не Инфликсимаба, достоверно увеличивало процентное содержание Тс1 клеток (Рис.14 Б.). Из литературы известно, что блокаторы, помимо блокировки TNF, могут иметь эффекты на иммунную систему, к примеру, известно, что Инфликсимаб, Адалимуаб, Цертолизумаб пегол, но не Этанерцепт, способны опосредованно ингибировать продукцию IL-1 в моноцитах (Nesbitt et al., 2007). В свою очередь, IL-1 может вызывать экспансию $CD8^+$ Т-клеток (Ben-Sasson et al., 2013). Предположительно, такие небольшие различия в эффектах фармакологической нейтрализации TNF блокаторами, Этанерцептом или Инфликсимабом, в первую очередь, могут быть связаны с различиями в их структуре (Billmeier et al., 2016), механизме действия, а также взаимодействием Этанерцепта с растворимой формой $LT\alpha_3$.

Далее, было исследовано влияние фармакологической нейтрализации TNF на супрессорные свойства MDSC. Нейтрализация TNF с помощью блокаторов Этанерцепта или Инфликсимаба приводит к снижению продукции NO в моноцитарной популяции MDSC (Рис.15 А), при этом уровень ROS⁺MDSC достоверно снижается только при введении Этанерцепта (Рис.15 Б). Тем не менее, в функциональном тесте MDSC, выделенные из мышей с опухолями на фоне нейтрализации TNF Этанерцептом или Инфликсимабом, не подавляли Т-клеточную пролиферацию. Таким образом, нейтрализация TNF Инфликсимабом или нейтрализация TNF/LT α_3 Этанерцептом приводила к снижению роста опухоли, количества MDSC и нарушением их супрессорных свойств, что согласуется с ранее полученными данными в экспериментах с мышинными блокаторами TNF в другой опухолевой модели (Zhao, et al., 2012), а также в модели хронического воспаления с использованием Этанерцепта (Sade-Feldman, et al., 2013). Суммарно, полученные результаты дополняют понимание о возможном вкладе TNF развитие канцерогенеза, в частности, за счет поддержания супрессорных свойств MDSC. При этом эффективность фармакологической нейтрализации TNF в модели солидной опухоли указывает на перспективность использования таргетной блокировки TNF в MDSC в качестве нового подхода для иммунотерапии раковых заболеваний.

В то же время TNF является мишенью для блокировки при аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона и псориаз. Однако системная анти-TNF терапия оказалась неуспешной при нейровоспалении. Кроме того, применение блокаторов TNF может приводить к развитию побочных эффектов, таких как демиелинизация. Поэтому было сделано предположение, что TNF может играть протективную роль при нейровоспалении.

На сегодняшний день известно, что возможная протективная роль TNF при нейровоспалении опосредуется через TNFR2 (Tsakiri, et al., 2012). Однако детальный механизм действия TNFR2 не был до конца изучен. Так, известно, что TNFR2 необходим для пролиферации предшественников олигодендроцитов. А удаление TNFR2 на клетках микроглии приводит к усилению клинических симптомов EAE, тогда как генетическая инактивация TNFR2 на моноцитах, наоборот, снижает симптомы заболевания и инфильтрацию ЦНС (Gao, et al., 2017). Учитывая важную роль TNFR2 при нейровоспалении, было сделано предположение, что гуманизация TNF и возможное нарушенное взаимодействие hTNF с mTNFR2 может влиять на развитие EAE.

Действительно, было обнаружено, что мыши с гуманизацией TNF имеют сниженное содержание Т-регуляторных клеток и усиленные клинические симптомы

экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ) (Рис. 18, Рис. 19). Наши данные указывают на возможную протективную роль TNFR2 в контроле нейровоспаления, что согласуется с ранее опубликованными данными с полным нокаутом по TNFR2 (Tsakiri, et al., 2012). Поэтому для восстановления полноценной передачи сигнала в мышцах, гуманизированных по гену TNF, было необходимо «гуманизировать» ген рецептора TNFR2. Было обнаружено, что дополнительная гуманизация TNFR2 приводит к восстановлению содержания Т-регуляторных клеток, кроме того, такие мыши развивают ЕАЕ сравнимо с контрольными мышами дикого типа (Рис. 19). Кроме того, мы обнаружили, что hTNFKI мыши характеризуются пониженной экспрессией FoxP3 в Treg клетках (Рис. 21), а также долей CCR6⁺ Treg клеток на периферии по сравнению с мышами дикого типа и дважды гуманизированными мышами (Рис.23 Г). Известно, что CCR6 необходим для миграции Treg клеток в ЦНС, поэтому сниженное содержание CCR6⁺ Treg клеток может свидетельствовать о нарушении миграции Treg клеток в сайт воспаления, что в дальнейшем может приводить к усилению воспаления в ЦНС. Действительно, у hTNFKI мышей увеличена доля Th17 клеток в ЦНС по сравнению с мышами дикого типа и дважды гуманизированными мышами при ЕАЕ (Рис.24 Б). Таким образом, TNFR2 действительно играет защитную роль при нейровоспалении, предположительно за счет иммунорегуляторной функции TNF в отношении Treg клеток.

Однако на сегодняшний день роль TNFR2 в развитии Treg клеток неоднозначна. Так, результаты ранних работ на мышях с полным нокаутом по TNFR2 говорят о протективной роли TNFR2 на стромальных клетках, но не на Treg клетках, в контроле нейровоспаления (Tsakiri, et al., 2012). Также существуют данные, что TNF через TNFR2 подавляет супрессорные свойства Treg клеток (Valencia, et al., 2006). Наряду с этим, существуют исследования, в которых показано, что анти-TNF терапия приводит к увеличению количества Treg клеток и усиливает их супрессорные свойства у пациентов с IBD и артритом (Boschetti, et al., 2011, Nie, et al., 2013). Однако в случае с блокаторами TNF нельзя исключать тот факт, что увеличение количества Treg клеток или усиление их супрессорных свойств может быть опосредовано через так называемый обратный сигналинг от блокаторов TNF. В подтверждение этого предположения, существует исследование, в котором показано, что введение Адалимуаба приводит к экспансии TNFR2⁺Treg клеток за счет усиления их взаимодействия с моноцитами через tmTNF (Nguyen, et al., 2016). Кроме того, опубликованы работы, в которых показана роль TNF/TNFR2 в стимуляции супрессорных функций Treg клеток (Chen, et al., 2007, Yang et al., 2018).

Чтобы более детально разобраться в механизме действия TNFR2 на Treg клетках и изучить его роль при нейровоспалении, были созданы мыши с генетическим удалением TNFR2 на Treg клетках. Удаление TNFR2 на Treg клетках действительно нарушает их супрессорные функции в нормальном состоянии. Так, происходит снижение экспрессии FoxP3 и FoxP3-зависимых генов, как CD25, CTLA-4 и GITR (Рис.26). Известно, что активация GITR необходима для поддержания супрессорных свойств Treg клеток, в том числе за счет поддержания транскрипции FoxP3 (Vasanthakumar, et al., 2017), тогда как молекулы CD25 и CTLA-4 активно участвуют в супрессии иммунного ответа. Так, для Treg клеток характерна высокая экспрессия молекулы CD25, одной из субъединиц рецептора IL-2R, с помощью которого эти клетки конкурентно связывают IL-2, фактор пролиферации и выживания конвенциональных Т-клеток. За счет экспрессии CTLA-4 Treg клетки способны ингибировать взаимодействие АПК с конвенциональными Т-клетками. Действительно, в функциональном тесте было подтверждено, что эти изменения влияют на супрессорные свойства Treg клеток (Рис.27 Г). При этом, можно предположить, что нарушенные функции Treg клеток могут влиять на поддержание гомеостаза в организме в нормальном состоянии. Так, мы обнаружили, что у мышей с делецией TNFR2 в Treg клетках происходит накопление эффекторных CD44^{hi}CD62L^{lo} клеток, а также самих Treg клеток во вторичных лимфоидных органах, что может свидетельствовать о наличии небольшого воспаления у нокаутных мышей и нарушения поддержания гомеостаза организма в норме (Рис. 25 А, Б). Примечательно, что доля CCR6⁺Treg клеток также снижена у мышей с делецией TNFR2 на Treg клетках (Рис.25 Е), как было обнаружено и у hTNFKI мышей (Рис.23 Г)

Тем самым, было обнаружено, что TNFR2 участвует в поддержании супрессорных свойств Treg клеток и необходим для регуляции иммунного ответа в норме. Более того, в дальнейшем было показано, что экспрессия TNFR2 на Treg клетках необходима для контроля нейровоспаления. При удалении TNFR2 на Treg клетках происходит усиление клинических симптомов ЕАЕ и инфильтрации ЦНС (Рис.28). Кроме того, экспрессия маркеров FoxP3, CD25, CTLA-4, GITR снижена на Treg клетках с делецией TNFR2 как на периферии, так и в ЦНС (Рис. 30). Также hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} мыши характеризуются сниженным содержанием CCR6⁺ популяции Treg клеток (Рис.29 Д). Как ранее было отмечено, CCR6 на Treg клетках необходим для их миграции в ЦНС (Yamazaki et al., 2008). При этом есть данные о существовании популяции RORγt⁺CCR6⁺ Treg клеток, которые специфически участвуют в контроле Th17-зависимого иммунного ответа, в том числе и при ЕАЕ (Kim et al., 2017). Таким образом, снижение CCR6⁺Treg

клеток может свидетельствовать о возможном нарушении иммунного ответа в ЦНС, в частности в регуляции Th17 клеток. Действительно, у мышей с делецией TNFR2 на Treg клетках происходит увеличение содержания Th17 клеток, но не Th1 и T_{GM-CSF} клеток (Рис.31).

