

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390044** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.29**

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.07.19**

---

(54) **ИНГИБИТОРЫ LINE1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **20186492.3**

(32) **2020.07.17**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2021/070181**

(87) **WO 2022/013455 2022.01.20**

(71) Заявитель:  
**ТИ-УАН ТЕРАПЬЮТИКС С.Р.Л. (IT)**

(72) Изобретатель:

**Бодега Беатриче, Мараска Федерика  
(IT)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев  
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,  
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к супрессору или ингибитору экспрессии длинного диспергированного элемента 1 (LINE1 (L1)) для медицинского применения.

**A1**

**202390044**

**202390044**

**A1**

## **ИНГИБИТОРЫ LINE1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к супрессору или ингибитору экспрессии длинного диспергированного элемента 1 (LINE1 (L1)) для медицинского применения, в частности для применения в лечении и/или предупреждении первичного или вторичного иммунодефицита или патологий, демонстрирующих иммуносупрессивный фенотип, предпочтительно рака и/или метастазов, более предпочтительно рака легкого, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), или колоректального рака (CRC), или вирусных заболеваний.

### **ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

**Мобильные элементы (TE) обеспечивают эволюцию генома и межиндивидуальную генетическую вариабельность**

Две трети человеческого генома состоит из повторяющихся элементов (66%), среди которых только мобильные элементы (TE) составляют 40-45% человеческого генома <sup>1,2</sup>. Одним вопросом, вызывающим глубокий интерес биологов, изучающих геном, является расшифровка функций этой «темной стороны» генома, которая все же представляет «живую материю», эволюция которой может играть роль в появлении новых функций. В настоящее время ясно, что способность TE регулировать геном заключается главным образом в образовании сложного множества регуляторных сетей РНК, которые, в свою очередь, влияют на продукты транскрипции клетки <sup>3-5</sup>. TE организованы в четыре различных класса и за исключением ДНК-транспозонов преимущественно представляют собой ретротранспозоны, которые приобрели способность перемещаться с помощью механизма «копирования и вставки», используя РНК в качестве интермедиата. Ретротранспозоны включают длинные диспергированные элементы (LINE), короткие диспергированные элементы (SINE) и ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR). Они дополнительно подразделяются на автономные или неавтономные в зависимости от того, имеют ли они ORF (открытые рамки считывания), которые кодируют механизмы, необходимые для

ретротранспозиции<sup>6</sup>.

LINE представляют собой очень древний и эволюционно успешный класс транспозонов. В геноме человека обнаружено три надсемейства LINE: LINE1, LINE2 и LINE3, из которых только LINE1 по-прежнему активен. Полноразмерные элементы LINE1 (L1) имеют длину приблизительно 6 т.п.н. (тысяч пар нуклеотидов) и составляют автономный компонент генома. Элемент LINE1 имеет внутренний промотор полимеразы II и кодирует две открытые рамки считывания, ORF1 и ORF2 (Фиг. 1)<sup>7</sup>. После транскрипции РНК L1 экспортируется в цитоплазму для трансляции и впоследствии объединяется с РНК-связывающими белками-шаперонами ORF1 и эндонуклеазой и обратной транскриптазой ORF2. Затем эти рибонуклеопротеидные частицы реимпортируются в ядро, где ORF2 осуществляет одноцепочечный разрыв и запускает обратную транскрипцию РНК L1 с 3' конца. Обратная транскрипция часто приводит к множеству усеченных, нефункциональных вставок, и по этой причине большинство повторов, происходящих из LINE, являются короткими, со средним размером приблизительно 900-1000 п.н. Согласно оценкам, L1 присутствует в человеческом геноме в количестве более чем 500000 копий<sup>7</sup>.

Механизм L1 также отвечает за ретротранспозицию SINE (которые можно подразделить на три надсемейства: Alu, MIR, MIR3), неавтономных ретроэлементов без какого-либо кодирующего потенциала, коротких по длине (приблизительно 300 п.н.) и транскрибируемых с промотора полимеразы III (Фиг. 1). Наиболее широко представленный в надсемействе SINE специфический для человека Alu представлен в геноме человека в количестве 1090000 копий<sup>8</sup>.

Ретротранспозоны LTR начинаются и заканчиваются длинными концевыми повторами, встроенными в регуляторные элементы транскрипции. Автономные ретротранспозоны LTR содержат гены *gag* и *pol*, которые кодируют обратную транскриптазу, интегразу, протеазу и РНКазу H (Фиг. 1) Существует четыре надсемейства LTR: ERV- класса I, ERV(K) класса II, ERV(L) класса III и MalR. MalR является наиболее широко представленным надсемейством LTR, присутствующим в количестве 240000 копий<sup>9</sup>.

Эволюционные биологи предполагают, что самореплицирующиеся РНК-геномы были основой ранней жизни на земле, и что появление обратной транскрипции сыграло

важнейшую роль в эволюции первых ДНК-геномов, более стабильных полимеров на основе дезоксирибозы <sup>6,10</sup>. С этой точки зрения множественные раунды обратной транскрипции могли помочь увеличению как размера, так и сложности человеческого генома. Особенно очевидно, как у млекопитающих, так и у растений, что ретротранспозоны массово накапливались, стимулируя эволюцию генома. Сообщалось, что L1 и Alu являются наиболее распространенными катализаторами эволюции человеческого генома <sup>11</sup>, и что гомологичная рекомбинация между ТЕ могла быть/является движущей силой мутаций, хромосомных перестроек, делеций, инверсий и транслокаций <sup>12</sup>. ТЕ являются основным источником соматического геномного разнообразия и межиндивидуальной вариабельности <sup>13</sup>, и показано, что вставки ТЕ происходят физиологически <sup>14-16</sup>. В частности, подробно описано, что ретротранспозиция L1 происходит в нейронах, от мухи до человека <sup>17-19</sup>, механизм является тонко регулируемым и регулируется эпигенетически в ходе развития и дифференцировки предшественников нейронов, что способствует соматической диверсификации нейронов в головном мозге <sup>13,20</sup>. Дерегуляция активности ТЕ в настоящее время становится важным участником множества различных заболеваний, поскольку возникает при неврологических, воспалительных и раковых заболеваниях <sup>21-23</sup>.

У хозяев развилось множество систем для контроля экспрессии и распространения ТЕ <sup>24</sup> (так, эпигенетическая модификация и некодирующие РНК, такие как РНК, взаимодействующие с Piwi), чтобы сдерживать возможное пагубное влияние их ретротранспозиции. В результате такого распространения был достигнут баланс между вредным и благотворным эффектами, что, возможно, стало новым регуляторным механизмом для поддержания функций генома, приобретенных в ходе эволюции <sup>3</sup>. В настоящее время полагают, что как у мыши, так и у человека ТЕ используются во множестве регуляторных функций для согласования метаболизма и транскрипции геномов хозяев, опосредуемых как их ДНК-элементами, так и транскрибируемыми РНК-эквивалентами.

**Не только транспозиция: РНК ТЕ являются богатым источником для новых регуляторных функций.**

ТЕ были впервые обнаружены в кукурузе Барбарой МакКлинток почти 80 лет

назад. Она предположила, что эти элементы как «контролирующие элементы» способны регулировать активность генов <sup>25,26</sup>. Ее гипотезы, хотя и отвергались в течение длительного времени, были инновационными, и с появлением технологий секвенирования нового поколения (NGS) были тщательно пересмотрены. Разрабатываемая в настоящее время концепция заключается в том, что ТЕ взаимодействуют с функциями регуляции транскрипции геномов хозяев <sup>3,4,27,28</sup>.

Несмотря на то, что большая часть публикаций сосредоточена на изучении ретротранспозиции и влияния вставок *de novo*, следует отметить, что ТЕ могут обладать функциями регуляции РНК, не связанными с их ретротранспозицией.

Длившиеся не одно десятилетие международные проекты, такие как ENCODE (Энциклопедия элементов ДНК) и FANTOM (функциональное аннотирование генома млекопитающих) позволили получить и проанализировать с применением биоинформатики большое число баз данных, открыв путь к изучению ТЕ. Эти результаты показали, что ТЕ выполняют четкие функции в установлении программ транскрипции, специфических для типа клетки, и воздействию на них, создавая регуляторные сети, которые поддерживаются как их геномными элементами, так и образованными транскриптами <sup>3,28</sup>, показав, что РНК, транскрибируемые с этих элементов, могут обладать бесчисленным множеством функций, что определенно изменило изложение многочисленных концепций о геноме в учебниках <sup>29</sup>.

Эти исследования прояснили, что ТЕ могут создавать новые или альтернативные промоторы <sup>30</sup>, способствовать сборке транскрипционных факторов <sup>31</sup> и эпигенетических модуляторов и содействовать их распространению <sup>32</sup> и регуляции экспрессии генов. Более того, продемонстрировали, что ТЕ, в частности SINE и HERV, имеют функцию в 3D (трехмерной) укладке генов в качестве сайтов связывания для организаторов хроматина<sup>33-35</sup>.

В 2009 г. Faulkner et al. <sup>36</sup> впервые продемонстрировали, что ТЕ широко экспрессируются в типах клеток человека и мыши, обладая тканеспецифичными паттернами экспрессии, предположив специфическую пространственно-временную активацию ретротранспозонов. Кроме того, Faulkner et al. продемонстрировали, что до 30% транскриптов возникают в пределах повторяющихся элементов <sup>36</sup>. Интересно отметить, что ткани эмбрионального происхождения содержат наибольшую долю

последовательностей, происходящих из мобильных элементов в своих транскриптах, со специфической экспрессией LTR в плаценте и ооцитах<sup>37</sup>. Недавно было обнаружено, что гены с определенной пространственно-временной экспрессией особенно обогащены различными классами повторов, что дополнительно диктует время и величину их экспрессии в ходе развития<sup>38</sup>, что согласуется с вышесказанным.

В рамках этого сценария TE увеличивают сложность транскриптома различными способами: создают антисмысловые транскрипты, обычно вблизи промоторов генов<sup>36</sup>; влияют на созревание мРНК (матричная РНК), способствуя возникновению альтернативных сайтов сплайсинга для тканеспецифичной экзонизации<sup>39,40</sup> и обеспечивая альтернативные сигналы полиаденилирования<sup>41,42</sup> и сайты для РНК-опосредованных ловушек<sup>43</sup>. Кроме того, TE вносят вклад в регуляторные последовательности РНК в составе интронов и нетранслируемых областей (UTR)<sup>36</sup>. Важно отметить, что TE вносят основной вклад в длинные некодирующие РНК (lncRNA)<sup>44,45</sup>. В рамках этого сценария для транскриптов, возникающих из LTR, была предположена функция энхансерных РНК, необходимых для поддержания плюрипотентности мышечных и человеческих эмбриональных стволовых клеток (ES)<sup>46,47</sup>. Кроме того, было показано, что LINE и SINE экспрессируются при тесном связывании РНК с хроматиновым компартментом, где они локализовались в эухроматине, что предполагало возможную функцию этих РНК в 3D укладке генома<sup>48</sup>. L1 также были описаны как ассоциированные с хроматином РНК как в эмбриогенезе, где они регулируют доступность открытого хроматина<sup>49,50</sup>, так и в мышечных ES, где они задействованы в регуляции генов, необходимых для поддержания идентичности клеток и 2-клеточной стадии дифференцировки<sup>51</sup>.

Хотя эти новаторские публикации увеличили понимание и знания о функциях TE, подчеркивая важную эпигенетическую роль транспозонов в эмбриогенезе и развитии, вклад TE в пластичность взрослых клеток и возникновение и прогрессирование заболеваний все еще недостаточно изучены. Это является следствием трудностей в изучении TE, которые в силу присущей им повторяемости, высокой степени гомологии, дивергенции и вырожденности последовательностей делают практически невозможным применение технологий, разработанных для двуаллельных генов, в частности в биоинформатике.

### **Важность изучения транскрипционной пластичности Т-клеток в опухолевом микроокружении**

В настоящее время успешно продемонстрировано, что врожденный и адаптивный иммунные ответы играют фундаментальную роль в онкогенезе; взаимодействие между опухолевыми клетками и иммунной системой определяется как иммуноредактирование опухолей. Действительно, наиболее сложная форма иммуноредактирования представлена перекрестным взаимодействием между инфильтрирующими опухоль Т-лимфоцитами (ТЛ) и опухолевыми клетками, которые экспонируют нео-антигены на своей поверхности в опухолевом микроокружении; это может приводить либо к элиминации опухоли, равновесию между иммунным ответом и остаточным ростом опухолевых клеток, либо к ускользанию опухоли из-под иммунного контроля <sup>52</sup>.

Опухолевое микроокружение может быть очень гетерогенным, в том, что касается содержания, состава и ответа иммунного инфильтрата <sup>53</sup>; в частности, относительное содержание и эффекторные функции ТЛ могут подавляться при развитии опухолеспецифической транскрипции программы, способной лишить силы, исключить и ускользнуть от иммунной системы <sup>54</sup>. Опухольезависимые механизмы иммуносупрессии зиждутся на сложной сети, которая устанавливается в опухолевом микроокружении и основана на повышающей регуляции модуляторных молекул, вместе обозначаемых как иммунные контрольные точки, чья функция только частично охарактеризована <sup>55</sup>. Тем не менее, эти молекулы (например, CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцитарный белок 4), PD-1 (белок программируемой клеточной гибели 1), PDL-1 (лиганд программируемой клеточной гибели 1)) являются мишенью терапии ингибиторами иммунных контрольных точек (ICI) (иммунотерапии), которая раскрывает потенциал спонтанных противоопухолевых иммунных ответов настолько мощно, что это позволило изменить подходы к лечению рака <sup>56-58</sup>. Однако, несмотря на достаточную очевидность того, что типы опухолей, являющихся более антигенными из-за высокой мутационной нагрузки (например, меланома, опухоли легкого, почки, мочевого пузыря) с большей вероятностью ответят на иммунотерапию, менее ясно, почему у большинства пациентов с такими высокоантигенными опухолями отсутствует продолжительный ответ или вообще отсутствует ответ на иммунотерапию; действительно, доля пациентов, у которых отсутствует ответ, остается высокой, и усилия

в этой области в основном направлены на поиск специфических IC1 против новых поверхностных маркеров, экспрессируемых подгруппами Т-клеток, также определяющихся на уровне единичных клеток<sup>54,59-62</sup>. Практически ничего не сообщается в отношении геномных и эпигенетических механизмов, управляющих дисфункциональным состоянием ТП1 внутри опухолей для восстановления их функции, действующих на обратимые механизмы транскрипционной пластичности.

### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения охарактеризовали два наиболее распространенных типа рака человека, при которых иммунотерапия применяется более (немелкоклеточная карцинома легкого, NSCLC) или менее (колоректальный рак, CRC) часто и эффективно. Они занимают первое и второе место среди наиболее распространенных причин смерти во всем мире, соответственно. Рак легкого является наиболее распространенным раком, если говорить о частоте возникновения (по оценкам, 2,09 миллиона случаев в 2018 г.)<sup>63</sup>, NSCLC отвечает за 84% случаев опухолей легкого<sup>64</sup>, при этом общая пятилетняя выживаемость составляет до 19%. Колоректальный рак (CRC) является третьим по распространенности раком, согласно оценкам, в 2018 г. на его долю пришлось 1,84 миллиона новых случаев, при этом общая пятилетняя выживаемость составляет 60%<sup>63,65</sup>.