Суммарно, наши данные подтверждают протективную роль TNFR2 при нейровоспалении, а TNFR2 на Treg клетках играет важную иммунорегуляторную роль за счет поддержания их супрессорного фенотипа.

Интересно, что в ранних работах с использованием мышей с полным нокаутом по TNFR2 авторы продемонстрировали снижение количества Treg клеток и увеличение Th17 клеток. Тем не менее, авторы утверждали, что TNFR2⁺Treg клетки не участвуют в подавлении аутоиммунитета, а экспрессия TNFR2 необходима на стромальных клетках в экспериментах с использованием костномозговых химер. Однако результаты нашей работы с использованием мышинной модели с возможностью прицельного удаления TNFR2 на Treg клетках позволили дополнить и конкретно указать на иммунорегуляторную роль TNFR2 в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток. Кроме того, в недавних работах использование агониста TNFR2 в экспериментальных моделях артрита или заболевания трансплантат против хозяина (GvHD) приводило к экспансии Treg клеток у мышей (Chopra, et al., 2016, Lamontain, et al., 2019). Вдобавок к этому, было отмечено, что наиболее супрессорная популяция Treg клеток экспрессирует TNFR2 на высоком уровне (Chen, et al., 2010, Chen, et al., 2008). Однако детальный механизм того, как именно TNFR2 участвует в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток, не до конца понятен. При этом, в одном из исследований было показано, что TNF-зависимая активация каспаз может приводить к деградации FoxP3. Интересно, что при удалении TNFR2 в Treg клетках происходит как раз снижение уровня FoxP3. Тем самым, можно предположить, что в Treg клетках, у которых TNFR2 экспрессирован на высоком уровне, происходит в большей мере активация NF-κB сигнального пути, но не TNFR1-зависимой активации каспаз. Кроме того, ранее было показано, что NF-κB сигнальный путь необходим для первичной индукции гена FoxP3 и последующей его активации (Vasanthakumar, et al., 2017). С другой стороны, учитывая, что TNFR2 на более высоком уровне экспрессирован на Treg клетках, можно предположить, что Treg клетки могут также, как в случае с CD25, конкурировать за взаимодействие с TNF, и тем самым снижать активацию конвенциональных Т-клеток.

Таким образом, мы показали, что TNF, помимо своей ключевой роли в воспалении, может участвовать в поддержании супрессорного фенотипа MDSC и Treg клеток. При

этом в случае раковых заболеваний необходимо ингибировать супрессорное микроокружение, а в случае аутоиммунитета, наоборот, активировать. Интересно, что уже существуют блокаторы и агонисты TNFR2, действие которых исследуют в различных мышинных моделях аутоиммунитета и рака, а также на раковых клетках человека (Lamontain, et al., 2019, Okubo et al., 2013). Кроме того, гуманизированные системы по цитокину или рецептору позволят изучить эффект человеческих блокаторов или агонистов TNF или TNFR2. В нашей работе были изучены мыши, как гуманизированные по цитокину, так и дважды гуманизированные мыши по TNF и TNFR2. При этом развитие многих экспериментальных моделей заболеваний, таких как сепсис, артрит, туберкулез, в hTNFKI мышах не отличалось от мышей дикого типа. Более того, несмотря на ключевую роль TNFR2 в развитии MDSC, разницы в накоплении MDSC и развитии солидной опухоли MCA205 было не обнаружено. Однако, нельзя исключать тот факт, что в нашей модели сами опухолевые клетки способны выделять mTNF, который через mTNFR2 может способствовать накоплению MDSC. Эксперименты с исследованием развития MDSC и Treg клеток у hTNFKI мышей, а также в дважды гуманизированных мышах в опухолевой модели могут в будущем дополнить данные о роли TNF в развитии супрессорного микроокружения. Тем не менее, нам удалось продемонстрировать эффект нейтрализации hTNF на рост опухоли и накопление MDSC. В случае с мышинной моделью рассеянного склероза нарушение сигнального пути TNF/TNFR2 в результате гуманизации TNF оказалось критичным для развития EAE. Поэтому дважды гуманизированные мыши могут представлять более релевантную модель для изучения действия агонистов или антагонистов TNF/TNFR2-сигнального пути, которые позволят модулировать иммунный ответ при различных патологиях. Вдобавок, более специфическая фармакологическая блокировка TNF может позволить избежать ряда побочных эффектов.

Таким образом, мы показали, что TNF участвует в поддержании супрессорного микроокружения при аутоиммунных и раковых заболеваниях.

Заключение

В ходе настоящей работы была экспериментально продемонстрирована эффективность фармакологической нейтрализации TNF с помощью клинически применяемых блокаторов TNF человека в снижении опухолевого роста. Для изучения влияния блокаторов TNF человека использовали уникальных мышей, гуманизированных по гену *TNF*. Гуманизированные мыши представляют собой удобную модель для предклинических исследований как существующих блокаторов, так и разрабатываемых антагонистов. В работе были изучены последствия фармакологической нейтрализации TNF блокаторами Инфликсимабом или Этанерцептом на опухолевое микроокружение. Так, введение блокаторов TNF приводило к пониженному накоплению MDSC в организме мыши и снижению их супрессорных функций. Результаты данной работы подтверждают важность TNF-опосредованного сигнального пути в регуляции MDSC в контексте опухолевого роста, что позволяет потенциально рассматривать TNF и MDSC как мишени для иммунотерапии рака. Дальнейшие исследования с использованием более специфических блокаторов, к примеру, с возможностью инактивации TNF только в миелоидных клетках или в MDSC, могут показать эффективность такой терапии в раковых моделях. Поиск новых мишеней для терапии аутоиммунных и опухолевых заболеваний необходим, поскольку системная анти-TNF терапия сопряжена с различными побочными эффектами, в том числе и реактивацией туберкулеза и демиелинизацией.

Во второй части работы было показано, что TNFR2-опосредованный сигнальный каскад играет важную роль в поддержании супрессорного фенотипа Treg клеток в норме и при нейровоспалении. Было экспериментально продемонстрировано, что мыши с гуманизацией гена *TNF* могут иметь нарушенный TNF/TNFR2 сигнальный путь, критичный для контроля нейровоспаления, но не опухолевого роста. При этом дополнительная гуманизация TNFR2 приводила к нормализации иммунного ответа при нейровоспалении, что свидетельствует о важной иммунорегуляторной роли TNFR2 в этом процессе. Далее, используя мышей с возможностью кондиционного удаления TNFR2, было показано, что TNFR2 на Treg клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа. При этом генетическая инактивация TNFR2 на Treg клетках приводила к снижению экспрессии ключевых супрессорных молекул, что было сопряжено с подавлением их супрессорных функций. Более того, установлено, что TNFR2 на Treg клетках играет протективную роль при нейровоспалении. Так, TNFR2 на Treg клетках

необходим для поддержания их супрессорного фенотипа, доли CCR6⁺ популяции Treg клеток, мигрирующих в ЦНС, а также для контроля Th17-зависимого иммунного ответа при ЕАЕ, мышинной модели рассеянного склероза. Таким образом, удалось экспериментально показать, что TNF через TNFR2 на Treg клетках обеспечивает протективный сигнал при нейровоспалении.

Суммируя все вышесказанное, роль TNF в развитии аутоиммунных и раковых заболеваний неоднозначна. С одной стороны, блокировка TNF может рассматриваться, как потенциальная мишень для иммунотерапии солидных опухолей за счет снижения воспаления и последующего накопления MDSC. С другой стороны, TNF обладает иммунорегуляторными функциями, в частности, через TNFR2 на Treg клетках, он участвует в контроле нейровоспаления. Результаты работы свидетельствуют о необходимости разработки новых подходов терапии аутоиммунных и раковых заболеваний с нейтрализацией TNF в определенном типе клеток, которые являются источником патогенного цитокина и вносят ключевой вклад в развитие заболевания, при этом сохраняя защитные функции этого цитокина из других клеточных источников.

Выводы

1. Фармакологическая нейтрализация TNF клинически применяемыми блокаторами, Инфликсимабом или Этанерцептом, замедляет рост MCA205 фибросаркомы.
2. Системная блокировка TNF Инфликсимабом или Этанерцептом подавляет накопление и супрессорную активность MDSC у мышей с MCA205 фибросаркомой.
3. TNFR2 на T-регуляторных клетках необходим для поддержания их супрессорного фенотипа и функциональной активности в нормальном состоянии.
4. В экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите, мышинной модели рассеянного склероза, TNFR2 на T-регуляторных клетках играет защитную роль.
5. Передача сигнала через TNFR2 на T-регуляторных клетках необходима для контроля Th17-зависимого иммунного ответа при нейровоспалении.

Благодарности

Хочу искренне поблагодарить своих научных руководителей Сергея Артуровича Недоспасова и Марину Сергеевну Друцкую за всестороннюю поддержку на всех этапах работы, постоянную мотивацию, за помощь в постановке научной задачи, планировании экспериментов и обсуждении результатов. Я также очень благодарна своим руководителям за предоставление возможности участвовать в колаборативных проектах, стажировках и конференциях, которые позволили получить бесценный опыт и знания.