Авторы изобретения обнаружили, что указанные TE-содержащие транскрипты представляют собой новые терапевтические мишени, способствующие транскрипционному преобразованию ТП1, приводящему к запуску эффекторного иммунного ответа, что невозможно было спрогнозировать согласно другим стратегиям.

Таким образом, объектом настоящего изобретения является супрессор или ингибитор экспрессии LINE1 (длинного диспергированного элемента 1) (L1) для применения в лечении и/или предупреждении первичного или вторичного иммунодефицита или патологий, демонстрирующих иммуносупрессивный фенотип, предпочтительно рака и/или метастазов, более предпочтительно рака легкого, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), или колоректального рака (CRC), или вирусных заболеваний, таких как иммунодефициты, вызванные вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV),

где L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80%



идентичности с SEQ ID NO: 1 и/или 2 и/или 3, или состоит из нее.

Предпочтительно, L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 2 или 3, или состоит из нее.

Предпочтительно, L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2 и/или 3.

Предпочтительно, L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Другим объектом изобретения является супрессор или ингибитор экспрессии LINE1 (L1) для медицинского применения, где L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1 и/или 2 и/или 3, или состоит из нее.

Предпочтительно, L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 2 или 3, или состоит из нее.

Предпочтительно, L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2 и/или 3.

Предпочтительно, L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 или 2 или 3.

Предпочтительно, супрессор или ингибитор представляет собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из:

а) полинуклеотида, такого как антисмысловая конструкция, антисмысловый олигонуклеотид, интерферирующая РНК-конструкция или siRNA (малая интерферирующая РНК) или кодирующий ее полинуклеотид,

б) антитела или его фрагмента;

в) полипептида;

г) малой молекулы;

д) полинуклеотида, кодирующего указанные антитело или полипептид или его функциональное производное;

е) вектора, содержащего или экспрессирующего полинуклеотид, как он определен в а) или д);

ж) компонента CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами / CRISPR-ассоциированный белок 9), например sgRNA (одиночная направляющая РНК);

з) генетически модифицированной клетки-хозяина, экспрессирующей указанные полипептид или антитело или содержащей полинуклеотид, как он определен в а) или д), или по меньшей мере один компонент ж).

Предпочтительно, полинуклеотид представляет собой выделенную ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на LINE1.

Предпочтительно, ингибирующая нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеотидов, комплементарных от 10 до 50 последовательным нуклеотидам SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Предпочтительно, указанная ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой по меньшей мере один ингибитор РНК, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из: антисмыслового олигонуклеотида (ASO), гэтмера, миксмера, shRNA (короткая шпилечная РНК), siRNA, stRNA, snRNA (малая ядерная РНК), sgRNA, более предпочтительно указанная ингибирующая нуклеиновая кислота является модифицированной, такой как 2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновая кислота (FANA) ASO и/или содержит одну или более модифицированных связей или оснований.

Предпочтительно, ASO или FANA ASO содержит последовательность, способную гибридизоваться с последовательностью, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или комплементарную ей.

Предпочтительно, супрессор или ингибитор применяют в Т-клетках, более предпочтительно наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках или CD8<sup>+</sup> Т-клетках, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах ТИЛ, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, В-клетках, естественных киллерных клетках или опухолевых клетках.

Предпочтительно, супрессор или ингибитор применяют в комбинации с иммунотерапией и/или лучевой терапией и/или химиотерапевтическим средством и/или таргетными терапиями, которые способствуют образованию новых антигенов и иммунному ответу, и/или с адъювантами иммунной системы, предпочтительно указанная иммунотерапия включает введение ингибитора иммунных контрольных точек и/или иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), предпочтительно ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой или содержит одно или более антител к CD137; антител к PD-1 (программируемой клеточной гибели 1); антител к PDL1 (лиганд программируемой клеточной гибели 1); антител к PDL2 или антител к CTLA-4.

Предпочтительно, супрессор или ингибитор применяют в адоптивном переносе клеток (ACT), лечении клеточной терапией, трансплантации несовместимого костного

мозга, инфузии несовместимых НК-клеток или инфузии цитокин-индуцированных киллерных клеток (СК), или где указанный ингибитор или супрессор инъецирован в опухолевый очаг, например в опухоль кишечника, меланому, или специфически доставлен посредством наночастиц в участок, представляющий интерес.

Другим объектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая супрессор или ингибитор, определенные выше, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и возможно дополнительно содержащая терапевтическое средство.

Еще одним объектом изобретения является способ регулирования коммитирования наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в направлении любой эффекторной линии и модулирования эффекторного ответа дисфункциональных Т-клеток, включающий стадию ингибирования экспрессии LINE1 в указанных клетках, где стадию ингибирования экспрессии LINE1 в указанных клетках осуществляют посредством по меньшей мере одного супрессора или ингибитора, как определено выше.

Другим объектом изобретения является выделенная человеческая Т-клетка, В-клетка, НК-клетка или опухолевая клетка, где указанная клетка стабильно или транзиторно задействуется в экспрессии LINE1 (L1), предпочтительно указанная клетка представляет собой наивную CD4<sup>+</sup> Т-клетку, или CD8<sup>+</sup> Т-клетку, или дисфункциональную Т-клетку, например TIL.

Предпочтительно, L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1 и/или 2 и/или 3, или состоит из нее.

Предпочтительно, указанная клетка представляет собой наивную CD4<sup>+</sup> Т-клетку, или CD8<sup>+</sup> Т-клетку, или дисфункциональную Т-клетку, например TIL.

Предпочтительно, L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

Следующим объектом изобретения является композиция, содержащая по меньшей мере одну клетку или их комбинации, как определено выше, предпочтительно указанная композиция дополнительно содержит по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель.

Клетка или композиция, определенные выше, могут предназначаться для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в лечении и/или предупреждении первичного или вторичного иммунодефицита или

патологий, демонстрирующих иммуносупрессивный фенотип, предпочтительно рака и/или метастазов, более предпочтительно рака легкого, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), или колоректального рака (CRC), или вирусных заболеваний, таких как иммунодефициты, вызванные вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

Предпочтительно, указанные клетка или композиция применяются в адоптивном переносе клеток (ACT), лечении клеточной терапией, трансплантации несовместимого костного мозга, инфузии несовместимых NK-клеток или инфузии цитокин-индуцированных киллерных клеток (CIK), или где указанные клетка или композиция инъецированы в опухолевый очаг, например в опухоль кишечника, меланому, или специфически доставлены посредством наночастиц в участок, представляющий интерес.

Предпочтительно ASO содержит нуклеиновокислотную последовательность, которая нацелена на или комплементарна одной из следующих последовательностей (LINE1 ASO):

LINE1-aGCACTAAATGCCTACAAGAGA (SEQ ID NO:4)

LINE1-bGATAGACCGCTAGCAAGACTA (SEQ ID NO:5)

LINE1-cGAAGTTGAATCTCTGAATAGA (SEQ ID NO:6)

LINE1-dGGACCTTCAAGGAGAACTA (SEQ ID NO:7)

LINE1-eGGAGAGGATGCGGAGAAATAG (SEQ ID NO:8)

или соответствующей последовательности РНК, или состоит из нее.

Предпочтительно, sgRNA содержит или состоит из нуклеиновокислотной последовательности, которая нацелена на или комплементарна одной последовательности, которая является уникальной, некодирующей частью, фланкирующей элемент LINE1, который удален.

Предпочтительно, sgRNA содержит нуклеотидную последовательность, которая нацелена на, или комплементарна, или идентична по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100% одной из следующих последовательностей:

IFNGR2-F ACTGATCGTGAGAGGCTTCGTGG (SEQ ID NO: 9)

IFNGR2-R GGTCATTTAGGGTGACAGGCAGG (SEQ ID NO: 10)

ARCP2-F GCTGTGATGGGAATCACGAAGGG (SEQ ID NO: 11)

ARCP2-R AAGGAAGACCACTTTTAAGGAGG (SEQ ID NO: 12)

или соответствующей последовательности РНК, или состоит из нее.

SEQ ID No 1-3 не способны к ретротранспозиции и, как обнаружили авторы изобретения, специфически экспрессируются в Т-лимфоцитах (наивных и дисфункциональных). Таким образом, подавление экспрессии является новым и обеспечивает преимущества, поскольку может обеспечить более специфичное нацеливание и эффективность в модулировании иммунного ответа Т-клеток.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Под термином «супрессор или ингибитор» или «молекула, которая (селективно) подавляет или ингибирует» подразумевается молекула, которая вызывает изменение экспрессии мишени. Изменение является относительным по сравнению с нормальным или базовым уровнем экспрессии в отсутствие «супрессора или ингибитора» или молекулы, но в остальном в аналогичных условиях, и представляет собой снижение нормальной/базовой экспрессии. Подавление или ингибирование экспрессии мишени можно оценивать любыми способами, известными специалистам в данной области. Оценку уровня экспрессии или присутствия мишени предпочтительно проводят с использованием классических методик молекулярной биологии, таких как qPCR (полимеразная цепная реакция в реальном времени), микроматрицы, исследования с использованием микросфер, анализ защиты от РНКазы или нозерн-блоттинг или клонирование и секвенирование. В контексте настоящего изобретения мишенью является ген, мРНК, кДНК (комплементарная ДНК) или кодируемый ими белок. Вышеописанные молекулы также включают их соли, сольваты или пролекарства. Вышеописанные молекулы могут быть сольватированы H<sub>2</sub>O или не сольватированы. В контексте настоящего изобретения термин «нацеленный» или «комплементарный» можно понимать как полностью или частично комплементарный всей или части целевой последовательности или как способный гибридизоваться со всей конкретной целевой последовательностью или ее частью.

Полинуклеотиды, описанные выше, например, такие как siRNA, могут дополнительно содержать 3'-выступы dTdT или UU и/или модификации нуклеотидного и/или полинуклеотидного остова, как описано в другой части настоящего документа. В контексте настоящего изобретения термин «полинуклеотид» включает молекулы ДНК

(например, кДНК или геномную ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК, siRNA, shRNA) и аналоги ДНК или РНК, полученные с использованием аналогов нуклеотидов. Полинуклеотид может быть одноцепочечным или двухцепочечным. Ингибиторы РНК, определенные выше, предпочтительно способны гибридизоваться со всей конкретной целевой последовательностью или ее частью. Следовательно, ингибиторы РНК могут быть полностью или частично комплементарны всей целевой последовательности или ее части. Ингибиторы РНК могут гибридизоваться с определенной целевой последовательностью в условиях жесткости от средней до высокой. Ингибитор РНК может быть определен путем ссылки на конкретную идентичность последовательности с обратным комплементом последовательности, на которую он нацелен. Антисмысловые последовательности, как правило, будут иметь последовательности, идентичные по меньшей мере приблизительно на 75%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 99% обратным комплементом их целевых последовательностей.

Термины «полинуклеотид» и «полипептид» также включают их производные и функциональные фрагменты. Полинуклеотид может быть синтезирован с использованием аналогов или производных олигонуклеотидов (например, инозина или фосфоротиоатных нуклеотидов).

Молекула по изобретению может представлять собой антитело или его производные.

Термин ген здесь также включает соответствующие ортологи или гомологичные гены, изоформы, варианты, аллельные варианты, функциональные производные, их функциональные фрагменты. Предполагается, что выражение «белок» включает также соответствующий белок, кодируемый соответствующими ортологичными или гомологичными генами, функциональными мутантами, функциональными производными, их функциональными фрагментами или их аналогами, изоформами.

В контексте настоящего изобретения термин «полипептид» или «белок» включает:

1. весь белок, его аллельные варианты и ортологи;
2. любой синтетический, рекомбинантный или протеолитический

функциональный фрагмент;

3. любой функциональный эквивалент, например такой как синтетические или рекомбинантные функциональные аналоги.

В настоящем изобретении «функциональные мутанты» белка представляют собой мутанты, которые могут быть получены посредством мутации одной или нескольких аминокислот в их последовательностях и которые сохраняют свою активность. Действительно, белок по изобретению при необходимости может быть модифицирован *in vitro* и/или *in vivo*, например путем гликозилирования, миристоилирования, амидирования, карбоксилирования или фосфорилирования, и может быть получен, например, синтетическими или рекомбинантными методиками, известными в области техники. Термин «производное», используемый здесь в отношении белка, означает химически модифицированный пептид или его аналог, где по меньшей мере один заместитель отсутствует в немодифицированном пептиде или его аналоге, то есть пептид, который был ковалентно модифицирован. Типичными модификациями являются амиды, углеводы, алкильные группы, ацильные группы, сложные эфиры и тому подобное. Используемый здесь термин «производные» также относится к более длинным или более коротким полипептидам, имеющим, например, процент идентичности по меньшей мере 41%, предпочтительно по меньшей мере 41,5%, 50%, 54,9%, 60%, 61,2%, 64,1%, 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, с изложенными здесь генами и последовательностями или с аминокислотной последовательностью соответствующей области, кодируемой ортологом или гомологичным геном. Термин «аналог», используемый в данном документе в отношении белка, означает модифицированный пептид, в котором один или более аминокислотных остатков пептида заменены другими аминокислотными остатками и/или в котором осуществлена делеция одного или более аминокислотных остатков и/или в котором осуществлена делеция одного или более аминокислотных остатков или где один или более аминокислотных остатков добавлены к пептиду. Такое добавление или делеция аминокислотных остатков может происходить на N-конце пептида и/или на C-конце пептида. «Производное» может быть молекулой нуклеиновой кислоты, такой как молекула ДНК, кодирующая полинуклеотид, определенный выше, или молекулой

нуклеиновой кислоты, содержащей полинуклеотид, определенный выше, или полинуклеотид с комплементарной последовательностью. В контексте настоящего изобретения термин «производные» также относится к более длинным или более коротким полинуклеотидам и/или полинуклеотидам, имеющим, например, процент идентичности по меньшей мере 41%, 50%, 60%, 65%, 70% или 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, например по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95% или 100%, например, с SEQ ID NO: 1-12 или с комплементарной им последовательностью, или с их соответствующей последовательностью ДНК или РНК. Термин «производные» и термин «полинуклеотид» также включают модифицированные синтетические олигонуклеотиды. Модифицированные синтетические олигонуклеотиды предпочтительно представляют собой LNA (запертую нуклеиновую кислоту), фосфоротиолированные олигонуклеотиды или метилированные олигонуклеотиды, морфолино, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил олигонуклеотиды и конъюгированные с холестерином 2'-О-метил модифицированные олигонуклеотиды (антагомиры). Термин «производное» может также включать аналоги нуклеотидов, то есть встречающийся в природе рибонуклеотид или дезоксирибонуклеотид, замененный не встречающимся в природе нуклеотидом. Термин «производные» также включает нуклеиновые кислоты или полипептиды, которые могут быть получены посредством мутации одного или нескольких нуклеотидов или аминокислот в их последовательностях, эквивалентах или последовательностях-предшественниках. Термин «производные» также включает по меньшей мере один функциональный фрагмент полинуклеотида. В контексте настоящего изобретения «функциональный» понимают, например, как «сохраняющий свою активность». Используемый здесь термин «фрагменты» относится к полинуклеотидам, имеющим длину предпочтительно по меньшей мере 200, 400, 600, 800, 1000 нуклеотидов, 1100 нуклеотидов, 1200 нуклеотидов, 1300 нуклеотидов, 1400 нуклеотидов, 1500 нуклеотидов, или к полипептидам, предпочтительно, имеющим длину по меньшей мере 50 аминокислот, 100 аминокислот, 150 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот. Термин «полинуклеотид» также относится к модифицированным полинуклеотидам. Используемый здесь термин «вектор» относится к экспрессирующему вектору и может быть, например, в форме плазмиды, вирусной частицы, фага и так далее.



Такие векторы могут включать бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, плазмиды дрожжей, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, ДНК вируса, такого как вирус осповакцины, аденовирус, лентивирус, вирус оспы птиц и вирус псевдобешенства. Большое количество подходящих векторов известно специалистам в данной области и доступно для приобретения. Полинуклеотидная последовательность, предпочтительно последовательность ДНК в векторе, функционально связана с соответствующей последовательностью(ями), контролирующей(ими) экспрессию (промотором), для управления синтезом мРНК. В качестве репрезентативных примеров таких промоторов можно упомянуть прокариотические или эукариотические промоторы, такие как немедленный ранний промотор CMV (цитомегаловируса), промотор тимидинкиназы HSV (вируса простого герпеса), ранний и поздний промотор SV40, LTR из ретровируса и металлотioneина-I мыши. Экспрессирующий вектор может также содержать сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и транскрипционный вектор. Вектор также может включать соответствующие последовательности для амплификации экспрессии. Кроме того, векторы предпочтительно содержат один или более генов селективных маркеров для обеспечения фенотипического признака для отбора трансформированных клеток-хозяев, такого как устойчивость к дигидрофолатредуктазе или неомицину для культуры эукариотических клеток, или такого как устойчивость к тетрациклину или ампициллину для *E. coli*. Используемый здесь термин «генетически модифицированная клетка-хозяин» относится к клеткам-хозяевам, которые были трансдуцированы, трансформированы или трансфицированы полинуклеотидом или вектором, описанным ранее. В качестве репрезентативных примеров подходящих клеток-хозяев можно указать бактериальные клетки, такие как *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, грибковые клетки, такие как дрожжи, клетки насекомых, такие как Sf9, клетки животных, такие как CHO или COS, клетки растений и так далее. Считается, что выбор подходящего хозяина находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники, исходя из идей, изложенных в данном документе. Предпочтительно, указанная клетка-хозяин представляет собой клетку животного и, наиболее предпочтительно, клетку человека. Введение полинуклеотида или вектора, описанного ранее, в клетку-хозяина можно осуществлять способом, хорошо известным специалистам в данной области, таким как

трансфекция с фосфатом кальция, трансфекция, опосредованная DEAE(диэтиламиноэтил)-декстраном, электропорация, липофекция, микроинъекция, вирусная инфекция, тепловой шок, трансформация после химической пермеабилзации мембраны или слияния клеток. Полинуклеотид может представлять собой вектор, такой как, например, вирусный вектор. Полинуклеотиды, определенные выше, могут быть введены в организм субъекта, подлежащего лечению, в виде нуклеиновой кислоты внутри вектора, который реплицируется в клетках-хозяевах и продуцирует полинуклеотиды. Подходящие пути введения фармацевтической композиции по изобретению включают, без ограничения, пероральный, ректальный, чресслизистый, кишечный, энтеральный, местный, суппозиторий, посредством ингаляции, интратекальный, внутрижелудочковый, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интрамедуллярный и подкожный), химиоэмболизацию. Другие подходящие способы введения включают инъекцию, вирусный перенос, использование липосом, например катионных липосом, пероральный прием и/или нанесение на кожу. В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят в дозированной лекарственной форме (например, таблетка, капсула, болюс и так далее). Для фармацевтических применений композиция может быть в форме раствора, например раствора для инъекций, эмульсии, суспензии или тому подобного.носителем может быть любой подходящий фармацевтический носитель. Предпочтительно используют носитель, способный повысить эффективность проникновения молекул в клетки-мишени. Подходящими примерами таких носителей являются липосомы. В фармацевтической композиции по изобретению супрессор или ингибитор может быть связан с другими терапевтическими агентами. Фармацевтическая композиция может быть выбрана на основе требований лечения. Такие фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в виде таблеток, капсул, пероральных препаратов, порошков, гранул, пилюль, инъекционных или инфузионных жидких растворов, суспензий, суппозиториев, препаратов для ингаляций. Справочным руководством для составов является книга автора Remington (“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, Lippincott Williams & Wilkins, 2000). Специалист в данной области выберет форму введения и эффективные дозировки, выбрав подходящие разбавители, адъюванты

и/или эксципиенты. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены способами, хорошо известными в данной области, например с применением множества хорошо известных процессов смешивания, растворения, гранулирования, растирания в порошок, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации. Композиции могут быть составлены в сочетании с одним или несколькими физиологически приемлемыми носителями, включающими эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтике. Правильный состав зависит от выбранного пути введения. Парентеральные пути являются предпочтительными во многих аспектах изобретения. Для инъекции, включая, без ограничения, внутривенную, внутримышечную и подкожную инъекцию, соединения по изобретению могут быть приготовлены в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как забуференный физиологический раствор, или полярных растворителях, включая, без ограничения, пирролидон или диметилсульфоксид. Соединения предпочтительно составляют для парентерального введения, например посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Полезные композиции включают, без ограничения, суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать добавки, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Фармацевтические композиции для парентерального введения включают водные растворы водорастворимой формы, такой как соль активного соединения, без ограничения. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть приготовлены в липофильном носителе. Подходящие липофильные носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат и триглицериды, или такие материалы, как липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как натрий карбоксиэтилцеллюлоза, сорбит или декстран. Возможно, суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы и/или агенты, повышающие растворимость соединений, что позволяет приготавливать высококонцентрированные растворы. В качестве альтернативы, активный ингредиент может быть в форме порошка для смешивания перед применением с подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой. Для перорального

введения соединения могут быть приготовлены путем объединения активных соединений с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в области техники. Такие носители позволяют изготавливать композиции с соединениями по изобретению в виде таблеток, пилюль, пастилок, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, паст, взвесей, растворов, суспензий, концентрированных растворов и суспензий для разбавления в питьевой воде пациента, готовых смесей для добавления в пищу пациента и тому подобного для перорального приема пациентом. Полезными эксципиентами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит, препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал и картофельный крахмал, и другие материалы, такие как желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрий-карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (PVP). Для введения путем ингаляции молекулы по настоящему изобретению удобно доставлять в форме аэрозольного спрея с использованием упаковки под давлением или небулайзера и подходящего пропеллента. Молекулы также могут быть включены в состав ректальных композиций, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, обычных основ для суппозиториев, таких как масло какао или другие глицериды. В дополнение к композициям, описанным ранее, составы с соединениями также можно изготавливать в виде препаратов-депо. Такие композиции длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекции. Соединения по данному изобретению могут быть приготовлены для такого пути введения в виде композиций с подходящими полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии с фармакологически приемлемым маслом), с ионообменными смолами или в виде труднорастворимых производных, таких как труднорастворимая соль, без ограничения. Кроме того, соединения могут быть доставлены при помощи системы с замедленным высвобождением, такой как полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие терапевтический агент. Созданы различные материалы с замедленным высвобождением, и они хорошо известны специалистам в данной области. Терапевтически эффективное количество относится к количеству соединения, эффективному для предотвращения,

облегчения или улучшения заболевания, связанного с конформацией белка. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники, особенно в свете настоящего описания. Как правило, количество, используемое в способах лечения, представляет собой такое количество, которое эффективно обеспечивает желаемый терапевтический результат у млекопитающих. В частности, введение молекул должно соответствовать действующим клиническим рекомендациям. Подходящая суточная доза будет варьировать от 0,001 до 10 мг/кг массы тела, в частности от 0,1 до 5 мг/кг. В случае полинуклеотидов подходящая суточная доза может варьировать от 0,001 пг/кг массы тела до 10 мг/кг массы тела. Как правило, дозы для парентерального введения пациентам молекул, описанных в настоящем документе, варьируют от приблизительно 1 мг/сутки до приблизительно 10000 мг/сутки, более типично от приблизительно 10 мг/сутки до приблизительно 1000 мг/сутки и наиболее типично от приблизительно 50 мг/сутки до приблизительно 500 мг/сутки. Диапазон, указанный выше, является иллюстративным и специалисты в данной области определяют оптимальную дозировку выбранного соединения на основании клинического опыта и показаний к лечению.

В данном описании «олигонуклеотиды» или «полинуклеотид» означают одно- или двухцепочечную РНК или ДНК, включая ASO, sgRNA и siRNA, способные связываться с комплементарными одно- или двухцепочечными целевыми последовательностями РНК или ДНК. Специфическая в отношении последовательности часть терапевтических олигонуклеотидов, которые представляют собой ASO, sgRNA или siRNA по изобретению, содержит нуклеотидные последовательности длиной от приблизительно 7 оснований до приблизительно 45 оснований. В олигонуклеотиды могут быть включены дополнительные основания, которые не являются специфическими в отношении последовательности, например линкерная последовательность. Под специфической в отношении последовательности понимают часть олигонуклеотида, которая комплементарна целевой РНК или ДНК и/или направляет расщепление целевой РНК или ДНК.

Используемый здесь термин «ASO» означает короткие участки (от приблизительно 7 до приблизительно 45 специфических в отношении последовательности нуклеотидов) ДНК или дериватизированной ДНК (например,

фосфоротиоированной ДНК), которые содержат последовательность, комплементарную ДНК или РНК-мишени. Комплементарная часть ASO обычно варьирует от приблизительно 30% до приблизительно 100% олигонуклеотида.

Используемый в данном документе термин «siRNA» означает дуплекс РНК, в котором каждая цепь дуплекса содержит от приблизительно 15 до приблизительно 30 оснований в длину, и где по меньшей мере одна из цепей обладает гомологией, по меньшей мере, приблизительно 90%, более предпочтительно приблизительно до 100% с ДНК или РНК-мишенью.

Используемый здесь термин «экспрессия гена» означает синтез мРНК или трансляцию мРНК.

В одном воплощении изобретения терапевтические олигонуклеотиды по изобретению представляют собой ASO. ASO включают одноцепочечную ДНК или РНК, комплементарную части конкретной последовательности РНК или, в альтернативном варианте, комплементарную последовательности гена, и снижают или ингибируют экспрессию гена. Неограничивающие примеры ASO включают последовательности РНК, комплементарные транскрипту мРНК, тем самым образуя дуплекс РНК, что приводит к снижению уровня трансляции. В альтернативном варианте ASO может включать в себя последовательность ДНК, комплементарную транскрипту мРНК, которая гибридизуется с транскриптом мРНК и служит субстратом для РНКазы H.

Технология антисмысловых олигонуклеотидов известна в данной области техники как перспективный источник терапевтических средств. Антисмысловые олигонуклеотиды основаны на спаривании оснований по Уотсону-Крику между известной последовательностью нуклеиновой кислоты и ее обратным комплементом для ингибирования экспрессии гена (Jen, K., et al., *Stem Cells*, 18:307-19 (2000)). Терапию антисмысловыми олигонуклеотидами можно использовать для борьбы с широким спектром нарушений, например с экспрессией генов человека, вовлеченных в заболевания или нарушения, или, в альтернативном варианте, для нацеленного воздействия на репликацию инфекционных агентов (Tanaka, M., et al, *Respir. Res.*, 2:5-9 (2000); Bunnell, V.A., et al, *Clin. Micro. Rev.*, 11:42-56 (1998)). Важные соображения, которые необходимо учитывать при разработке способов лечения антисмысловыми олигонуклеотидами, включают стабильность антисмысловых олигонуклеотидов *in vivo*,

эффективную доставку терапевтического антисмыслового олигонуклеотида и эффективную внутриклеточную локализацию антисмыслового олигонуклеотида (Jen, K., et al, *Stem Cells*, 18:307-19 (2000)).

Хорошо известно, что, в зависимости от гена-мишени, терапевтическую ценность могут иметь ASO, которые гибридизуются с любой частью гена-мишени, такой как кодирующие области, интроны, 5'-нетранслируемая область (5'UTR), сайт инициации трансляции или 3'UTR. Следовательно, последовательности, перечисленные в данном документе, являются просто примерами возможных терапевтических олигонуклеотидов, которые можно применять по изобретению, включающими все ASO, известные в области техники. Кроме того, применять по изобретению можно все альтернативные химические модификации нуклеиновых кислот, предложенные в данной области техники, однако степень эффективности может варьировать. Химические модификации, применимые к терапевтическим олигонуклеотидам по изобретению, более подробно обсуждены в разделе, озаглавленном «Химия конъюгации и молекулы-носители», приведенном ниже. Вкратце, перечисленные в данном документе соединения представляют широкий класс терапевтических олигонуклеотидов с различными химическими модификациями, которые можно применять по данному изобретению. В одном воплощении изобретения связывающая последовательность часть терапевтических олигонуклеотидов ASO и siRNA по изобретению имеет длину от приблизительно 7 до приблизительно 45 оснований. В предпочтительном воплощении изобретения связывающая последовательность часть терапевтических олигонуклеотидов ASO и siRNA по изобретению имеет длину от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов. В наиболее предпочтительном воплощении изобретения связывающая последовательность часть терапевтических олигонуклеотидов ASO и siRNA по изобретению имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 25 нуклеотидов. Дополнительные олигонуклеотиды, которые можно применять в изобретении, включают олигонуклеотиды, ранее показавшие эффективность в свободной форме в данной области техники.

Терапевтические олигонуклеотиды по изобретению также охватывают siRNA. siRNA происходят от РНК-интерференции, которая представляет собой естественный клеточный процесс сайленсинга транскрипции определенных генов (Sharp, P.A., *Genes*

& Dev., 15:485-490 (2001); Carmichael, G.G., Nature, 418:379-380 (2002)). siRNA связываются с комплексами клеточных белков и регулируют расщепление комплементарных РНК-мишеней этими белковыми комплексами.

В настоящем изобретении siRNA включает дуплексные РНК длиной приблизительно 15-30 оснований, причем одна цепь дуплексной РНК предпочтительно имеет по меньшей мере около 90% гомологии с РНК-мишенью, более предпочтительно имеет приблизительно до 100% гомологии с РНК-мишенью. В альтернативном варианте siRNA обладают достаточной гомологией с РНК-мишенью, чтобы направлять расщепление комплементарной РНК-мишени белковыми комплексами. Гомология между двумя нуклеотидными последовательностями может быть установлена специалистом в данной области техники при помощи поисковых компьютерных программ, таких как программы BLAST или FASTA. В качестве альтернативы, специалист в данной области может установить гомологию последовательностей при помощи программ выравнивания последовательностей, таких как MegAlign (входит в комплект компьютерных программ DNASTAR).

siРНК модифицируют химически реакционноспособными группами, описанными ниже, что позволяет образовывать ковалентные связи с мобильными белками, предпочтительно сывороточным альбумином человека. В предпочтительном воплощении изобретения модификация дуплекса siRNA путем добавления химически реакционноспособной группы происходит на конце. Химическая модификация дуплекса РНК химически реакционноспособной группой может происходить на любом из 4 концов дуплекса РНК, либо на 5', либо на 3' концах любой из двух цепей РНК дуплекса РНК.