Хочу поблагодарить Муфазалова Ильгиза Альбертовича за обучение методам, получении экспериментальных данных на отдельных этапах работы, за ценные советы и замечания.

Хочу выразить благодарность Андрею Алексеевичу Круглову за ценные советы и замечания в ходе написании научной статьи.

Благодарю Максима Носенко за ценные советы, идеи, помощь на многих этапах работы и моральную поддержку.

Выражаю огромную признательность Виолетте Гоголевой за помощь в проведении экспериментов, обсуждении результатов, а также постоянную мотивацию и моральную поддержку в ходе работы.

Большое спасибо Зварцеву Р.В., Губернаторовой Е.О., Горшковой Е.А., Намакановой О.А., и всем нынешним и бывшим сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН за помощь в процессе экспериментальной работы и дружественную атмосферу.

Я очень благодарна Рафаелу Шазновичу Казаряну за организационную помощь на всех этапах работы, моральную поддержку и ценные советы. Благодарю также Дмитрия Борисовича Киселевского, Нину Владимировну Взорovu за организационную помощь в ходе выполнения работы.

Хочу поблагодарить всех сотрудников и преподавателей кафедры иммунологии МГУ за прекрасные лекции, семинары и обучение методам на практикуме.

Большое спасибо зарубежным колабораторам и коллегам Ари Вайсману, Жозефине Данст, Давиду Андрюшевки, Денис Фаустман, Марко Принцу, Мариусу Швабенлаунду за предоставление ресурсов и помощь в написании научной статьи.

Также я безумно благодарна своей семье, друзьям и учителям за то, что искренне верили в меня, понимали, поддерживали, были рядом в тяжелые моменты жизни и направляли на правильный путь.

Список литературы

Alexopoulou L., Kranidioti K., Xanthouleas S., Denis M., Kotanidou A., Douni E., Blackshear P.J., Kontoyiannis D.L. and Kollias G. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity // *Eur J Immunol.* 2006. V. 36. №. 10. P. 2768-2780.

Allie N., Grivennikov S.I., Keeton R., Hsu N.J., Bourigault M.L., Court N., Fremont C., Yermeev V., Shebzukhov Y., Ryffel B., Nedospasov S.A., Quesniaux V.F. and Jacobs M. Prominent role for T cell-derived tumour necrosis factor for sustained control of *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Sci Rep.* 2013. V. 3. №. P. 1809.

Asadzadeh Z., Mohammadi H., Safarzadeh E., Hemmatzadeh M., Mahdian-Shakib A., Jadidi-Niaragh F., Azizi G. and Baradaran B. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity // *Cell Immunol.* 2017. V. 322. №. P. 15-25.

Atretkhany K.N., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Grivennikov S.I. and Kuprash D.V. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment // *Pharmacol Ther.* 2016. V. 168. №. P. 98-112.

Bauswein M., Singh A., Ralhan A., Neri D., Fuchs K., Blanz K.D., Schafer I., Hector A., Handgretinger R., Hartl D. and Rieber N. Human T cells modulate myeloid-derived suppressor cells through a TNF-alpha-mediated mechanism // *Immunol Lett.* 2018. V. 202. №. P. 31-37.

Bean A.G., Roach D.R., Briscoe H., France M.P., Korner H., Sedgwick J.D. and Britton W.J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin // *J Immunol.* 1999. V. 162. №. 6. P. 3504-3511.

Ben-Sasson S.Z., Hogg A., Hu-Li J., Wingfield P., Chen X., Crank M., Caucheteux S., Ratner-Hurevich M., Berzofsky J.A., Nir-Paz R. and Paul W.E. IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells // *J Exp Med.* 2013. V. 210. №. 3. P. 491-502.

Benson M.J., Pino-Lagos K., Roseblatt M. and Noelle R.J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation // *J Exp Med.* 2007. V. 204. №. 8. P. 1765-1774.

Billmeier U., Dieterich W., Neurath M.F. and Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases // *World J Gastroenterol.* 2016. V. 22. №. 42. P. 9300-9313.

Boschetti G., Nancey S., Sardi F., Roblin X., Flourie B. and Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases // *Inflamm Bowel Dis*. 2011. V. 17. №. 1. P. 160-170.

Bossen C., Ingold K., Tardivel A., Bodmer J.L., Gaide O., Hertig S., Ambrose C., Tschopp J. and Schneider P. Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human // *J Biol Chem*. 2006. V. 281. №. 20. P. 13964-13971.

Burman J., Svensson E., Fransson M., Loskog A.S., Zetterberg H., Raininko R., Svenningsson A., Fagius J. and Mangsbo S.M. The cerebrospinal fluid cytokine signature of multiple sclerosis: a homogenous response that does not conform to the Th1/Th2/Th17 convention // *J Neuroimmunol*. 2014. V. 277. №. 1-2. P. 153-159.

Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N. and Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975. V. 72. №. 9. P. 3666-3670.

Chen X., Baumel M., Mannel D.N., Howard O.M. and Oppenheim J.J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells // *J Immunol*. 2007. V. 179. №. 1. P. 154-161.

Chen X., Subleski J.J., Hamano R., Howard O.M., Wiltout R.H. and Oppenheim J.J. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human peripheral blood // *Eur J Immunol*. 2010. V. 40. №. 4. P. 1099-1106.

Chen X., Subleski J.J., Kopf H., Howard O.M., Mannel D.N. and Oppenheim J.J. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells // *J Immunol*. 2008. V. 180. №. 10. P. 6467-6471.

Chen X., Wu X., Zhou Q., Howard O.M., Netea M.G. and Oppenheim J.J. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment // *J Immunol*. 2013. V. 190. №. 3. P. 1076-1084.

Chen Z., Hagler J., Palombella V.J., Melandri F., Scherer D., Ballard D. and Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway // *Genes Dev*. 1995. V. 9. №. 13. P. 1586-1597.

Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., Gasteiger G., Feng Y., Fontenot J.D. and Rudensky A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function // *Nat Immunol*. 2016. V. 17. №. 11. P. 1322-1333.

Chopra M., Biehl M., Steinfatt T., Brandl A., Kums J., Amich J., Vaeth M., Kuen J., Holtappels R., Podlech J., Mottok A., Kraus S., Jordan-Garrote A.L., Bauerlein C.A., Brede C., Ribechini E., Fick A., Seher A., Polz J., Ottmuller K.J., Baker J., Nishikii H., Ritz M., Mattenheimer K., Schwinn S., Winter T., Schafer V., Krappmann S., Einsele H., Muller T.D., Reddehase M.J., Lutz M.B., Mannel D.N., Berberich-Siebelt F., Wajant H. and Beilhack A. Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion // *J Exp Med*. 2016. V. 213. №. 9. P. 1881-1900.

Collison L.W. and Vignali D.A. In vitro Treg suppression assays // *Methods Mol Biol*. 2011. V. 707. №. P. 21-37.

Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S. and Vignali D.A. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function // *Nature*. 2007. V. 450. №. 7169. P. 566-569.

Compston A. and Coles A. Multiple sclerosis // *Lancet*. 2008. V. 372. №. 9648. P. 1502-1517.

Constantinescu C.S., Farooqi N., O'Brien K. and Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) // *Br J Pharmacol*. 2011. V. 164. №. 4. P. 1079-1106.

Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Carcamo C.V., Hall J., Sun C.M., Belkaid Y. and Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism // *J Exp Med*. 2007. V. 204. №. 8. P. 1757-1764.

Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B. and Robson S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression // *J Exp Med*. 2007. V. 204. №. 6. P. 1257-1265.

Delano M.J., Scumpia P.O., Weinstein J.S., Coco D., Nagaraj S., Kelly-Scumpia K.M., O'Malley K.A., Wynn J.L., Antonenko S., Al-Quran S.Z., Swan R., Chung C.S., Atkinson M.A., Ramphal R., Gabrilovich D.I., Reeves W.H., Ayala A., Phillips J., Laface D., Heyworth P.G., Clare-Salzler M. and Moldawer L.L. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis // *J Exp Med*. 2007. V. 204. №. 6. P. 1463-1474.

Dendrou C.A., Fugger L. and Friese M.A. Immunopathology of multiple sclerosis // *Nat Rev Immunol*. 2015. V. 15. №. 9. P. 545-558.

Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V. and Nedospasov S.A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. V. 113. №. 11. P. 3006-3011.

Elkabets M., Ribeiro V.S., Dinarello C.A., Ostrand-Rosenberg S., Di Santo J.P., Apte R.N. and Vosshenrich C.A. IL-1 β regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function // *Eur J Immunol*. 2010. V. 40. №. 12. P. 3347-3357.

Endres R., Alimzhanov M.B., Plitz T., Futterer A., Kosco-Vilbois M.H., Nedospasov S.A., Rajewsky K. and Pfeffer K. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells // *J Exp Med*. 1999. V. 189. №. 1. P. 159-168.

Eugster H.P., Frei K., Bachmann R., Bluethmann H., Lassmann H. and Fontana A. Severity of symptoms and demyelination in MOG-induced EAE depends on TNFR1 // *Eur J Immunol*. 1999. V. 29. №. 2. P. 626-632.

Feng Y., van der Veen J., Shugay M., Putintseva E.V., Osmanbeyoglu H.U., Dikiy S., Hoyos B.E., Molledo B., Hemmers S., Treuting P., Leslie C.S., Chudakov D.M. and Rudensky A.Y. A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance // *Nature*. 2015. V. 528. №. 7580. P. 132-136.