Предпочтительно, ингибирующая нуклеиновая кислота содержит одну или более молекул пептидо-нуклеиновой кислоты (PNA) или запертой нуклеиновой кислоты (LNA) или ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой аналог рибонуклеиновой кислоты, содержащий кольцо рибозы, имеющее мостик между ее 2'-кислородом и 4'-углеродом.

Предпочтительно, аналог рибонуклеиновой кислоты содержит метиленовый мостик между 2'-кислородом и 4'-углеродом.

Предпочтительно, по меньшей мере один нуклеотид ингибирующей нуклеиновой



кислоты содержит модифицированную сахарную группировку, выбранную из 2'-О-метоксиэтилмодифицированной сахарной группировки, 2'-метоксимодифицированной сахарной группировки, 2'-О-алкилмодифицированной сахарной группировки и бициклической сахарной группировки.

Предпочтительно, ингибирующая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь, выбранную из фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, алкилфосфотиоатной, фосфорамидатной, карбаматной, карбонатной, фосфатно-триэфирной, ацетамидатной, карбоксиметилэфирной и их комбинаций.

Семейство L1 включает: HAL1, HAL1B, HAL1M8, IN25, L1, L1HS, L1M1\_5, L1M1B\_5, L1M2A\_5, L1M3A\_5, L1M3B\_5, L1M3C\_5, L1M3D\_5, L1M3DE\_5, L1M4B, L1M6\_5end, L1M6B\_5end, L1M7\_5end, L1MA1, L1MA10, L1MA2, L1MA3, L1MA4, L1MA4A, L1MA5, L1MA5A, L1MA6, L1MA7, L1MA8, L1MA9, L1MB1, L1MB2, L1MB3, L1MB3\_5, L1MB4, L1MB5, L1MB6\_5, L1MB7, L1MB8, L1MC1, L1MC2, L1MC4, L1MCB\_5, L1MD1, L1MD2, L1MDB\_5, L1ME\_ORF2, L1ME1, L1ME2, L1ME3, L1ME3A, L1ME4A, L1MEA\_5, L1MEC\_5, L1MED\_5, L1MEf\_5end, L1PA10, L1PA11, L1PA12, L1PA12\_5, L1PA13, L1PA13\_5, L1PA14, L1PA15, L1PA16, L1PA2, L1PA3, L1PA4, L1PA5, L1PA6, L1PA7, L1PA8, L1PB1, L1PB2, L1PB2c, L1PB3, L1PB4, L1PREC1, L1PREC2.

(<https://www.girinst.org/replib/>, Kenji K. Kojima, Human transposable elements in Repbase: genomic footprints from fish to humans, *Mob DNA*. 2018; 9: 2).

В контексте настоящего изобретения рак или опухоль могут включать рак или опухоли любого типа, например рак легкого, предпочтительно немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC), колоректальный рак (CRC), опухоль кишечника или меланому.

Далее изобретение будет проиллюстрировано примерами, которые не являются исчерпывающими, с ссылкой к следующим графическим материалам.

**Фиг. 1. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя обогащены РНК LINE1, которые снижаются при активации TCR под воздействием mTORC1 *in vitro* и *in vivo*.**

(a) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной

флуоресцентной микроскопии при LINE1 RNA FISH (исследовании методом флуоресцентной гибридизации *in situ* РНК LINE1) (красный), выполненные на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> наивных Т-клетках и Т-клетках памяти в состоянии покоя. В качестве контроля наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали РНКазой. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. **(b)** Скрипичная диаграмма, отображающая сигнал LINE1 RNA FISH у четырех индивидуумов; оценивали по меньшей мере 246 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,0001 однофакторный ANOVA (дисперсионный анализ). **(c)** Уровни экспрессии LINE1 по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и Th1, Th2, Th17 CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, а также в наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти; каждая точка обозначает отдельного донора. \*\*\* P менее 0,0001 однофакторный ANOVA. **(d)** содержание РНК LINE1, HERV и Alu в цитоплазме, нуклеоплазме и хроматине наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя у трех индивидуумов. Данные представлены как среднее значение. \* P равно 0,0217 однофакторный ANOVA. **(e)** Уровни экспрессии LINE1 и β-актина по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя после обработки актиномицином D или без (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и ± s.e.m. (стандартная ошибка среднего). β-актин без обработки и с обработкой актиномицином D \*P равно 0,046 односторонний парный t-критерий. **(f)** Уровни экспрессии LINE1 по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках и активированных в течение 2, 4 и 8 часов, 1, 3, 5, 7 суток связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов (n равно 6 индивидуумов). \*\*\* P менее 0,0001 однофакторный ANOVA. **(g)** Схематическое изображение сигнальные пути ниже активации TCR. Указаны лекарственные средства, использованные для ингибирования путей и их молекулярные мишени. **(h)** Уровни экспрессии LINE1 по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, активированных связыванием TCR и обработанных различными ингибиторами сигнальных путей в течение 8 часов после активации (n равно 4 индивидуума); каждая точка обозначает отдельного донора. Рапамицин в сравнении с контролем \*\*\* P равно 0,0003 двусторонний парный t-критерий. **(i)** Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный), выполненные на Th1 CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, выделенных у здоровых индивидуумов, перенесших трансплантацию

пациентов, получавших эверолимус, и пациентов с LAM (лимфангиолейомиоматозом), получавших сиролимус. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. (j) Скрипичная диаграмма, отображающая сигнал LINE1 RNA FISH в Th1 CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти от двух индивидуумов на группу; оценивали по меньшей мере 138 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,0001 *t*-критерий Манна-Уитни, \*\* P равно 0,0058 *t*-критерий Манна-Уитни. (k) Уровни экспрессии *LINE1* по результатам qRT-PCR в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, выделенных у четырех здоровых индивидуумов, двух перенесших трансплантацию пациентов, получавших эверолимус, и четырех пациентов с LAM, получавших сиролимус. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \*\* P равно 0,007, однофакторный ANOVA.

**Фиг. 2. LINE1 в результате сплайсинга образуют неканонические варианты транскриптов генов клеточной активации, которые регулируют транскрипцию соответствующих генных локусов.**

(a) *ARCP2.L1* показан в качестве примера транскрипта, содержащего LINE1: крупным планом показан новый экзон, содержащий LINE1. Треки кратности изменений H3K36me3 в сравнении с H3K9me3 (темно-красный), треки покрытия для RNAseq хроматина наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (синий), показаны прочтения с разрывами (сплит-чтения) и подтверждающие прочтения нового экзона. (b-c) схематическое изображение расположения зондов для флуоресцентной ДНК-гибридизации *in situ* (DNA-FISH) (зеленый), зондов для smRNA FISH (розовый) и ASO (синий) на последовательности транскриптов LINE1. Репрезентативные изображения, полученные посредством широкопольной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом smRNA FISH для (c) *HIRA.L1*, выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и активированных, а также на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали в течение 48 часов при помощи ASO к *HIRA.L1* или контрольным (Scr) ASO. Исходное увеличение 100X. Масштабная метка 5 мкм. Справа: столбчатая диаграмма, отображающая количество сигналов на ядро. (d) Слева представлены репрезентативные изображения, полученные посредством широкопольной флуоресцентной микроскопии при RNA FISH с тирамидной амплификацией сигнала (TSA) для *HIRA.L1* (красный) в комбинации с DNA FISH для геномного локуса *HIRA* (зеленый), выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Исходное увеличение 100X. Масштабная метка 5 мкм. (e)

Схематическое изображение нокдауна *HIRA.L1* в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя. Наивные  $CD4^+$  Т-клетки обрабатывали ASO к *HIRA.L1* или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. (f) Уровни экспрессии *HIRA.L1* и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя, обработанных в течение 48 часов ASO к *HIRA.L1* или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). \* P равно 0,04, двусторонний парный *t*-критерий. (g) Схематическое представление делеции транскриптов *LINE1* при помощи Cas9/RNP в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя. Наивные  $CD4^+$  Т-клетки подвергали нуклеофекции при помощи Cas9/RNP и поддерживали в культуре в течение 96 часов. (h-i) Схематическое представление последовательности *IFNGR2* (h), показывающее расположение sgRNA, мишенью которой является locus *IFNGR2*. (i) Уровни экспрессии *IFNGR2.L1* и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя через 96 часов после нуклеофекции с применением Cas9/RNP, нацеленных на *IFNGR2.L1* или контрольных (n равно 4 индивидуума). Транскрипты *LINE1*, *IFNGR2.L1* \* P равно 0,04 двусторонний парный *t*-критерий, канонические транскрипты \* P равно 0,0275 односторонний парный *t*-критерий.

**Фиг. 3. Транскрипты *LINE1* в комплексе с нуклеолином приостанавливают экспрессию генов клеточной активации, препятствуя размещению H3K36me3 в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя.**

(a) Схематическое представление нокдауна РНК *LINE1* в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя. Наивные  $CD4^+$  Т-клетки обрабатывали ASO к *LINE1* или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. (b) Слева представлены репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом *LINE1* RNA FISH (красный), полученные на наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов с применением ASO к *LINE1* или контрольного (Scr) ASO. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. Справа: скрипичная диаграмма, отображающая полученный методом FISH сигнал РНК *LINE1* у двух здоровых индивидуумов; оценивали по меньшей мере 500 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,001 *t*-критерий Манна-Уитни (c) Уровни экспрессии транскриптов *LINE1* и канонических транскриптов по результатам qRT-PCR в наивных  $CD4^+$  Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к

LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\*\* P менее 0,0001, F равно 68,60 Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты \*\*\* P менее 0,0001, F равно 39,39. Двухфакторный ANOVA (d) Уровни H3K36me3, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 количественно оценивали при помощи вестерн-блоттинга в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). H3 использовали в качестве контроля загрузки. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. H3K36me3 в группе Scr или LINE1 \*P равно 0,0495 двусторонний парный *t*-критерий. (e) Распределение сигналов H3K36me3 вдоль тел LINE1-содержащих генов или контрольных генов в экспериментах ChIP seq при сравнении наивных и активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, а также наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя, обработанных в течение 48 часов при помощи ASO к LINE1 или контрольного (Scr) ASO. Отложены медианные значения сигнала для H3K36me3 в генах (ChIP/Input (кратность обогащения после иммунопреципитации хроматина относительно ДНК до иммунопреципитации)). (f-g) Транскрипты LINE1 и контрольный ген (*GAPDH*) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах с нуклеолин-RIP (иммунопреципитацией РНК антителом к нуклеолину), выполненных на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. (h) Схематическое представление нокдауна нуклеолина в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. (i) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, обработанных в течение 48 часов ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Канонические транскрипты, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 42,57.60 Двухфакторный ANOVA. (j) Содержание РНК *LINE1* в цитоплазме, нуклеоплазме и хроматине наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \* P равно 0,0345, F=8,772 Двухфакторный ANOVA. (k) Схематическое представление нокдауна РНК *LINE1* в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали

ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов и затем активировали в течение 7 суток путем связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов. **(l)** Положительные по T-bet и IFN $\gamma$  (интерферон  $\gamma$ ) клетки подсчитывали путем внутриклеточного окрашивания в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 8 индивидуумов). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Tbet \*\*\* P равно 0,0009 Двусторонний парный *t*-критерий; IFN $\gamma$  \*\*\* P равно 0,0002 Двусторонний парный *t*-критерий. **(m)** Схематическое изображение нокдаун нуклеолина в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов и затем активировали в течение 7 суток путем связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов. **(n)** Положительные по T-bet и IFN $\gamma$  клетки подсчитывали путем внутриклеточного окрашивания в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов, а затем активировали в течение 7 суток путем связывания с TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Tbet \*\*\* P равно 0,0142 Двусторонний парный *t*-критерий; IFN $\gamma$  \*\* P равно 0,0041 Двусторонний парный *t*-критерий.

**Фиг. 4. Транскрипты LINE1 находятся под контролем транскрипционного фактора IRF4.**

**(a)** Схематическое представление развития CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в тимусе. Описаны поверхностные маркеры, специфические для гемопоэтических предшественников, ранних Т-клеточных предшественников, DN2, DN3, двойных положительных, наивных CD4<sup>+</sup> и наивных CD8<sup>+</sup>. **(b-c)** Уровень экспрессии как транскриптов LINE1, так и канонических транскриптов в массивах данных RNA-seq предшественников, наивных и активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, а также наивных и активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток. \*\*\* P менее 0,001 критерий суммы рангов Уилкоксона использовали для сравнения каждого типа клеток с наивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками (парные сравнения использовали только для активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток). **(d)** Уровни IRF4 в наивных CD4<sup>+</sup> и наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках количественно оценивали при помощи вестерн блоттинга. H3 использовали в качестве контроля загрузки. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. n равно 3 индивидуума \*\*P равно 0,0085 Двусторонний

парный *t*-критерий. (e) Промоторы LINE1-содержащих генов и контрольного гена (HECW1) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах с ChIP (иммунопреципитацией хроматина) при помощи антитела к IRF4, выполнявшихся на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. Промотор LINE1-содержащих генов \*\* P равно 0,0034, F равно 10,7, Двухфакторный ANOVA. (f) Схематическое представление нокдауна IRF4 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. (g) Уровни экспрессии транскриптов LINE1, канонических транскриптов и контрольного гена (HECW1) по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, обработанных в течение 48 часов ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\*\* P менее 0,001, F равно 924 Двухфакторный ANOVA; канонические транскрипты \* P менее 0,04, F равно 22,2. Двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 5. После активации экспрессия транскриптов LINE1 снижается под влиянием репрессирующих сплайсинг белков PTBP1/MATR3, тогда как транскрипционный фактор GTF2F1 благоприятствует экспрессии канонических транскриптов.**

(a-b) Транскрипты LINE1 и контрольный ген (*GAPDH*) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах с PTBP1 RIP, выполнявшейся в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных в течение 16 часов при помощи связывания TCR и коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. \*\*\* P равно 0,0002, F равно 26,26, Двухфакторный ANOVA. (c-d) Транскрипты LINE1 и контрольный ген (*GAPDH*) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах с GTF2F1 RIP, выполнявшейся в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных в течение 16 часов посредством связывания TCR и коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. \*\* P равно 0,0014, F равно 16,68, Двухфакторный ANOVA.

(e) Схематическое представление анализа посредством qRT-PCR с РТВР1 RIP (панель f) и антителом к GTF2F1 (панель g) для определения связан ли РТВР1 или GTF2F1 с мРНК канонического RAB22A, RAB22A.L1 или пре-мРНК в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Конструировали праймеры для амплификации i) экзона LINE1, ii) пре-мРНК в области, перекрывающейся с интроном и близлежащим экзоном LINE1, iii) прошедшего сплайсинг транскрипта LINE1 (прямой праймер на экзоне 2 и обратный праймер на экзоне LINE1 2.1) и iv) канонического транскрипта. (f) Разновидности РНК RAB22A амплифицировали посредством qRT-PCR после экспериментов с РТВР1 RIP, выполнявшейся в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных в течение 16 часов посредством связывания TCR и коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. (g) Разновидности РНК RAB22A амплифицировали посредством qRT-PCR после РТВР1 RIP, выполнявшейся в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных в течение 16 часов при помощи связывания TCR и коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. (h) Схематическое представление нокдауна РТВР1 и GTF2F1 в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали ASO к РТВР1 и GTF2F1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов и затем активировали в течение 16 суток путем связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов. (i) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали ASO к РТВР1 и GTF2F1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов, а затем активировали в течение 16 часов путем связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Транскрипты LINE1 \*\*\* P менее 0,0006, F равно 14,89, Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 44,52, Двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 6. Транскрипты LINE1 вновь накапливаются в дисфункциональных эффекторных лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль.**

(a) Вверху: репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный), выполненные на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти, инфильтрирующих



нормальную прилегающую ткань или опухоль при CRC. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. Внизу: скрипичная диаграмма, на которой представлен полученный методом FISH сигнал РНК LINE1 у двух пациентов; оценивали по меньшей мере 100 ядер на группу. CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти \*\*\* P менее 0,001 Двусторонний критерий Манна-Уитни; CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти \*\*\* P менее 0,001 Двусторонний критерий Манна-Уитни. (b) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный), выполненные на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти, инфильтрирующих нормальную прилегающую ткань или опухоль при NSCLC. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. Внизу: скрипичная диаграмма, на которой представлен полученный методом FISH сигнал РНК LINE1 на CD4<sup>+</sup> Т-клетках от трех пациентов и на CD8<sup>+</sup> Т-клетках от двух пациентов; оценивали по меньшей мере 84 ядра на группу. CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти \*\*\* P менее 0,001 Двусторонний критерий Манна-Уитни. (c) Слева: репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный), выполненные на эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. Справа: скрипичная диаграмма, отображающая полученный методом FISH сигнал РНК LINE1 у двух здоровых индивидуумов; оценивали по меньшей мере 100 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,001 t-критерий Манна-Уитни (d) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по результатам qRT-PCR в эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клетках (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\* P равно 0,0089, F равно 8,092, двухфакторный ANOVA; канонические транскрипты, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 38,08. Двухфакторный ANOVA (e) Слева: репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный), выполненные на эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. Справа: скрипичная диаграмма, отображающая полученный методом FISH сигнал РНК LINE1 у здоровых индивидуумов; оценивали по меньшей мере 100 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,001 t-критерий Манна-Уитни (f) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических

транскриптов по результатам qRT-PCR в эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клетках (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\* P равно 0,0039, F равно 17,93, Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 83,66. Двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 7. Накопление вновь транскриптов LINE1 в дисфункциональных эффекторных лимфоцитах регулируется IRF4, стабилизируется на уровне хроматина нуклеолином и потерей связывания GTF2F1/PTBP1.**

(a) Уровни IRF4, нуклеолина, GTF2F1 и PTBP1 в эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клетках и эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клетках оценивали количественно посредством вестерн-блоттинга. НЗ использовали в качестве контроля загрузки. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. (n равно 2 индивидуума) (b) RAB22A.L1, ARCP2.L1 и IFNGR2.L1 амплифицировали посредством qRT-PCR после экспериментов с нуклеолин-, PTBP1 и GTF2F1 RIP, выполнявшейся на эффекторных и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, а также эффекторных и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клетках (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. (c) Схематическое представление нокдауна IRF4 в дисфункциональных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках. Дисфункциональные Т-клетки обрабатывали ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. (d) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных в течение 48 часов ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\*\* P менее 0,001, F равно 47,6 Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты \*\*\* P менее 0,0001, F равно 36,1. Двухфакторный ANOVA (e) Экспрессия транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\* P равно 0,009, F равно 22,6, Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты, \*\* P менее 0,001, F равно 16,8. Двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 8. Уровень транскриптов LINE1 модулирует дисфункциональный фенотип CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, инфильтрирующих CRC или NSCLC.**

**(a)** Схематическое представление иммунологических исследований, проведенных на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти, инфильтрирующих и выделенных из CRC или NSCLC, обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO. После обработки ASO инфильтрирующие опухоль (TIL) CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки памяти будут тестировать в отношении окрашивания на ингибиторы иммунных контрольных точек (панель b и c), секреции эффекторных цитокинов (панель d и e) и способности уничтожать гетерологичные антигенпрезентирующие клетки, несущие MHCII (главный комплекс гистосовместимости II) и MHCI, такие как моноциты (панель f и g). **(b)** Среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, выделенных при CRC (черный, n равно 3 индивидуума) или NSCLC (красный, n равно 3 индивидуума), обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов, определяли положительные по PD-1, TIM-3 или LAG-3 клетки путем окрашивания на поверхностные маркеры, PD-1 в группе Scr ASO или ASO к LINE \*\* P равно 0,0044, двусторонний парный t-критерий; TIM-3 в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,017, двусторонний парный t-критерий; LAG-3 в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,04, двусторонний парный t-критерий. **(c)** Среди CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, выделенных при CRC (черный, n равно 3 индивидуума) или NSCLC (красный, n равно 3 индивидуума), обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов, определяли положительные по PD-1, TIM-3 или LAG-3 клетки путем окрашивания на поверхностные маркеры, PD-1 в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,0268, двусторонний парный t-критерий; LAG-3 в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,03, двусторонний парный t-критерий. **(d)** среди CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, выделенных при CRC (черный, n равно 2 индивидуума) или NSCLC (красный, n равно 2 индивидуума), обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов, а затем активированных путем связывания TCR в течение дополнительных 48 часов, определяли положительные по IFN $\gamma$  или GrzB-клетки путем окрашивания на поверхностные маркеры. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. IFN $\gamma$  в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,04, односторонний парный t-критерий; GrzB в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,02, односторонний парный t-критерий **(e)** Положительные по IFN $\gamma$ , GrzB или PerfA клетки определяли путем внутриклеточного окрашивания CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, выделенных при CRC (черный, n равно 3 индивидуума) или NSCLC (красный, n равно 1 индивидуум), обработанных ASO к LINE1

или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов и затем активированных связыванием TCR в течение дополнительных 48 часов. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. IFN $\gamma$  в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,0095, двусторонний парный t-критерий; GrzB в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,03, односторонний парный t-критерий; PerfA в группе Scr ASO или ASO к LINE \* P равно 0,035, односторонний парный t-критерий (f-g) Процент мертвых гетерологичных моноцитов, культивированных совместно в течение 12 часов с CD4<sup>+</sup> (f) или CD8<sup>+</sup> (g) Т-клетками памяти, выделенными при CRC (черный, n равно 1 индивидуум) или NSCLC (красный, n равно 2 индивидуума), обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO в течение 48 часов. CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти \* P равно 0,02 двусторонний парный t-критерий; CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти \* P равно 0,04 двусторонний парный t-критерий.

**Фиг. 9. Участки открытого хроматина в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках обогащены РНК LINE1.**

(a) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при Alu RNA FISH (красный), выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти. В качестве контроля наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали РНКазой. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. (b) Скрипичная диаграмма, отображающая полученный методом FISH сигнал РНК Alu у четырех индивидуумов; оценивали по меньшей мере 220 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,0001 однофакторный ANOVA. (c) Уровни экспрессии *Alu* по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и Th1, Th2, Th17 CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, а также в наивных CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти; каждая точка обозначает отдельного донора. (d) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при HERV RNA FISH (красный), выполненные в наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти. В качестве контроля наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали РНКазой. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. (e) Скрипичная диаграмма, отображающая полученный методом FISH сигнал РНК HERV у трех индивидуумов; оценивали по меньшей мере 164 ядра на группу. (f) Уровни экспрессии *HERV* по результатам qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и Th1, Th2, Th17 CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, а также в наивных

CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти; каждая точка обозначает отдельного донора. (g) Содержание *I8S* и *Xist* (контрольные транскрипты, ассоциированные с цитоплазмой и хроматином) в цитоплазме, нуклеоплазме и хроматине наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя у трех индивидуумов. Данные представлены как средние значения. (h) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный) и иммунофлуоресцентном окрашивании (серый) на H3K4me3 и H3K9me3, выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. (i) Корреляция Пирсона для оценки колокализации между РНК, исследованной методом FISH, и иммуноокрашиванием у трех индивидуумов; оценивали по меньшей мере 103 ядра на группу. \*\*\* P менее 0,0001, однофакторный ANOVA. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки активировали связыванием TCR и (j) коктейлем Th2- или (k) Th17-цитокинов. Уровни экспрессии *LINE1* по данным qRT-PCR через 1, 3, 5, 7 суток у четырех индивидуумов в (a) и (b). \* P равно 0,0209 однофакторный ANOVA; \*\* P равно 0,0100 однофакторный ANOVA. (l) Уровни экспрессии *LINE1* по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов в течение 72 часов и затем обработанных ингибиторами различных сигнальных путей в течение 48 часов (n равно 4 индивидуума). Рапамицин в сравнении с контролем \* P равно 0,0286 двусторонний критерий Манна-Уитни. (m) Уровни фосфорилированного белка S6 (pS6, мишень mTORC1) оценивали количественно при помощи вестерн-блоттинга в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, активированных связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов в течение 72 часов и затем обрабатывали рапамицином или CsA. β-тубулин использовали в качестве контроля загрузки. (n) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом LINE1 RNA FISH (красный) на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые активировали связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов в течение 72 часов и затем обрабатывали рапамицином или CsA. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 10 μм.

**Фиг. 10. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки экспрессируют эволюционно древние элементы LINE1 в отличие от mESC, которые экспрессируют эволюционно молодые способные к ретротранспозиции элементы LINE1.**

(a) Тепловая карта экспрессии мобильных элементов на уровне класса, надсемейства и подсемейства в хроматине и нуклеоплазме наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в каждой реплике RNA-seq. Для расчета Z-показателя при помощи DESeq2 использовали log<sub>2</sub> трансформированное нормализованное количество прочтений. (b) Корреляционная диаграмма экспрессии подсемейств LINE1 в нуклеоплазме (ось x) и хроматине (ось y) наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток по данным RNA-seq. Подсемейства имеют цветовую кодировку на основании эволюционного происхождения: специфичные для млекопитающих (L1M, оранжевый), специфичные для приматов (L1P, синий), специфичные для человека (L1Hs, зеленый), HAL (желтый). (c) Тепловая карта экспрессии мобильных элементов на уровне класса, надсемейства и подсемейства в каждой реплике RNA-seq mESC. Для расчета Z-показателя при помощи DESeq2 использовали log<sub>2</sub> трансформированное нормализованное количество прочтений (d и f) Круговая диаграмма, отображающая распределение химерных и корректных прочтений для *Hs* LINE1 (d) и *Mm* LINE1 (f), представленных как средний процент по репликам (см. Методы) в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках. (e и g) Геномное распределение транскриптов *Hs* LINE1 (e) и *Mm* LINE1 (g) среди кодирующих белок транскрибируемых единиц, межгенных областей, lncRNA, псевдогенов и ncRNA в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках.

#### **Фиг. 11. Проверка новых транскриптов LINE1.**

(a) Транскрипционный профиль транскриптов LINE1, обнаруженных при помощи секвенирования Nanopore с длинным прочтением (n равно 407). Линия и область обозначают среднее покрытие и стандартную ошибку среднего, соответственно. (b-i) Схема мРНК LINE1-содержащих генов и новых реконструированных транскриптов LINE1; экзон LINE1 показан оранжевым. В середине приведены схемы праймеров PCR, сконструированных для верификации присутствия двух транскрипционных изоформ. Внизу: агарозный гель, демонстрирующий результаты PCR транскрипта LINE1, мРНК LINE1-содержащего гена и отрицательного контроля.

**Фиг. 12. Эволюционно древние и интронные элементы LINE1 (не способные к ретротранспозиции) в результате сплайсинга образуют новый экзон неканонических сплайс-вариантов генов, важных для клеточной активации.**

(a) Распределение длин локуса LINE1. Пунктирная линия показывает среднюю длину локуса LINE1. (b) Распределение положений локусов LINE1 относительно

полноразмерной последовательности LINE1 (6 т.п.н.). Показаны праймеры, использованные для qRT-PCR, зонды для RNA FISH и антисмысловые олигонуклеотиды (ASO) для экспериментов с нокдауном LINE1. Справа: процент локусов LINE1 в составе ORF1, ORF2, 5'UTR и 3'UTR полноразмерной последовательности LINE1. (c) Столбчатая диаграмма, показывающая процент наиболее обогащенных подсемейств LINE1 среди транскриптов LINE1. (d) Распределение локусов LINE1 среди интронов, экзонов, промоторов, 5'UTR и 3'UTR кодирующих белок генов, содержащих LINE1. (e) Консенсусные мотивы донорских и акцепторных сайтов сплайсинга экзона LINE1. (f) LINE1 RNA FISH выполняли в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных носителем (DMSO) или ингибитором ретротранскриптазы 3ТС.

**Фиг. 13. Уровни транскриптов LINE1 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя приостанавливают экспрессию канонических транскриптов, действуя в *cis*-положении**

(a) Слева: репрезентативные изображения, полученные посредством широкопольной флуоресцентной микроскопии при исследовании методом smRNA FISH, для *RAB22A.L1*, выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, а также наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали в течение 48 часов при помощи ASO к *RAB22A.L1* или контрольным (Scr) ASO. Исходное увеличение 100X. Масштабная метка 5 мкм. (b) столбчатая диаграмма, представляющая количество сигналов на ядро. (c) Репрезентативные изображения, полученные при помощи широкопольной флуоресцентной микроскопии при TSA RNA FISH для *RAB22A.L1* (красный) в комбинации с DNA FISH для геномного локуса *RAB22A* (зеленый), выполненные в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Исходное увеличение 100X. Масштабная метка 5 мкм. (d) Уровни экспрессии *RAB22A.L1* и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к *RAB22A.L1* или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). \* P равно 0,04, Двусторонний парный *t*-критерий. (e) Схематическое представление делеции LINE1-транскриптов *ARPC2* при помощи Cas9/RNP в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки подвергали нуклеофекции при помощи Cas9/RNP и поддерживали в культуре в течение 96 часов. (f) Уровни экспрессии *ARPC2.L1* и канонических транскриптов по

данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя через 96 часов после нуклеофекции с применением Cas9/RNP, нацеленных на ARPC22.L1, или контрольных (n равно 4 индивидуума). Транскрипты LINE1, ARCP2.L1 \* P равно 0,04 односторонний парный t-критерий (g) Вверху: схематическое представление положения sgRNA (синий) и контрольных праймеров PCR (черный) в локусе *IFNGR2*. В середине: проверка посредством PCR 25 нг гДНК, выделенной из наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток через 96 часов после нуклеофекции при помощи Cas9/RNP, нацеленных на *IFNGR2.L1*, или контрольных (n равно 4 индивидуума). Использовали праймеры, комплементарные последовательности «снаружи» от sgRNA. Внизу: схематическое изображение локуса предполагаемой делеции (sgRNA синим, PAM красным) с анализом путем секвенирования по Сэнгеру продукта верифицирующей PCR. (h) Вверху: схематическое представление положения sgRNA (синий) и контрольных праймеров PCR (черный) в локусе *ARCP2*. В середине: проверка посредством PCR 25 нг гДНК, выделенной из наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток через 96 часов после нуклеофекции при помощи Cas9/RNP, нацеленной на *ARCP2.L1*, или контроль (n равно 3 индивидуума). Использовали праймеры, комплементарные последовательности «снаружи» от sgRNA. Внизу: схематическое изображение локуса предполагаемой делеции (sgRNA синим, PAM красным) с анализом путем секвенирования по Сэнгеру продукта верифицирующей PCR.