Fischer R., Proske M., Duffey M., Stangl H., Martinez G.F., Peters N., Kraske A., Straub R.H., Bethea J.R., Kontermann R.E. and Pfizenmaier K. Selective Activation of Tumor Necrosis Factor Receptor II Induces Antiinflammatory Responses and Alleviates Experimental Arthritis // *Arthritis Rheumatol*. 2018. V. 70. №. 5. P. 722-735.

Fujii W., Ashihara E., Hirai H., Nagahara H., Kajitani N., Fujioka K., Murakami K., Seno T., Yamamoto A., Ishino H., Kohno M., Maekawa T. and Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis // *J Immunol*. 2013. V. 191. №. 3. P. 1073-1081.

Gabrilovich D.I. Myeloid-Derived Suppressor Cells // *Cancer Immunol Res*. 2017. V. 5. №. 1. P. 3-8.

Gabrilovich D.I. and Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system // *Nat Rev Immunol*. 2009. V. 9. №. 3. P. 162-174.

Gao H., Danzi M.C., Choi C.S., Taherian M., Dalby-Hansen C., Ellman D.G., Madsen P.M., Bixby J.L., Lemmon V.P., Lambertsen K.L. and Brambilla R. Opposing

Functions of Microglial and Macrophagic TNFR2 in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis // *Cell Rep.* 2017. V. 18. №. 1. P. 198-212.

Gao Y., Tang J., Chen W., Li Q., Nie J., Lin F., Wu Q., Chen Z., Gao Z., Fan H., Tsun A., Shen J., Chen G., Liu Z., Lou Z., Olsen N.J., Zheng S.G. and Li B. Inflammation negatively regulates FOXP3 and regulatory T-cell function via DBC1 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. V. 112. №. 25. P. E3246-3254.

Gerald M.J., Bracchi-Ricard V., Ricard J., Fischer R., Nandakumar B., Blumenthal G.H., Williams R., Kontermann R.E., Pfizenmaier K., Moxon K.A. and Bethea J.R. Continuous infusion of an agonist of the tumor necrosis factor receptor 2 in the spinal cord improves recovery after traumatic contusive injury // *CNS Neurosci Ther.* 2019. V. 25. №. 8. P. 884-893.

Gondek D.C., Lu L.F., Quezada S.A., Sakaguchi S. and Noelle R.J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism // *J Immunol.* 2005. V. 174. №. 4. P. 1783-1786.

Gregory A.P., Dendrou C.A., Attfield K.E., Haghikia A., Xifara D.K., Butter F., Poschmann G., Kaur G., Lambert L., Leach O.A., Promel S., Punwani D., Felce J.H., Davis S.J., Gold R., Nielsen F.C., Siegel R.M., Mann M., Bell J.I., McVean G. and Fugger L. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis // *Nature.* 2012. V. 488. №. 7412. P. 508-511.

Grell M., Douni E., Wajant H., Lohden M., Clauss M., Maxeiner B., Georgopoulos S., Lesslauer W., Kollias G., Pfizenmaier K. and Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor // *Cell.* 1995. V. 83. №. 5. P. 793-802.

Grinberg-Bleyer Y., Caron R., Seeley J.J., De Silva N.S., Schindler C.W., Hayden M.S., Klein U. and Ghosh S. The Alternative NF-kappaB Pathway in Regulatory T Cell Homeostasis and Suppressive Function // *J Immunol.* 2018. V. 200. №. 7. P. 2362-2371.

Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P. and Ley T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death // *Immunity.* 2004. V. 21. №. 4. P. 589-601.

Guiducci C., Valzasina B., Dislich H. and Colombo M.P. CD40/CD40L interaction regulates CD4⁺CD25⁺ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2 // *Eur J Immunol.* 2005. V. 35. №. 2. P. 557-567.

Ham B., Wang N., D'Costa Z., Fernandez M.C., Bourdeau F., Auguste P., Illemann M., Eefsen R.L., Hoyer-Hansen G., Vainer B., Evrard M., Gao Z.H. and Brodt P. TNF Receptor-2 Facilitates an Immunosuppressive Microenvironment in the Liver to Promote the Colonization and Growth of Hepatic Metastases // *Cancer Res.* 2015. V. 75. №. 24. P. 5235-5247.

Hanson E.M., Clements V.K., Sinha P., Ilkovitch D. and Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells // *J Immunol.* 2009. V. 183. №. 2. P. 937-944.

Havell E.A., Fiers W. and North R.J. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF), I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity // *J Exp Med.* 1988. V. 167. №. 3. P. 1067-1085.

Heink S., Yogev N., Garbers C., Herwerth M., Aly L., Gasperi C., Husterer V., Croxford A.L., Moller-Hackbarth K., Bartsch H.S., Sotlar K., Krebs S., Regen T., Blum H., Hemmer B., Misgeld T., Wunderlich T.F., Hidalgo J., Oukka M., Rose-John S., Schmidt-Supprian M., Waisman A. and Korn T. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells // *Nat Immunol.* 2017. V. 18. №. 1. P. 74-85.

Hemmer B., Kerschensteiner M. and Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis // *Lancet Neurol.* 2015. V. 14. №. 4. P. 406-419.

Hoechst B., Voigtlaender T., Ormandy L., Gamrekelashvili J., Zhao F., Wedemeyer H., Lehner F., Manns M.P., Greten T.F. and Korangy F. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor // *Hepatology.* 2009. V. 50. №. 3. P. 799-807.

Hu X., Li B., Li X., Zhao X., Wan L., Lin G., Yu M., Wang J., Jiang X., Feng W., Qin Z., Yin B. and Li Z. Transmembrane TNF-alpha promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2 // *J Immunol.* 2014. V. 192. №. 3. P. 1320-1331.

Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A.I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M. and Chen S.H. Gr-1⁺CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host // *Cancer Res.* 2006. V. 66. №. 2. P. 1123-1131.

Ioannou M., Alissafi T., Lazaridis I., Deraos G., Matsoukas J., Gravanis A., Mastorodemos V., Plaitakis A., Sharpe A., Boumpas D. and Verginis P. Crucial role of

granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease // *J Immunol*. 2012. V. 188. №. 3. P. 1136-1146.

Isomura I., Palmer S., Grumont R.J., Bunting K., Hoyne G., Wilkinson N., Banerjee A., Proietto A., Gugasyan R., Wu L., McNally A., Steptoe R.J., Thomas R., Shannon M.F. and Gerondakis S. c-Rel is required for the development of thymic Foxp3⁺ CD4 regulatory T cells // *J Exp Med*. 2009. V. 206. №. 13. P. 3001-3014.

Keffer J., Probert L., Cazlaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kioussis D. and Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis // *EMBO J*. 1991. V. 10. №. 13. P. 4025-4031.

Khaibullin T., Ivanova V., Martynova E., Cherepnev G., Khabirov F., Granatov E., Rizvanov A. and Khaiboullina S. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients // *Front Immunol*. 2017. V. 8. №. P. 531.

Kim B.S., Lu H., Ichiyama K., Chen X., Zhang Y.B., Mistry N.A., Tanaka K., Lee Y.H., Nurieva R., Zhang L., Yang X., Chung Y., Jin W., Chang S.H. and Dong C. Generation of RORgammat(+) Antigen-Specific T Regulatory 17 Cells from Foxp3(+) Precursors in Autoimmunity // *Cell Rep*. 2017. V. 21. №. 1. P. 195-207.

Kitagawa Y., Ohkura N. and Sakaguchi S. Molecular determinants of regulatory T cell development: the essential roles of epigenetic changes // *Front Immunol*. 2013. V. 4. №. P. 106.

Knier B., Hiltensperger M., Sie C., Aly L., Lepennetier G., Engleitner T., Garg G., Muschaweckh A., Mitsdorffer M., Koedel U., Hochst B., Knolle P., Gunzer M., Hemmer B., Rad R., Merkler D. and Korn T. Myeloid-derived suppressor cells control B cell accumulation in the central nervous system during autoimmunity // *Nat Immunol*. 2018. V. 19. №. 12. P. 1341-1351.

Kontoyiannis D., Boulougouris G., Manoloukos M., Armaka M., Apostolaki M., Pizarro T., Kotlyarov A., Forster I., Flavell R., Gaestel M., Tschlis P., Cominelli F. and Kollias G. Genetic dissection of the cellular pathways and signaling mechanisms in modeled tumor necrosis factor-induced Crohn's-like inflammatory bowel disease // *J Exp Med*. 2002. V. 196. №. 12. P. 1563-1574.

Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F. and Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies // *Immunity*. 1999. V. 10. №. 3. P. 387-398.

Korn T. and Kallies A. T cell responses in the central nervous system // *Nat Rev Immunol*. 2017. V. 17. №. 3. P. 179-194.

Korneev K.V., Atretkhany K.N., Drutskaya M.S., Grivennikov S.I., Kuprash D.V. and Nedospasov S.A. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis // *Cytokine*. 2017. V. 89. №. P. 127-135.

Kroetsch J.T., Levy A.S., Zhang H., Aschar-Sobbi R., Lidington D., Offermanns S., Nedospasov S.A., Backx P.H., Heximer S.P. and Bolz S.S. Constitutive smooth muscle tumour necrosis factor regulates microvascular myogenic responsiveness and systemic blood pressure // *Nat Commun*. 2017. V. 8. №. P. 14805.

Kruglov A.A., Lampropoulou V., Fillatreau S. and Nedospasov S.A. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells // *J Immunol*. 2011. V. 187. №. 11. P. 5660-5670.