**Фиг. 14. Транскрипты LINE1 препятствуют размещению H3K36me3 в генах, содержащих LINE1.**

(a) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 8 индивидуумов). Данные представлены как средние значения и  $\pm$  s.e.m. \*\*\* P менее 0,0001. Двусторонний парный t-критерий. (b) Репрезентативные изображения, полученные посредством конфокальной флуоресцентной микроскопии при LINE1 RNA FISH (красный) и иммунофлуоресцентном окрашивании (серый) на H3K36me3 и H3K4me3, выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. (c) Скрипичная диаграмма, отображающая сигнал от H3K36me3 и H3K4me3 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO,



выделенных от двух индивидуумов; оценивали по меньшей мере 267 ядер на группу. \*\*\*P менее 0,001 двусторонний критерий Манна-Уитни. **(d)** Распределение сигнала H3K4me3 вдоль тел LINE1-содержащих генов или контрольных генов в экспериментах ChIP seq при сравнении между собой наивных и активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Отложены медианные значения сигнала H3K34me3 (кратность обогащения ChIP/Input) по генам. **(e-f)** Репрезентативные треки ChIP-seq H3K4me3 и H3K36me3 для LINE1-содержащих генов ERGIC2 и контрольных генов FUCA2 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые активировали в течение 16 часов связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов. Представлены транскрипты LINE1 и позиции LINE1 в геноме. Треки покрытия ChIP-seq нормализованы относительно их соответствующей ДНК до иммунопреципитации. **(g)** Канонические транскрипты и контрольный ген (HECW1) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах H3K36me3 ChIP, выполненных на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые активировали в течение 16 часов посредством связывания TCR и коктейля Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. H3K36me3 ChIP наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в сравнении с активированными CD4<sup>+</sup> Т-клетками \*\*\* P менее 0,0001, F равно 69,42 двухфакторный ANOVA. **(h)** Канонические транскрипты и контрольный ген (HECW1) амплифицировали посредством qRT-PCR в экспериментах H3K36me3 ChIP, выполненных на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, обработанных в течение 48 часов ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение в % относительно ДНК до иммунопреципитации  $\pm$  s.e.m. H3K36me3 ChIP в группе Scr или LINE1 \*\*\* P менее 0,0001, F равно 58,86 двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 15. Транскрипты LINE1 совместно с нуклеолином препятствуют транскрипции LINE1-содержащих генов.**

**(a)** Уровни экспрессии *нуклеолина* по данным qRT-PCR и **(b)** уровни белка в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO, в анализ включали 8 индивидуумов. Данные представлены как средние значения и  $\pm$  s.e.m. \*\*\* P менее 0,0482. Двусторонний парный *t*-критерий. **(c)** Репрезентативные изображения, полученные посредством

конфокальной флуоресцентной микроскопии при LINE1 RNA FISH (красный) и иммунофлуоресцентном окрашивании (серый) на H3K36me3, выполненные на наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO. Исходное увеличение 63X. Масштабная метка 5 мкм. **(d)** Скрипичная диаграмма, отображающая сигнал H3K36me3 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных нуклеолином или контрольным (Scr) ASO, выделенных у трех индивидуумов; оценивали по меньшей мере 259 ядер на группу. \*\*\* P менее 0,001, двусторонний критерий Манна-Уитни. **(e)** Содержание *GAPDH* и *MALAT1* (цитоплазматические и ядерные контрольные транскрипты) в цитоплазме, нуклеоплазме и хроматине наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к нуклеолину или контрольным (Scr) ASO (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение.

**Фиг. 16. Экспрессия транскриптов LINE1 снижается при активации Т-клеток, тогда как экспрессия канонических транскриптов повышается.**

**(a)** Уровень экспрессии канонических транскриптов и трех случайных наборов контрольных генов, которые не сохраняют геномных элементов LINE1 (контрольные гены без LINE1) и контрольных генов, которые сохраняют элементы LINE1, но не образуют транскриптов LINE1 (контрольные гены с LINE1) в массивах данных RNA-seq наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя и активированных. \*\*\* P менее 0,001 знаковый ранговый критерий Уилкоксона **(b)** Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и активированных в течение 16 часов связыванием TCR и коктейлем Th1-цитокинов (n равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. Транскрипты LINE1 \*\* P равно 0,0024, F равно 13,65 Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты \*\*\* P равно 0,0003, F равно 23,30 Двухфакторный ANOVA. **(c)** Исследование мотива связывания транскрипционных факторов (TF) проводили на промоторных областях LINE1-содержащих генов; отфильтровывали TF, статистически повышенные в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках по сравнению с наивными CD8<sup>+</sup> Т-клетками как в массивах данных RNA-seq, так и в протеомных массивах данных (см. Методы), IRF4 является одним из демонстрирующих наибольшее обогащение. **(d)** Уровни экспрессии IRF4 по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и

активированных ( $n$  равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \* (e) Уровни экспрессии IRF4 по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO ( $n$  равно 3 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \*\*  $P$  равно 0,0042, Двусторонний парный t-критерий. (f) Уровни IRF4 по данным FACS(сортировка флуоресцентно активированных клеток)-анализа в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO.

**Фиг. 17. MATR3/PTBP1 подавляют сплайсинг экзонов LINE1 в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках.**

(a) Уровни экспрессии PTBP1 по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к PTBP1 или контрольным (Scr) ASO и затем активировали в течение 16 часов посредством связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m.  $n$  равно 3 индивидуума. \*\*  $P$  равно 0,0014 Двусторонний парный t-критерий. (b) Уровни PTBP1 по данным FACS-анализа в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных ASO к PTBP1 или контрольным (Scr) ASO. (c) Уровни экспрессии GTF2F1 по данным qRT-PCR и уровни белка (d) в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к GTF2F1 или контрольным (Scr) ASO, анализ проводили на четырех индивидуумах. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \*\*  $P$  равно 0,0031, Двусторонний парный t-критерий. (e) Уровни экспрессии MATR3 по данным qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, которые обрабатывали в течение 48 часов MATR3 или контрольным (Scr) ASO и затем активировали в течение 16 часов посредством связывания TCR в присутствии коктейля цитокинов Th1. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m.  $n$  равно 3 индивидуума \*\*\*  $P$  равно 0,0006, Двусторонний парный t-критерий. (f) Уровни MATR3 по данным FACS-анализа в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных MATR3 или контрольным (Scr). (g) Уровни экспрессии транскриптов LINE1 и канонических транскриптов по данным qRT-PCR в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к MATR3 или контрольным (Scr) ASO и затем активировали в течение 16 часов

посредством связывания TCR в присутствии коктейля Th1-цитокинов (n равно 4 индивидуума). Транскрипты LINE1 \*\*\* P равно 0,001, F равно 44,8, Двухфакторный ANOVA; Канонические транскрипты, \*\* P менее 0,006, F равно 29,3, Двухфакторный ANOVA.

**Фиг. 18. РНК LINE1 заново накапливаются в дисфункциональных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах *in vitro*.**

(a) Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя активировали и дифференцировали в Th1 и каждые 2 суток подвергали воздействию активирующего моноклонального антитела к CD3 (анти-CD3 mAb); хроническая стимуляция анти-CD3 индуцирует остановку роста, экспрессию поверхностного маркера PD-1 и снижение образования IFN $\gamma$ . (b) Слева: количество эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клеток через 2 – 4 – 6 – 8 – 10 суток (n равно 5 индивидуумов). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 57,22 Двухфакторный ANOVA. В середине: положительные по PD-1 клетки среди эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клеток через 2 – 5 – 7 – 9 суток (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m, \*\*\* P менее 0,0001, F равно 48,77 Двухфакторный ANOVA. Справа: положительные по IFN $\gamma$  клетки среди эффекторных CD4<sup>+</sup> и дисфункциональных CD4<sup>+</sup> Т-клеток через 9 суток (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \* P равно 0,032. Односторонний парный *t*-критерий. (c) Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя активировали и каждые 2 суток подвергали воздействию активирующего анти-CD3 mAb; хроническая стимуляция анти-CD3 индуцирует остановку роста, экспрессию поверхностного маркера PD-1 и снижение образования IFN $\gamma$ , GrzB и PerfA. (b) Слева: количество эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клеток через 2 – 4 – 6 – 8 суток. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m, N равно 4 индивидуума. \*\*\* P менее 0,0003, F равно 26,05 Двухфакторный ANOVA. В середине: положительные по PD-1 клетки среди эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клеток через 2 – 5 – 7 суток. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m, N равно 4 индивидуума. \*\*\* P менее 0,0001, F равно 58 Двухфакторный ANOVA. Справа: положительные по IFN $\gamma$ , GrzB и PerfA клетки среди эффекторных CD8<sup>+</sup> и дисфункциональных CD8<sup>+</sup> Т-клеток через 9 суток. Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m, N равно 4

индивидуума.  $IFN\gamma$  \*  $P$  равно 0,01; GrzB \*  $P$  равно 0,02. Двусторонний парный  $t$ -критерий. (e) Уровни IRF4 по данным FACS-анализа в дисфункциональных  $CD4^+$  и  $CD8^+$ Т-клетках, которые обрабатывали в течение 48 часов ASO к IRF4 или контрольным (Scr) ASO.

**Фиг. 19. Транскрипты LINE1 регулируют истощенный фенотип  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов *in vitro*.**

(a) Схематическое представление иммунологических исследований, проведенных на эффекторных  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетках, подвергнутых истощению *in vitro* и обработке ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO. После обработки ASO исследовали секрецию эффекторных цитокинов истощенными  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-клетками (панель d и e), их способность убивать гетерологичные антигенпрезентирующие клетки, несущие МНСII и МНСI, такие как моноциты (панель f и g), и пролиферативную способность (панель h и i) (b-c) Уровни экспрессии *LINE1* по данным qRT-PCR в истощенных  $CD4^+$  (b) и  $CD8^+$  (c) Т-клетках, которые обрабатывали ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m.  $CD4^+$  Т-клетки \*\*  $P$  равно 0,004;  $CD8^+$  Т-клетки \*\*  $P$  равно 0,007, Двусторонний парный  $t$ -критерий. (d) Процент положительных по  $IFN\gamma$  или GrzB истощенных  $CD4^+$  Т-клеток, которые обрабатывали ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m. \*  $P$  равно 0,0336, Односторонний парный  $t$ -критерий. (e) Процент положительных по  $IFN\gamma$ , GrzB или PerfA истощенных  $CD8^+$  Т-клеток, которые обрабатывали ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO (n равно 4 индивидуума). Данные представлены как среднее значение и  $\pm$  s.e.m.  $IFN\gamma$  \*\*  $P$  равно 0,002; GrzB \*\*  $P$  равно 0,004, PerfA \*\*\*  $P$  менее 0,001, Двусторонний парный  $t$ -критерий. (f-g) Процент мертвых гетерологичных моноцитов, культивированных совместно в течение 12 часов с истощенными  $CD4^+$  (f) или  $CD8^+$  (g) Т-клетками, обработанными ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO.  $CD4^+$  Т-клетки \*\*  $P$  равно 0,009;  $CD8^+$  Т-клетки \*\*  $P$  равно 0,008, Двусторонний парный  $t$ -критерий. (h-i) Исследование пролиферации истощенных  $CD4^+$  (h) или  $CD8^+$  (i) Т-клеток, обработанных ASO к LINE1 или контрольным (Scr) ASO, с применением реагента Cell trace.

**ПРИМЕР 1.**

**Материалы и методы**

### **Образцы крови и ткани человека**

Кровь анонимных здоровых доноров была предоставлена Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico в Милане. Возраст и пол здоровых доноров не сообщались (персональные данные). Периферическую кровь у пациентов с лимфангиолейомиоматозом (LAM) получали из больницы San Giuseppe-MultiMedica IRCCS в Милане. Периферическую кровь у пациентов, подвергшихся трансплантации почки, принимавших эверолимус, получали из Fondazione IRCCS Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico, Милан. Образцы колоректального рака (CRC) и образцы немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) были предоставлены Европейским институтом онкологии (IEO), неопухолевые образцы были получены из нормальной прилегающей ткани на расстоянии по меньшей мере 10 см от очага; ни один пациент не подвергался паллиативному оперативному вмешательству или неoadьювантной химио- и/или лучевой терапии. Этические комитеты больниц одобрили применение человеческих образцов для исследовательских целей, и от всех пациентов было получено информированное согласие.

### **Выделение и сортировка Т-клеток и выделение моноцитов**

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из образцов крови человека при помощи центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus. Из PBMC выделяли Т-клетки посредством отрицательной селекции с применением магнитного сепаратора (AutoMACS Pro Separator; Miltenyi Biotec) с использованием набора для выделения пан-Т-клеток (Miltenyi Biotec) или набора для выделения CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Miltenyi Biotec). Т-клетки окрашивали антителами на поверхностные маркеры и отсортировывали субпопуляции Т-клеток посредством проточной цитометрии: наивные CD4<sup>+</sup> как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-high</sup>CD45RO<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> Th1 клетки как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-high</sup>CD45RO<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> Th2 клетки как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-high</sup>CD45RO<sup>+</sup>CRTH2<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Th17 клетки как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-high</sup>CD45RO<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>; наивные CD8<sup>+</sup> как CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки памяти как CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. Для выделения инфильтрирующих ткань лимфоцитов опухоль и прилежащие нормальные ткани несколько раз промывали и выдерживали в течение ночи при 4°C в среде RPMI 1640 (институт имени Розуэлла Парка), с добавлением 400 мкг/мл гентамицина, 15 мкг/мл амфотерицина, 500 Ед/мл пенициллина

и 500 мкг/мл стрептомицина. Затем ткани взвешивали, разрушали и в течение 20 мин обрабатывали при 37°C хелатирующим буфером с EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) (5 mM EDTA, 1 mM DTT (дителиотреитол) и 67 мкг/мл ДНКазы I в HBSS) по 5 мл на г ткани. Ткани центрифугировали при 500g и комнатной температуре (RT), промывали сбалансированным солевым раствором Хенка (HBSS) (Gibco) и расщепляли 5 мл/г расщепляющего раствора (1 мг/мл коллагеназы D и 67 мкг/мл ДНКазы, разведенной в HBSS, с добавлением антибиотиков) в течение 3 ч при 37°C при перемешивании. Высвобожденные клетки пропускали через 70-мкм сито, двукратно промывали HBSS в течение 10 мин при 500g и 4°C и разделяли методом седиментации в градиенте Percoll (100% - 60% - 40% - 30%) в течение 30 мин при 400g. Выделяли Т-клетки из поверхности раздела между слоями 60% и 40% Percoll и окрашивали антителами к поверхностным маркерам. Затем отсортировывали субпопуляции Т-клеток при помощи проточной цитометрии: CD4<sup>+</sup> клетки памяти как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-/high</sup>CD45RO<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки памяти как CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>. Для сортировки при помощи проточной цитометрии использовали следующие антитела: анти-CD4-APCCy7 (BD Biosciences; клон: RPA-T4) или анти-CD4-VioGreen (Miltenyi Biotec; клон: VIT4); анти-CD8-VioGreen (Miltenyi Biotec; клон: REA-734) или анти-CD8-VioBlue (Miltenyi Biotec; клон: REA734); анти-CD25-PECy7 (Invitrogen by Life Technologies; клон: BC96); анти-CD127-PECy5 (BioLegend; клон: A019D5) или анти-CD127-PE (Miltenyi Biotec; клон: MB15-18C9); анти-CD45RO-BV605 (BioLegend; клон: UCHL1) или анти-CD45RO-APC (Miltenyi Biotec; клон: UCHL1); анти-CD3-PE (BD Biosciences; клон: UCHT1 ); анти-CD45-Pacific Blue (BioLegend; клон 2D1); анти-CD183-PECy5 (BD Biosciences; клон: 1C6/CXCR3); анти-CD294(CRTH2)-APC-Vio770 (Miltenyi Biotec; клон: REA598); анти-CCR6-FITC (BioLegend; клон: G034E3). Сортинг клеток осуществляли при помощи FACSAria III (BD Bioscience). Чистота отсортированных клеток составляла более 97,5%. Моноциты выделяли из PBMC путем положительной селекции на магнитном сепараторе (AutoMACS Pro Separator; Miltenyi Biotec) с использованием микрочастиц, конъюгированных с антителом к CD14 (Miltenyi Biotec).