Kruisbeek A.M. Isolation of mouse mononuclear cells // *Curr Protoc Immunol*. 2001. V. Chapter 3. №. P. Unit 3 1.

Kulbe H., Thompson R., Wilson J.L., Robinson S., Hagemann T., Fatah R., Gould D., Ayhan A. and Balkwill F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells // *Cancer Res*. 2007. V. 67. №. 2. P. 585-592.

Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I. and Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches // *Eur J Immunol*. 2005. V. 35. №. 5. P. 1592-1600.

Lamontain V., Schmid T., Weber-Steffens D., Zeller D., Jenei-Lanzl Z., Wajant H., Straub R.H. and Mannel D.N. Stimulation of TNF receptor type 2 expands regulatory T cells and ameliorates established collagen-induced arthritis in mice // *Cell Mol Immunol*. 2019. V. 16. №. 1. P. 65-74.

Lee W. and Lee G.R. Transcriptional regulation and development of regulatory T cells // *Exp Mol Med*. 2018. V. 50. №. 3. P. e456.

The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study // *Neurology*. 1999. V. 53. №. 3. P. 457-465.

Li H., Han Y., Guo Q., Zhang M. and Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF- β 1 // *J Immunol*. 2009. V. 182. №. 1. P. 240-249.

Li M.O. and Rudensky A.Y. T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function // *Nat Rev Immunol*. 2016. V. 16. №. 4. P. 220-233.

Liang B., Workman C., Lee J., Chew C., Dale B.M., Colonna L., Flores M., Li N., Schweighoffer E., Greenberg S., Tybulewicz V., Vignali D. and Clynes R. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II // *J Immunol*. 2008. V. 180. №. 9. P. 5916-5926.

Long M., Park S.G., Strickland I., Hayden M.S. and Ghosh S. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor // *Immunity*. 2009. V. 31. №. 6. P. 921-931.

Lu L., Barbi J. and Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3 // *Nat Rev Immunol*. 2017. V. 17. №. 11. P. 703-717.

Madsen P.M., Motti D., Karmally S., Szymkowski D.E., Lambertsen K.L., Bethea J.R. and Brambilla R. Oligodendroglial TNFR2 Mediates Membrane TNF-Dependent Repair in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Promoting Oligodendrocyte Differentiation and Remyelination // *J Neurosci*. 2016. V. 36. №. 18. P. 5128-5143.

Mazzoni A., Bronte V., Visintin A., Spitzer J.H., Apolloni E., Serafini P., Zanovello P. and Segal D.M. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism // *J Immunol*. 2002. V. 168. №. 2. P. 689-695.

Mehaffey E. and Majid D.S.A. Tumor necrosis factor-alpha, kidney function, and hypertension // *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017. V. 313. №. 4. P. F1005-F1008.

Molon B., Ugel S., Del Pozzo F., Soldani C., Zilio S., Avella D., De Palma A., Mauri P., Monegal A., Rescigno M., Savino B., Colombo P., Jonjic N., Pecanic S., Lazzarato L., Fruttero R., Gasco A., Bronte V. and Viola A. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells // *J Exp Med*. 2011. V. 208. №. 10. P. 1949-1962.

Moore R.J., Owens D.M., Stamp G., Arnott C., Burke F., East N., Holdsworth H., Turner L., Rollins B., Pasparakis M., Kollias G. and Balkwill F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis // *Nat Med*. 1999. V. 5. №. 7. P. 828-831.

Mufazalov I.A. and Waisman A. Isolation of Central Nervous System (CNS) Infiltrating Cells // *Methods Mol Biol*. 2016. V. 1304. №. P. 73-79.

Mundt S., Mrdjen D., Utz S.G., Greter M., Schreiner B. and Becher B. Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation // *Sci Immunol*. 2019. V. 4. №. 31. P.

Nesbitt A., Fossati G., Bergin M., Stephens P., Stephens S., Foulkes R., Brown D., Robinson M. and Bourne T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro

comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents // *Inflamm Bowel Dis.* 2007. V. 13. №. 11. P. 1323-1332.

Neumann B., Luz A., Pfeffer K. and Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor // *J Exp Med.* 1996. V. 184. №. 1. P. 259-264.

Nguyen D.X. and Ehrenstein M.R. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis // *J Exp Med.* 2016. V. 213. №. 7. P. 1241-1253.

Nie H., Zheng Y., Li R., Guo T.B., He D., Fang L., Liu X., Xiao L., Chen X., Wan B., Chin Y.E. and Zhang J.Z. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis // *Nat Med.* 2013. V. 19. №. 3. P. 322-328.

O'Shea J.J., Ma A. and Lipsky P. Cytokines and autoimmunity // *Nat Rev Immunol.* 2002. V. 2. №. 1. P. 37-45.

Oh H., Grinberg-Bleyer Y., Liao W., Maloney D., Wang P., Wu Z., Wang J., Bhatt D.M., Heise N., Schmid R.M., Hayden M.S., Klein U., Rabadan R. and Ghosh S. An NF-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function // *Immunity.* 2017. V. 47. №. 3. P. 450-465 e455.

Okubo Y., Mera T., Wang L. and Faustman D.L. Homogeneous expansion of human T-regulatory cells via tumor necrosis factor receptor 2 // *Sci Rep.* 2013. V. 3. №. P. 3153.

Olleros M.L., Chavez-Galan L., Segueni N., Bourigault M.L., Vesin D., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Bisig R., Ehlers S., Aly S., Walter K., Kuprash D.V., Chouchkova M., Kozlov S.V., Erard F., Ryffel B., Quesniaux V.F., Nedospasov S.A. and Garcia I. Control of Mycobacterial Infections in Mice Expressing Human Tumor Necrosis Factor (TNF) but Not Mouse TNF // *Infect Immun.* 2015. V. 83. №. 9. P. 3612-3623.

Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T.M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P.S., Kronke M. and Mak T.W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection // *Cell.* 1993. V. 73. №. 3. P. 457-467.

Pikarsky E., Porat R.M., Stein I., Abramovitch R., Amit S., Kasem S., Gutkovich-Pyest E., Urieli-Shoval S., Galun E. and Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer // *Nature.* 2004. V. 431. №. 7007. P. 461-466.

Popivanova B.K., Kitamura K., Wu Y., Kondo T., Kagaya T., Kaneko S., Oshima M., Fujii C. and Mukaida N. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis // *J Clin Invest*. 2008. V. 118. №. 2. P. 560-570.

Qu Y., Zhao G. and Li H. Forward and Reverse Signaling Mediated by Transmembrane Tumor Necrosis Factor- α and TNF Receptor 2: Potential Roles in an Immunosuppressive Tumor Microenvironment // *Front Immunol*. 2017. V. 8. №. P. 1675.

Rodriguez P.C., Hernandez C.P., Quiceno D., Dubinett S.M., Zabaleta J., Ochoa J.B., Gilbert J. and Ochoa A.C. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma // *J Exp Med*. 2005. V. 202. №. 7. P. 931-939.

Rothe J., Lesslauer W., Lotscher H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M. and Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes* // *Nature*. 1993. V. 364. №. 6440. P. 798-802.

Roulis M., Armaka M., Manoloukos M., Apostolaki M. and Kollias G. Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. V. 108. №. 13. P. 5396-5401.

Rubtsov Y.P., Rasmussen J.P., Chi E.Y., Fontenot J., Castelli L., Ye X., Treuting P., Siewe L., Roers A., Henderson W.R., Jr., Muller W. and Rudensky A.Y. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces // *Immunity*. 2008. V. 28. №. 4. P. 546-558.

Ruuls S.R., Hoek R.M., Ngo V.N., McNeil T., Lucian L.A., Janatpour M.J., Korner H., Scheerens H., Hessel E.M., Cyster J.G., McEvoy L.M. and Sedgwick J.D. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation // *Immunity*. 2001. V. 15. №. 4. P. 533-543.

Sabio G. and Davis R.J. TNF and MAP kinase signalling pathways // *Semin Immunol*. 2014. V. 26. №. 3. P. 237-245.

Sade-Feldman M., Kanterman J., Ish-Shalom E., Elnekave M., Horwitz E. and Baniyash M. Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation // *Immunity*. 2013. V. 38. №. 3. P. 541-554.

Sander L.E., Sackett S.D., Dierssen U., Beraza N., Linke R.P., Muller M., Blander J.M., Tacke F. and Trautwein C. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function // *J Exp Med*. 2010. V. 207. №. 7. P. 1453-1464.

Schmidleithner L., Thabet Y., Schonfeld E., Kohne M., Sommer D., Abdullah Z., Sadlon T., Osei-Sarpong C., Subbaramaiah K., Copperi F., Haendler K., Varga T., Schanz O., Bourry S., Bassler K., Krebs W., Peters A.E., Baumgart A.K., Schneeweiss M., Klee K., Schmidt S.V., Nussing S., Sander J., Ohkura N., Waha A., Sparwasser T., Wunderlich F.T., Forster I., Ulas T., Weighardt H., Sakaguchi S., Pfeifer A., Bluher M., Dannenberg A.J., Ferreiros N., Muglia L.J., Wickenhauser C., Barry S.C., Schultze J.L. and Beyer M. Enzymatic Activity of HPGD in Treg Cells Suppresses Tconv Cells to Maintain Adipose Tissue Homeostasis and Prevent Metabolic Dysfunction // *Immunity*. 2019. V. 50. №. 5. P. 1232-1248 e1214.

Schmielau J. and Finn O.J. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients // *Cancer Res*. 2001. V. 61. №. 12. P. 4756-4760.

Schroder M., Krotchel M., Conrad L., Naumann S.K., Bachran C., Rolfe A., Umansky V., Helming L. and Swee L.K. Genetic screen in myeloid cells identifies TNF-alpha autocrine secretion as a factor increasing MDSC suppressive activity via Nos2 up-regulation // *Sci Rep*. 2018. V. 8. №. 1. P. 13399.

Sedger L.M. and McDermott M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014. V. 25. №. 4. P. 453-472.

Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression // *Immunity*. 2009. V. 30. №. 5. P. 636-645.

Sonar S.A. and Lal G. Differentiation and Transmigration of CD4 T Cells in Neuroinflammation and Autoimmunity // *Front Immunol*. 2017. V. 8. №. P. 1695.

Srivastava M.K., Sinha P., Clements V.K., Rodriguez P. and Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine // *Cancer Res*. 2010. V. 70. №. 1. P. 68-77.

Steeland S., Van Ryckeghem S., Van Imschoot G., De Rycke R., Toussaint W., Vanhoutte L., Vanhove C., De Vos F., Vandenbroucke R.E. and Libert C. TNFR1 inhibition with a Nanobody protects against EAE development in mice // *Sci Rep*. 2017. V. 7. №. 1. P. 13646.

Tanoue T., Atarashi K. and Honda K. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells // *Nat Rev Immunol*. 2016. V. 16. №. 5. P. 295-309.

Torrey H., Butterworth J., Mera T., Okubo Y., Wang L., Baum D., Defusco A., Plager S., Warden S., Huang D., Vanamee E., Foster R. and Faustman D.L. Targeting

TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs // *Sci Signal*. 2017. V. 10. №. 462. P.

Torrey H., Khodadoust M., Tran L., Baum D., Defusco A., Kim Y.H. and Faustman D.L. Targeted killing of TNFR2-expressing tumor cells and Tregs by TNFR2 antagonistic antibodies in advanced Sezary syndrome // *Leukemia*. 2019. V. 33. №. 5. P. 1206-1218.

Trikha P. and Carson W.E., 3rd. Signaling pathways involved in MDSC regulation // *Biochim Biophys Acta*. 2014. V. 1846. №. 1. P. 55-65.

Tsakiri N., Papadopoulos D., Denis M.C., Mitsikostas D.D. and Kollias G. TNFR2 on non-haematopoietic cells is required for Foxp3⁺ Treg-cell function and disease suppression in EAE // *Eur J Immunol*. 2012. V. 42. №. 2. P. 403-412.

Tumanov A.V., Grivennikov S.I., Kruglov A.A., Shebzukhov Y.V., Koroleva E.P., Piao Y., Cui C.Y., Kuprash D.V. and Nedospasov S.A. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs // *Blood*. 2010. V. 116. №. 18. P. 3456-3464.

Udagawa N., Kotake S., Kamatani N., Takahashi N. and Suda T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis // *Arthritis Res*. 2002. V. 4. №. 5. P. 281-289.

Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M. and Lipsky P.E. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells // *Blood*. 2006. V. 108. №. 1. P. 253-261.

van der Poll T., Jansen P.M., Van Zee K.J., Welborn M.B., 3rd, de Jong I., Hack C.E., Loetscher H., Lesslauer W., Lowry S.F. and Moldawer L.L. Tumor necrosis factor- α induces activation of coagulation and fibrinolysis in baboons through an exclusive effect on the p55 receptor // *Blood*. 1996. V. 88. №. 3. P. 922-927.

Van Hauwermeiren F., Vandenbroucke R.E. and Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1 // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011. V. 22. №. 5-6. P. 311-319.

Varfolomeev E. and Vucic D. Intracellular regulation of TNF activity in health and disease // *Cytokine*. 2018. V. 101. №. P. 26-32.

Vasanthakumar A., Liao Y., Teh P., Pascutti M.F., Oja A.E., Garnham A.L., Gloury R., Tempny J.C., Sidwell T., Cuadrado E., Tuijnenburg P., Kuijpers T.W., Lalaoui N., Mielke L.A., Bryant V.L., Hodgkin P.D., Silke J., Smyth G.K., Nolte M.A., Shi W. and Kallies A. The TNF Receptor Superfamily-NF-kappaB Axis Is Critical to Maintain Effector

Regulatory T Cells in Lymphoid and Non-lymphoid Tissues // Cell Rep. 2017. V. 20. №. 12. P. 2906-2920.

Victoratos P., Lagnel J., Tzima S., Alimzhanov M.B., Rajewsky K., Pasparakis M. and Kollias G. FDC-specific functions of p55TNFR and IKK2 in the development of FDC networks and of antibody responses // Immunity. 2006. V. 24. №. 1. P. 65-77.

Wajant H., Pfizenmaier K. and Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // Cell Death Differ. 2003. V. 10. №. 1. P. 45-65.

Wang Z., Jiang J., Li Z., Zhang J., Wang H. and Qin Z. A myeloid cell population induced by Freund adjuvant suppresses T-cell-mediated antitumor immunity // J Immunother. 2010. V. 33. №. 2. P. 167-177.

Wing K., Onishi Y., Prieto-Martin P., Yamaguchi T., Miyara M., Fehervari Z., Nomura T. and Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function // Science. 2008. V. 322. №. 5899. P. 271-275.

Winsauer C., Kruglov A.A., Chashchina A.A., Drutskaya M.S. and Nedospasov S.A. Cellular sources of pathogenic and protective TNF and experimental strategies based on utilization of TNF humanized mice // Cytokine Growth Factor Rev. 2014. V. 25. №. 2. P. 115-123.

Wolf Y., Shemer A., Polonsky M., Gross M., Mildner A., Yona S., David E., Kim K.W., Goldmann T., Amit I., Heikenwalder M., Nedospasov S., Prinz M., Friedman N. and Jung S. Autonomous TNF is critical for in vivo monocyte survival in steady state and inflammation // J Exp Med. 2017. V. 214. №. 4. P. 905-917.

Yamazaki T., Yang X.O., Chung Y., Fukunaga A., Nurieva R., Pappu B., Martin-Orozco N., Kang H.S., Ma L., Panopoulos A.D., Craig S., Watowich S.S., Jetten A.M., Tian Q. and Dong C. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells // J Immunol. 2008. V. 181. №. 12. P. 8391-8401.

Yang S., Wang J., Brand D.D. and Zheng S.G. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications // Front Immunol. 2018. V. 9. №. P. 784.

Yin B., Ma G., Yen C.Y., Zhou Z., Wang G.X., Divino C.M., Casares S., Chen S.H., Yang W.C. and Pan P.Y. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models // J Immunol. 2010. V. 185. №. 10. P. 5828-5834.

Youn J.I., Nagaraj S., Collazo M. and Gabrilovich D.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice // J Immunol. 2008. V. 181. №. 8. P. 5791-5802.

Zhang H., Yan D., Shi X., Liang H., Pang Y., Qin N., Chen H., Wang J., Yin B., Jiang X., Feng W., Zhang W., Zhou M. and Li Z. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells // J Leukoc Biol. 2008. V. 84. №. 3. P. 789-797.

Zhao X., Rong L., Zhao X., Li X., Liu X., Deng J., Wu H., Xu X., Erben U., Wu P., Syrbe U., Sieper J. and Qin Z. TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation // J Clin Invest. 2012. V. 122. №. 11. P. 4094-4104.

Zheng Y., Josefowicz S., Chaudhry A., Peng X.P., Forbush K. and Rudensky A.Y. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate // Nature. 2010. V. 463. №. 7282. P. 808-812.

Zhu B., Bando Y., Xiao S., Yang K., Anderson A.C., Kuchroo V.K. and Khoury S.J. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis // J Immunol. 2007. V. 179. №. 8. P. 5228-5237.

Список литературы включает 139 источников

Приложение 1

Стратегия выделения различных популяций иммунных клеток с помощью проточной цитометрии

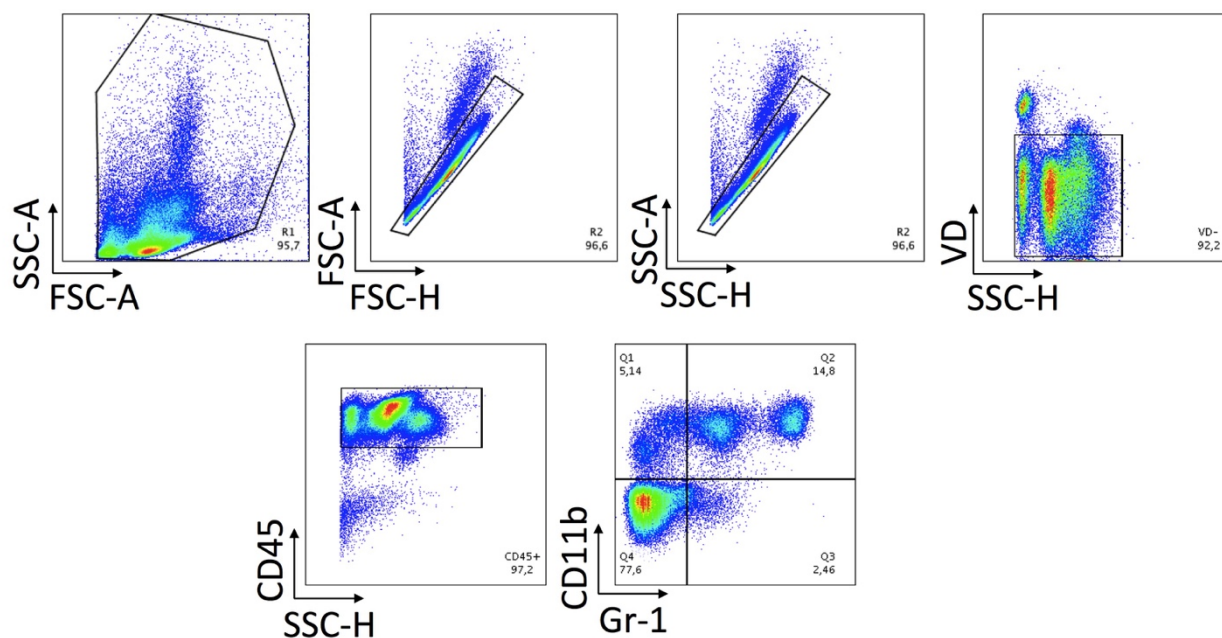


Рис.1. Стратегия выделения популяции MDSC с помощью цитофлуориметрического анализа.