#### **Дифференцировка CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro***

Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя высевали по 1,5 x 10<sup>6</sup>/мл, стимулировали активатором человеческих Т-клеток Dynabeads анти-CD3/анти-CD28

(Gibco; кат. номер 1131D) и культивировали в течение нескольких часов (активированные наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки) или суток (эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки) в соответствующей среде для дифференцировки Т-хелперов. Среда для дифференцировки Т-хелперов представляет собой полную среду, состоящую из RPMI 1640 с GlutaMAX-I (Gibco) с добавлением 10% (об./об.) эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco), 1% (об./об.) заменимых аминокислот, 1 мМ пирувата натрия, 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, плюс Т-хелпер-специфичных цитокинов. Th1-цитокينات: 20 МЕ/мл рекомбинантный IL-2 (кат. номер 130-097-744), 10 нг/мл рекомбинантный IL-12 (кат. номер 130-0976-704), 2 мкг/мл нейтрализующее анти-IL-4 (кат. номер 130-095-753). Th2-цитокينات: 100 МЕ/мл рекомбинантный IL-2, 10 нг/мл рекомбинантный IL-4 (кат. номер 130-093-919), 2 мкг/мл нейтрализующее анти-IL-12 (кат. номер 130-095-755) и анти-IFN- $\gamma$  (кат. номер 130-095-743). Th17-цитокينات: 10 нг/мл рекомбинантный IL-1b (кат. номер 130-095-374), 10 нг/мл IL-6 (кат. номер 130-095-365) и 10 нг/мл IL-23 (кат. номер 130-095-757), 1 нг/мл рекомбинантный TGF- $\beta$ 1 (кат. номер 130-108-971), 2 мкг/мл нейтрализующее анти-IL-12, анти-IL-4 анти-IFN- $\gamma$  (Miltenyi Biotec). Наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя высевали по  $1,5 \times 10^6$ /мл, стимулировали активатором человеческих Т-клеток Dynabeads анти-CD3/анти-CD28 и культивировали в течение нескольких суток (эффекторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки) в полной среде с добавлением 20 МЕ/мл рекомбинантного IL-2. Клетки культивировали при 37°C в инкубаторе с влажной атмосферой в присутствии 5% CO<sub>2</sub>, подсчитывали и осуществляли пассаж каждые 2-3 суток.

#### **Дисфункциональные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки *in vitro***

Дисфункциональные хронически стимулированные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки получали, как описано в <sup>66</sup>, с небольшими модификациями. Вкратце, наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки активировали и дифференцировали в фенотип Th1, тогда как наивные CD8<sup>+</sup> Т-клетки активировали полной средой с добавлением 20 МЕ/мл рекомбинантного IL-2, каждые 2 суток Т-клетки подсчитывали и подвергали воздействию частиц, конъюгированных со стимулирующими анти-CD3/анти-CD28. У дисфункциональных хронически стимулированных Т-клеток исследовали снижение пролиферации, повышение маркера PD-1 и эффекторные свойства Т-клеток, которые оценивали посредством внутриклеточного окрашивания на линиеспецифические цитокины.



Подвергнутые иммуносупрессии CD4<sup>+</sup> Т-клетки получали, как описано <sup>67</sup>, вкратце, наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, стимулированные дифференцироваться в Th1 в течение 4 суток, культивировали с 50 нг/мл TGF-β в течение 24-72 часов. Эффекторные свойства подвергнутых иммуносупрессии Т-клеток оценивали посредством внутриклеточного окрашивания на линииспецифические цитокины.

### **Обработка Т-клеток**

Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя обрабатывали в течение 16 ч актиномицином D 5 мкг/мл (Merck; кат. номер A9415), как описано в <sup>68</sup>. Ингибирование сигнального пути TCR осуществляли с применением следующих иммуносупрессивных лекарственных средств: Рапамицин (100 нМ; Merck; кат. номер R8781) для mTORC1, циклоспорин А (0,5 мкг/мл; Merck; кат. номер C3662) для пути кальциневрина, дексаметазон (1 μМ; Merck; кат. номер D4902) для пути NF-κB. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя предварительно обрабатывали в течение 2 часов вышеупомянутыми лекарственными средствами, затем стимулировали реагентом Dynabeads для активации человеческих Т-клеток, представляющим собой частицы, конъюгированные с антителами к CD3 и к CD28 (анти-CD3/анти-CD28), в среде для Th1 в присутствии различных ингибиторов; Т-клетки собирали через 2, 4, 8 ч после активации. Или же наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, которые активировали и культивировали в среде для Th1 в течение 72 ч, подвергали обработке лекарственными средствами в течение 48 ч. У обработанных клеток контролировали их жизнеспособность и оценивали эффективность обработки.

### **Эксперименты с нокдауном**

Эксперименты с нокдауном проводили с применением FANA (2'-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновой кислоты, <https://www.aumbiotech.com>) – антисмысловых олигонуклеотидов (ASO). Для мРНК GTF2F1, нуклеолина, MATR3 и PTBP1 использовали четыре ASO; для мРНК IRF4 использовали два FANA-ASO. Для РНК LINE1 конструировали пять ASO к области ORF2 консенсусной последовательности LINE1, тогда как для HIRA.L1 или RAB22A.L1 конструировали три ASO к уникальной и специфической части последовательности транскриптов LINE1. В качестве контроля использовали нерелевантный рандомизированный (Scr) ASO. ASO смешивали в эквимольном соотношении и вводили в отсутствие какого-либо трансфицирующего

реагента (посредством гимнозиса) согласно инструкциям производителя в конечной концентрации 10 мкМ. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя, выделенные у здоровых доноров, культивировали в течение 48 ч в полной среде с добавлением 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 и 10 мкМ ASO; наивные CD4<sup>+</sup>, обработанные ASO, активировали с применением частиц, конъюгированных среднее значение анти-CD3/анти-CD28, в среде Th1 и в присутствии 10 мкМ ASO, Т-клетки собирали через 16 ч (активированные CD4<sup>+</sup>) или семь суток (эффektorные CD4<sup>+</sup>). Хронически стимулированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки обрабатывали, начиная со 2 суток 10 мкМ ASO и собирали для последующего анализа на 9 сутки для нокдауна LINE1, или же их обрабатывали, начиная с 6 суток в течение 48 ч для нокдауна IRF4. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти, выделенные из образцов опухолей, культивировали в течение 48 ч в полной среде с добавлением 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 и 10 мкМ ASO. Через 48 ч обработки ASO клетки окрашивали на поверхностные маркеры и Т-клеточную цитотоксичность, в качестве альтернативы клетки активировали в течение дополнительных 48 ч и осуществляли внутриклеточное окрашивание на цитокины. Эффективность нокдауна контролировали посредством RT-qPCR и/или RNA-FISH и вестерн-блоттинга или FACS-анализа (описано ниже).

#### **Поверхностное и внутриклеточное окрашивание Т-клеток и исследование пролиферации**

Окрашивание поверхностных маркеров осуществляли путем инкубации 1 мкл антитела с  $5 \times 10^4$  клеток в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) при 37°C в течение 30 мин. Т-клетки промывали PBS и затем анализировали. Использовали следующие антитела: анти-CD279 (PD-1)-Alexa Fluor 488 (BioLegend; клон: EH12.2H7), анти-CD366 (TIM3-1)-BV650 (BioLegend; клон: F38-2E2) и анти-CD223 (LAG-3)-BV785 (BioLegend; клон: 11C3C65). Для окрашивания на внутриклеточные цитокины и транскрипционные факторы  $5 \times 10^4$  Т-клеток стимулировали 50 нг/мл форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA) и 0,5 мкг/мл иономицина в течение 2 ч при 37°C, затем добавляли 100 мкг/мл брефельдина А (Merck) и инкубировали дополнительно 2 ч при 37°C. Клетки промывали, фиксировали и пермеабелизовали в течение 30 мин при 4°C с использованием набора для фиксации/пермеабелизации для фактора транскрипции Foxp3 (Invitrogen by Life Technologies) согласно инструкциям производителя.

Окрашивание на цитокины и транскрипционные факторы осуществляли путем инкубации 1мкл антитела на  $5 \times 10^4$  клеток, разведенных в буфере для пермеабиллизации (Invitrogen by Life Technologies) в течение 20 мин при комнатной температуре. Т-клетки промывали в PBS и затем анализировали. Для внутриклеточного окрашивания использовали следующие антитела: анти-IFN- $\gamma$ -V450 (клон: B27), анти-GrzB-FITC (клон: GB11), анти-PerfA-APC (клон: deltaG9), анти-PerfA-PE (клон: deltaG9), анти-T-bet-V450 (клон: O4-46) (BD Biosciences). Для окрашивания на MATR3, PTPB1 и IRF4 методом FACS Т-клетки фиксировали и пермеабиллизовали, как указано выше, в течение 30 мин при 4°C. Затем клетки инкубировали с 1 мкл первичного антитела на  $5 \times 10^4$  клеток, разведенных в буфере для пермеабиллизации (Invitrogen by Life Technologies) в течение 1 ч при комнатной температуре. Т-клетки промывали в PBS и окрашивали вторичным антителом в течение 30 мин при комнатной температуре. Т-клетки промывали в PBS и затем анализировали. Использовали следующие первичные антитела: анти-MATR3 (Abcam, кат. номер Ab151714), анти-PTBP1 (Abcam, кат. номер Ab133734) и анти-IRF4 (BioLegend, кат. номер 646412). В качестве вторичных антител использовали: козье антитело к иммуноглобулинам кролика, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (Invitrogen LifeTechnologies), и козье антитело к иммуноглобулинам крысы, конъюгированное с Alexa Fluor 647 (Invitrogen LifeTechnologies). Исследование пролиферации в хронически стимулированных клетках осуществляли при помощи реагента cell trace (C34557), наивные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки инкубировали с 1 мкл реагента cell trace на  $1 \times 10^6$  клеток в фосфатно-солевом буфере (PBS) при 37°C в течение 20 мин. Затем клетки промывали 10% FBS в течение 5 мин при 37°C и активировали как указано выше, оценивали пролиферацию через семь суток после активации. Во всех вышеупомянутых исследованиях в среднем анализировали  $10^4$  клеток при помощи FACSCanto I (BD Biosciences) и обрабатывали данные при помощи программного обеспечения FlowJo v.10.

### **Анализ уничтожения**

Дисфункциональные хронически стимулированные эффекторные CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, обработанные ASO, культивировали совместно в течение 12 часов с гетерологичными моноцитами в соотношении 1:1. CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки памяти, инфильтрирующие NSCLC или CRC, обработанные FANA-ASO в течение 48 ч,

культивировали совместно в течение 12 часов с гетерологичными моноцитами в соотношении 1:1. После совместного культивирования клетки окрашивали с применением набора для окрашивания клеток LIVE/DEAD Fixable Green Dead Cell Stain (Invitrogen by Life Technologies; кат. номер L34969) в течение 20 мин при комнатной температуре, промывали PBS и окрашивали CD14-APC (клон: M5E2) для распознавания моноцитов. Моноциты идентифицировали как положительные по CD14 и оценивали их жизнеспособность, выраженную как % мертвых моноцитов. В среднем анализировали  $10^4$  клеток при помощи FACSCanto I (BD Biosciences) и обрабатывали данные при помощи программного обеспечения FlowJo v.10.

### **Выделение РНК и qRT-PCR**

Общую РНК выделяли с применением набора RNeasy Mini (QIAGEN) и QIAshredder (QIAGEN) согласно инструкциям производителя. В ходе выделения применяли ДНКазу из набора RNase-free DNase (QIAGEN). Выполняли обратную транскрипцию общей РНК с применением набора SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen by Life Technologies) согласно инструкциям производителя. Осуществляли количественную PCR в реальном времени на оборудовании StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem by Life Technologies) с применением смеси для PCR Power SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystem by Life Technologies). Все данные по экспрессии генов нормализовали по двум независимым генам домашнего хозяйства (*18S*, *GAPDH*). По нормализованным значениям Ct рассчитывали 2-dCt или 2-ddCt. Для нормализации при обработке актиномицином D в качестве внутреннего стандарта вносили РНК *D. Malanogaster*.

### **RNA-FISH и RNA FISH плюс иммунофлуоресценция**

RNA-FISH и комбинированную RNA-FISH-иммунофлуоресценцию осуществляли, как описано в <sup>69</sup>. Вкратце, антисмысловые биотинилированные рибозонды для LINE1, AluY и HERVK транскрибировали *in vitro* с применением набора для транскрипции MAXIscript T7 (Invitrogen) и смеси для мечения РНК биотином (Roche). В каждом эксперименте использовали 50-100 нг антисмысловых биотинилированных рибозондов. Фиксированные 3% параформальдегидом (PFA) T-клетки отмывали 0,05% Triton-X-100 в PBS, пермеабелизовали 0,5% Triton-X-100 в PBS и хранили в 20% глицерине/PBS. Клетки замораживали и оттаивали на сухом льду и

депротеинизировали 0,1 М HCl. Т-клетки гибридизовали с рибозондами при 52,5°C в течение 3,5 мин и инкубировали в течение ночи при 37°C на водяной бане. Стекла промывали 50% формальдегидом в 2X SSC, 2X SSC, 1X SSC и 4X SSC/0,2% Tween-20. Т-клетки блокировали в BSA и затем инкубировали со стрептавидином-HRP (1:1000; Perkin Elmer by Acoya Biosciences), разведенным в TNT/BSA (0,1 М TrisHCl pH 8, 0,150 М NaCl, 0,1% NP-40, 4% BSA в DEPC). Т-клетки промывали 4 раза TNT и амплифицировали сигнал путем инкубации с рабочим раствором TSA (1:150) в 1x буфере для амплификации в течение 3 мин (набор TSA Plus Fluorescent Cy3.5 (Perkin Elmer)). Т-клетки промывали 4 раза TNT, докрашивали ядра 1 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Стекла заключали в заключающую среду prolong Diamond, препятствующую выгоранию флуоресценции. Когда RNA-FISH сочетали с иммунофлуоресценцией, Т-клетки инкубировали с первичными антителами к H3K4me3 1:250 (Millipore 07-473), H3K36me3 1:250 (Abcam, кат. номер 9050) и H3K9me3 1:500 (Abcam, кат. номер Ab8898) в 2% BSA/10% козьей сыворотки/0,1% Tween/PBS в течение ночи при 4°C. Использовали вторичное антитело, конъюгированное с Alexa Fluor 647. Изображения получали с применением конфокального микроскопа Leica TCS SP5 с объективом HCX PL APO 63x/1.40-NA с иммерсионным маслом и осуществляли съемку серии оптических срезов по оси Z через каждые 0,3 мкм в случайно выбранных полях зрения.