Клетки крови окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD45, CD11b, Gr-1. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. MDSC определяли как $VD^- CD45^+ CD11b^+ GR-1^+$. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

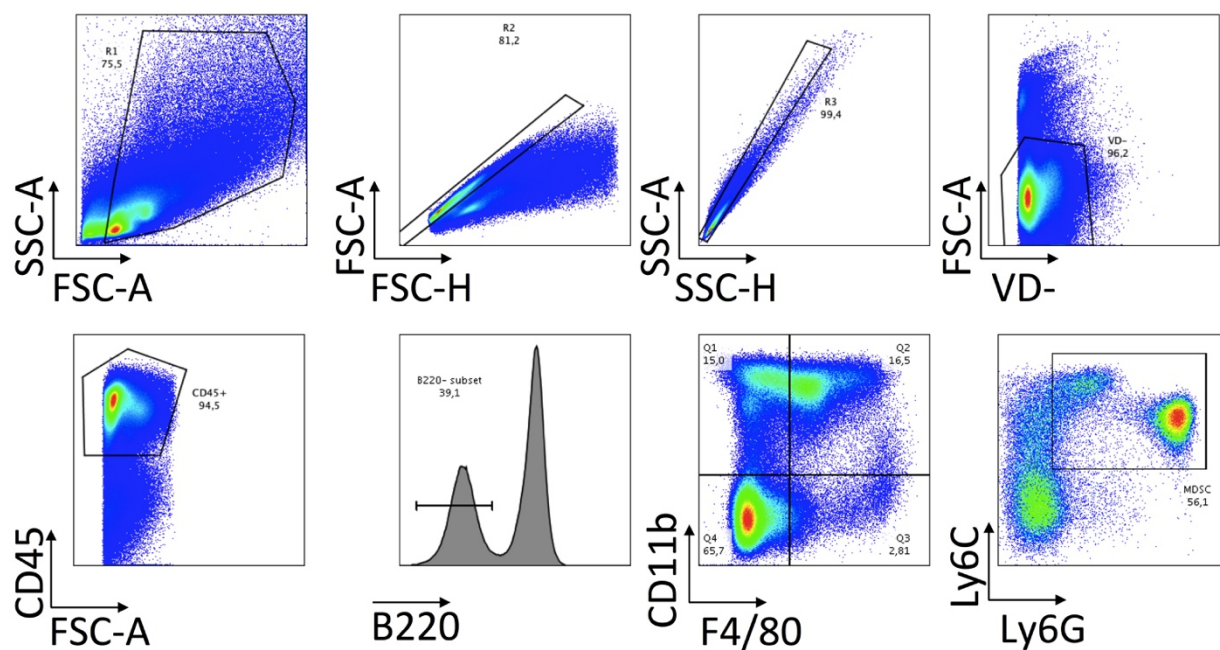


Рисунок 2. Стратегия выделения популяции MDSC с помощью цитофлуориметрического анализа в лимфоидных органах.

Клетки крови окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD45, B220, F4/80, CD11b, Ly6G, Ly6C. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. MDSC определяли как $VD^-CD45^+B220^-CD11b^+F4/80^-Ly6G^+Ly6C^+$. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

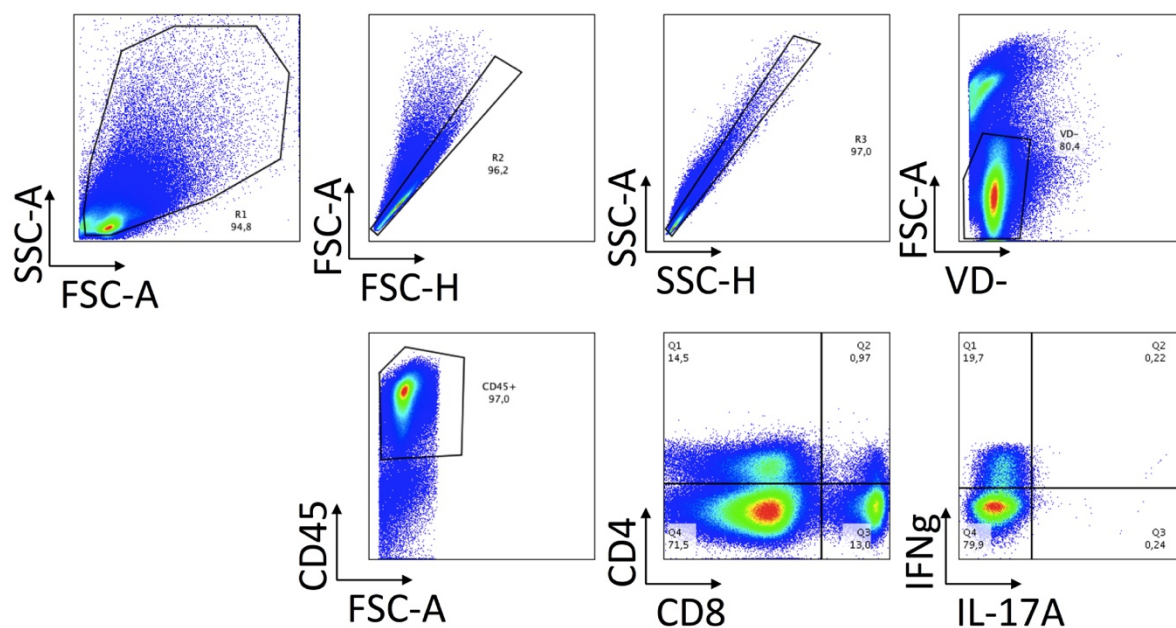


Рисунок 3. Стратегия выделения популяций для цитофлуориметрического анализа продукции цитокинов Т-клетками в лимфоидных органах

Клетки окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD45, CD4, CD8, IFN- γ , GM-CSF. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. Клетки активировали PMA/иономицином в присутствии брефельдина в течение 4 часов. Тс1 клетки определяли как $VD^-CD45^+CD8^+CD4^-IFN-\gamma^+$. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

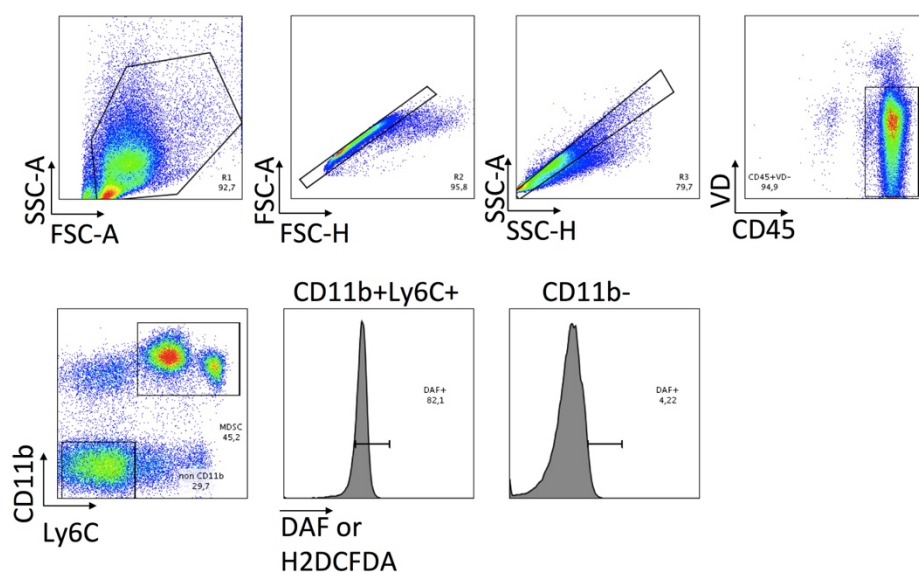


Рисунок 4. Стратегия выделения NO^+ или ROS^+ популяций MDSC с помощью цитофлуориметрического анализа.

Клетки крови окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD45, CD11b, Ly6C, для детекции NO использовали DAF-FM DA (D1946, Sigma Aldrich), для детекции ROS использовали H_2DCFDA (D399, Thermo Fisher). Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. MDSC определяли как $\text{VD}^-\text{CD45}^+\text{CD11b}^+\text{Ly6C}^+$. Гейтирование NO^+ , ROS^+ $\text{CD11b}^+\text{Ly6C}^+$ популяций проводили относительно CD11b^- популяции. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

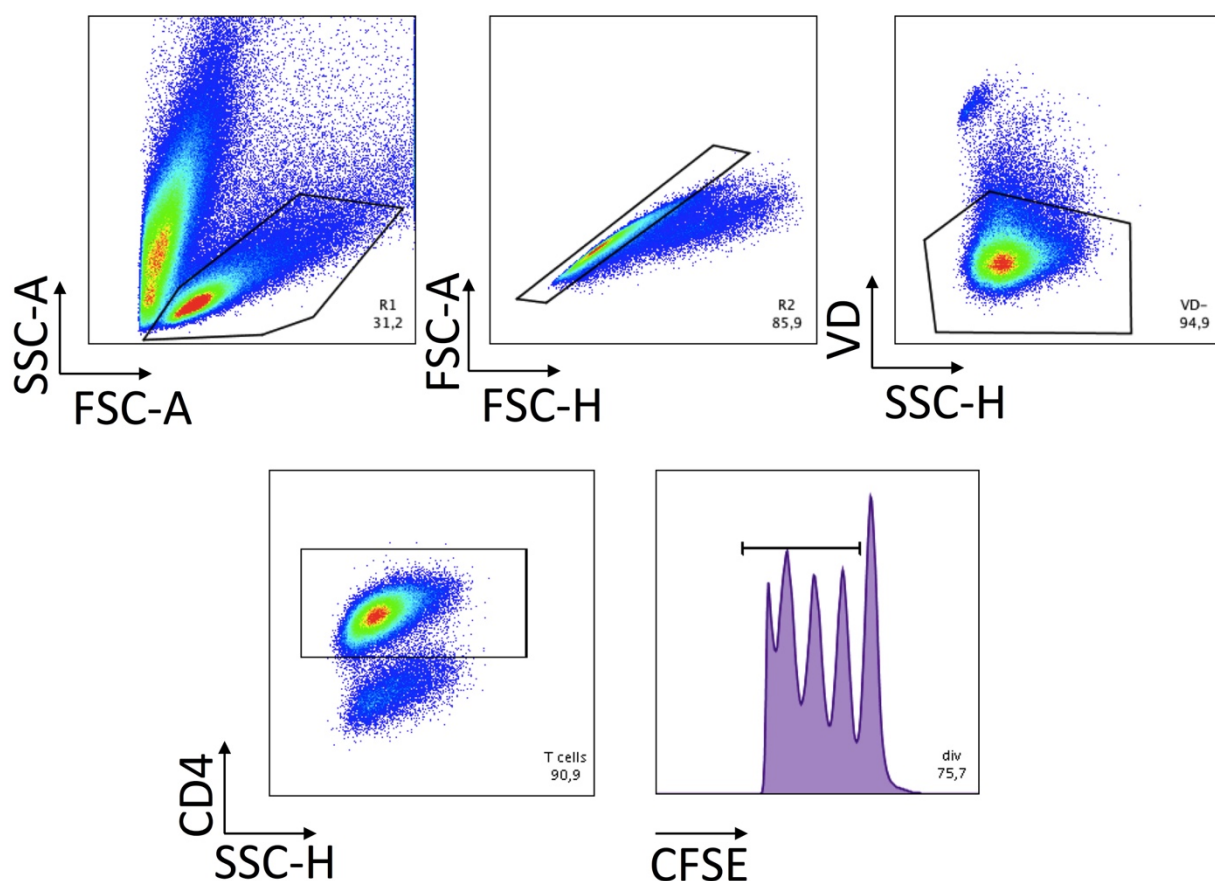


Рисунок 5. Стратегия выделения популяций для анализа Т-клеточной пролиферации

Отсортированные Т-клетки, окрашивали CellTrace™ CFSE и инкубировали с MDSC в присутствии aCD3/aCD28 в течение 3-4 дней. Далее клетки окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD4. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. Цитофлуориметрический анализ пролиферации Т-клеток проводили на приборе BD FACSCanto II по разбавлению метки CFSE. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

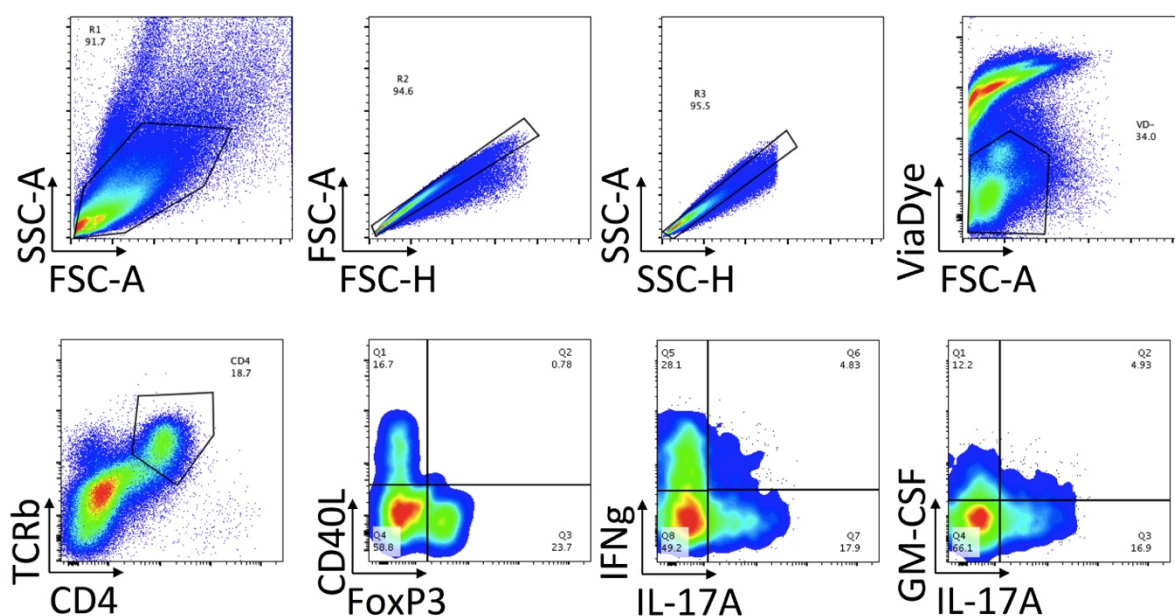


Рисунок 6. Стратегия выделения популяций для цитофлуориметрического анализа продукции цитокинов Т-клетками в лимфоидных органах и ЦНС

Клетки окрашивали эпитопспецифическими антителами к TCRb, CD4, CD40L, FoxP3, IFN- γ , IL-17A, GM-CSF. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. Treg клетки определяли как $VD^-TCRb^+CD4^+FoxP3^+$. Для анализа продукции цитокинов клетки предварительно активировали с помощью MOG-пептида и Брефельдина в течение 6 часов. MOG-специфические Т-клетки определяли как $VD^-TCRb^+CD4^+CD40L^+$, гейтирование IFN- γ , IL-17A, GM-CSF $^+$ Т-клеток проводили на $CD40L^+$ клетках. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software.

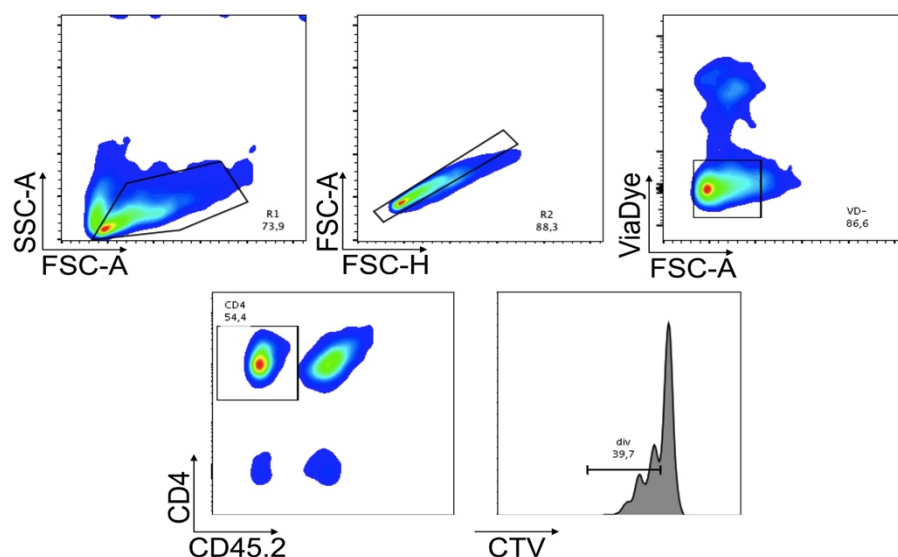


Рисунок 7. Стратегия выделения популяций для анализа Т-клеточной пролиферации

Т-клетки из C57BL/6-CD45.1 мышей окрашивали CellTrace Violet (CTV) и инкубировали с Treg клетками, выделенными из hTNFKI x hTNFR2KI или hTNFKI x hTNFR2KI^{ΔTregs} с помощью магнитной сепарации, в присутствии aCD3/aCD28 в течение 3-4 дней на 37C, 5% CO₂. Далее клетки окрашивали эпитопспецифическими антителами к CD4, CD45.2. Для выделения живых клеток использовали краситель ViaDye. Цитофлуориметрический анализ пролиферации Т-клеток проводили на приборе BD FACSCanto II по разбавлению метки CTV. Анализ данных осуществляли с помощью программы FlowJo Software