### **Количественная оценка сигнала RNA FISH**

Для количественной оценки средней интенсивности флуоресценции сигнала РНК в реконструированных трехмерных изображениях ядер проводили анализ с использованием программного обеспечения NIS-Elements (Nikon). В «Общем Анализе» создавали маску сигналов DAPI для идентификации отдельных ядер, а затем выполняли «трехмерное измерение» сигналов РНК в каждом ядре. Для обнаружения колокализации сигналов РНК и гистоновых меток использовали программное обеспечение ImageJ для определения корреляции Пирсона при помощи команды «Порог колокализации» для каждого ядра.

### **RNA FISH с детекцией единичных молекул (smRNA FISH) и определение относительного количества транскриптов LINE1**

RNA FISH с детекцией единичных молекул (smRNA FISH) выполняли с

применением технологии HuluFISH. Антисмысловые рибозонды к специфичным и уникальным областям LINE1-транскриптов *HIRA.L1* или *RAB22A.L1* конструировали в Pixelbio, синтезировали их напрямую мечеными ATTO-568 в случае *RAB22A.L1* и ATTO-647 в случае *HIRA.L1*. Наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя, которые активировали в течение 8 ч, или наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки с нокдауном транскриптов *HIRA.L1* или *RAB22A.L1* высевали на стекла, покрытые поли-лизинном и фиксировали 4% PFA, промывали 135 мМ глицином и выдерживали в 70% EtOH в течение ночи. Затем Т-клетки ополаскивали 20% глицерином в течение 1 ч и затем обрабатывали 0,025% пепсином в 0,01N HCl в течение 3,5 мин. Затем Т-клетки гибридизовали с зондами, разведенными 1:40 в 20% формамиде/ 2X SSC/ 10% декстрансульфате для *RAB22A.L1* и 10% формамиде / 2X SSC/ 10% декстрансульфате для *HIRA.L1* и инкубировали с рибозондами в течение ночи при 37°C на водяной бане. Стекла промывали три раза по 5 мин в 10% формамиде / 2X SSC для зондов к *HIRA.L1*, 20% формамиде / 2XSSC и в течение 5 мин 2XSSC для зондов к *RAB22A.L1*, ядра докрашивали 1 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Стекла заключали в заключающую среду prolong, препятствующую выгоранию флуоресценции. Результаты smRNA FISH анализировали при помощи микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon Instruments) Plan Apo λ с иммерсионным объективом 100x (Nikon). В случайно выбранных полях зрения осуществляли съемку серии оптических срезов на расстоянии 0,3 по оси Z, у каждого индивидуума анализировали минимум 90 клеток и подсчитывали число сигналов на клетку с маскированием экспериментальной выборки для сотрудника, осуществляющего подсчет.

#### **TSA RNA FISH в комбинации с DNA FISH**

Протокол RNA FISH с TSA в комбинации с DNA FISH брали из <sup>70</sup> и <sup>69,71</sup>. Антисмысловой TEG-биотинилированный олигонуклеотид для *HIRA.L1* или *RAB22A.L1* синтезировали в Eurofins Genomics, использовали зонды той же последовательности, как и для smRNA FISH. Наивные cd4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя фиксировали 4% PFA, промывали 0,05% Triton-X-100 в PBS, пермеабелизовали 0,5% Triton-X-100 в PBS и выдерживали в 20% глицерине/PBS в течение ночи. Клетки замораживали и размораживали на сухом льду, депротеинизировали 0,1 М HCl и 0,025% пепсином в 0,01 N HCl. Т-клетки гибридизовали с 1-6 нг биотинилированных зондов,

разведенных в 20% формамиде/ 2X SSC/ 10% декстрансульфате для RAB22A.L1 и 10% формамиде / 2X SSC/ 10% декстрансульфате и инкубировали в течение ночи при 37°C на водяной бане. Стекла промывали 50% формамидом в 2X SSC, блокировали TBN/BSA (0,1 M TrisHCl pH 8, 150 mM NaCl, 4% BSA в DEPC) в BSA и затем инкубировали со стрептавидином-HRP (1:10000; Perkin Elmer by Akoya Biosciences), разведенным в TNT/BSA (100 mM TrisHCl pH 8, 150 M NaCl, 0,2% Tween-20, 4% BSA в DEPC). Т-клетки промывали 3 раза TNT и амплифицировали сигнал путем инкубации с рабочим раствором TSA (1:300) в 1x буфере для амплификации в течение 5 мин (флуоресцентный набор TSA Plus Cy3.5 (Perkin Elmer)). Т-клетки промывали 3 раза TNT, осуществляли пост-фиксацию в 4% PFA в течение 2 мин и затем оставляли в 50% формамиде / 2XSSC по меньшей мере на 10 часов. ДНК зонд для HIRA или RAB22A получали путем нуклеотидной транскрипции ВАС (HIRA: RP11-1057H19; RAB22A: RP11-452017, ВАСРАС Chori) и мечения дигоксигенином-11-dUTP, как описано в <sup>69</sup>. Т-клетки гибридизовали при 75°C в течение 5 мин и инкубировали в течение ночи при 37°C на водяной бане. Стекла промывали 2X SSC, 0,1X SSC и ополаскивали 4X SSC/0,2% Tween-20. Т-клетки блокировали BSA и затем инкубировали с антителом к дигоксигенину-488 (1:150; Vector Laboratories DI-7488), разведенным в 4X SSC/0,2% Tween-20/4% BSA. Т-клетки промывали 3 раза 4X SSC/0.2% Tween-20 и затем докрашивали ядра 1 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Стекла заключали в заключающую среду prolong, препятствующую выгоранию флуоресценции. Результаты TSA RNA FISH в комбинации с DNA FISH анализировали при помощи микроскопа Eclipse Ti-E (Nikon Instruments) Plan Apo λ с иммерсионным объективом 100x (Nikon), осуществляя съемку серии оптических срезов на расстоянии 0,3 по оси Z в случайно выбранных полях зрения.

#### **Опосредованная CRISPR-Cas9 делеция элементов LINE1 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя**

Для геномной делеции элемента LINE1 авторы изобретения использовали две различные sgRNA, мишенями которых являлись сайты, фланкирующие повторяющийся элемент, для чего сконструировали две sgRNA для каждой последовательности-мишени, то есть LINE1, содержащегося в ARCP2.L1 и IFNGR2.L1. Рибонуклеиновые комплексы Cas9-sgRNA переносили в наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки в состоянии покоя путем нуклеофекции. Для каждой sgRNA готовили комплекс Cas9-sgRNA в соотношении 1:3,

аккуратно смешивая 40 мкМ нуклеазы Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (IDT, кат. номер 1081061) и 120 мкМ sgRNA (Merck), давали образоваться комплексам в течение 15 минут при 37°C. Оба комплекса Cas9-sgRNA добавляли к  $1 \times 10^6$  наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, которые ресуспендировали в 20 мкл раствора для нуклеофекции первичных клеток (набор P3 Primary Cells 4D Nucleofector X kit S, Lonza); предварительно осуществляли сортировку наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя и поддерживали их в культуре в течение 24 ч в полной среде с добавлением 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2. Комплексы Cas9-sgRNA и наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки переносили в полоски с кюветами для нуклеофекции (P3 Primary Cells 4D Nucleofector X kit S, Lonza, кат. номер LOV4XP3032) и осуществляли электропорацию с применением устройства 4D Nucleofector (4D Nucleofector, Lonza), используя программу подачи импульсов EH115. После нуклеофекции клетки ресуспендировали в полной среде с добавлением 200 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 и поддерживали в культуре в течение 4 суток при 37°C в инкубаторе с влажной атмосферой и 5% CO<sub>2</sub>. Верифицировали делецию посредством PCR с ДНК-полимеразой GoTaq G2 Flexi на геномной ДНК, выделенной из подвергнутых нуклеофекции наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Конструировали праймеры к участкам до и после положений sgRNA на *IFNGR2.L1* и *ARCP2.L1*. Осуществляли ТА-клонирование продуктов PCR и секвенирование по Сэнгеру, как описано в <sup>72</sup>.

#### **Выделение белков и анализ методом вестерн-блоттинг**

Выделение гистонов и последующий анализ методом вестерн-блоттинг осуществляли, как описано в <sup>73</sup>. Вкратце,  $1,5 \times 10^6$  Т-клеток лизировали в буфере для выделения цитоплазматических белков (10 мМ HEPES KOH pH 8, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ DTT, 1× ингибитор протеаз) и собирали ядра при 1500g и 4°C, промывали три раза равным объемом буфера для выделения цитоплазматических белков и ресуспендировали в 0,2 N HCl в течение ночи при 4°C на ротационном шейкере. Экстракты гистонов собирали путем центрифугирования при 16300g в течение 10 мин при 4°C. Экстракцию ядерных белков осуществляли, как описано в <sup>73</sup>. Вкратце,  $1 \times 10^6$  Т-клеток лизировали в буфере для выделения цитоплазматических белков (10 мМ HEPES KOH pH 8, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 10% глицерин, 1× ингибитор протеаз), собирали ядра при 1200g и 4°C, промывали три раза равным объемом буфера для выделения цитоплазматических белков и ресуспендировали в буфере для выделения



ядерных белков (10 mM HEPES KOH pH 8, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,2% NP-40, 10% глицерин, 1× ингибитор протеаз) с добавлением 2 mM CaCl<sub>2</sub> и 20 Ед нуклеазы микрококков и оставляли при 37°C в течение 30 мин. Выделение общих белков осуществляли, как описано в <sup>68</sup>. Проводили количественную оценку экстрактов белков при помощи флуориметра Qubit (Invitrogen) и использовали в дальнейшем анализе методом вестерн-блоттинга. Для вестерн-блоттинга использовали 1-5 µг экстракта гистонов и 20-40 мкг экстракта ядер или общего экстракта. Белки разделяли в 4-12% полиакриламидном геле Bolt Bis-Tris (Invitrogen) и переносили путем мокрого переноса на нитроцеллюлозную мембрану. Мембрану блокировали и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичным антителом: H3K4me3 (Millipore, кат. номер 07-473), H3K9me3 (Abcam, кат. номер Ab8898), H3K36me3 (Abcam, кат. номер Ab9050), H3K27me3 (Millipore, кат. номер 07-449), H3 (Abcam, кат. номер Ab1791), анти-rpS6 (Cell Signaling, кат. номер D68F8), анти-нуклеолин (Abcam, кат. номер Ab22758), анти-PTBP1 (Abcam, кат. номер Ab133734), анти-KAP1 (Abcam, кат. номер Ab22353), анти-IRF4 (Abcam кат. номер), анти-β-тубулин (Abcam, кат. номер Ab6046). Мембрану обрабатывали соответствующим вторичным антителом, конъюгированным с HRP, и для визуализации сигнала применяли набор для хемилюминисцентной детекции West Dura (Pierce Rockford, USA). Для съемки мембраны использовали светочувствительную ПЗС-камеру (прибор с зарядовой связью) (Las 3000) с линейным откликом на излучаемый световой сигнал. Интенсивность полосы, соответствующей белку, измеряли при помощи программного обеспечения ImageJ при помощи команд «Анализ - Гель - Выбор дорожки - Отобразить дорожку». Результаты нормализовали к внутреннему контролю загрузки (H3) и выражали как кратность обогащения по сравнению с контролем.

### **Совместная иммунопреципитация (Co-IP)**

Совместную иммунопреципитацию осуществляли на экстрактах ядер, как описано в <sup>73</sup>, с небольшими модификациями. Осадки CD4<sup>+</sup> Т-клеток ресуспендировали в буфере для выделения цитоплазматических белков (10 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM сахарозы, 0,1% NP-40, 1x ингибитор протеаз) и инкубировали 5 мин на льду, ядра собирали путем центрифугирования при 300g в течение 10 мин и ресуспендировали в лизирующем буфере для выделения ядерных белков (10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 25% глицерин, 1x ингибитор протеаз). Затем

суспензию ядер подвергали воздействию ультразвука (BRANSON A250 с 3,2-мм сужающимся микрозондом; один 1-мин цикл при амплитуде 20%, 30% рабочего цикла) и собирали экстракты ядер путем центрифугирования при 16300g в течение 10 мин при 4°C. Белки предварительно очищали при помощи частиц Dynabeads с белками A/G, проводили количественную оценку с применением флуориметра Qubit (Invitrogen) и использовали для последующего анализа методом Co-IP. Иммунопреципитацию в экстрактах ядер осуществляли путем инкубации 600 мкг белка с 4 мкг антител к нуклеолину (Abcam, кат. номер Ab22758) и 8 мкг анти-KAP1 (Abcam, кат. номер 22353) в течение ночи на ротационном шейкере при 4°C. Иммунные комплексы выделяли с использованием магнитных частиц Dynabeads с белками A/G (Invitrogen) в течение 2 ч на ротационном шейкере при 4°C. Частицы промывали один раз 600 мкл буфера с низким содержанием соли (10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5% глицерин), один раз буфером с высоким содержанием соли (10 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5% глицерин) и еще один раз буфером с низким содержанием соли. Образцы элюировали элюирующим буфером (5% SDS, 1X буфер для загрузки образцов, 10 mM DTT) и использовали в анализе методом вестерн-блоттинг.

#### **Иммунопреципитация РНК (RIP)**

Для образования поперечных сшивок в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и активированных в течение 16 ч использовали 1% формальдегид. После образования поперечных сшивок клетки лизировали в буфере для выделения ядер (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 320 mM сахароза, 1% Triton X-100), гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и оставляли на льду в течение 10 мин. Центрифугировали ядра при 2500g в течение 15 мин и ресуспендировали в буфере RIP (25 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5% NP-40, 0,5% SDS, 100 Ед/мл ингибитора РНКаз) и разрушали (BRANSON A250 с 3,2-мм сужающимся микрозондом; один 1-мин цикл при амплитуде 20%, 30% рабочего цикла). Экстракты ядер собирали путем центрифугирования при 16300g в течение 10 мин при 4°C. Ядерный экстракт в количестве, соответствующем  $1-3 \times 10^6$  клеток, инкубировали с 4 мкг антитела к нуклеолину (Abcam, кат. номер Ab22758) и 8 мкг анти-KAP1 (Abcam, кат. номер Ab133734) и анти-GTF2F1 (Abcam, кат. номер Ab28179), в течение ночи на ротационном

шейкере при 4°C. Иммунные комплексы выделяли с использованием магнитных частиц Dynabeads с белками A/G (Invitrogen) в течение 2 ч на ротационном шейкере при 4°C. Частицы промывали три раза 600 мкл буфера RIP и один раз PBS. Разрушение поперечных сшивок осуществляли путем инкубации иммунных комплексов в течение 2 ч при 55°C в буфере NT2 (50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,05% NP-40, 1% SDS, 1,2 мг/мл протеиназы К). РНК очищали при помощи TRI-реагента и в ходе выделения применяли ДНКазу из набора Turbo DNA-free (Invitrogen).

### **Выделение РНК хроматина и нуклеоплазмы**

Фракционирование клеток осуществляли, как описано в <sup>74</sup> с небольшими модификациями. Вкратце, 5-10 x10<sup>6</sup> наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя ресуспендировали в 60 мкл буфера А (10 мМ HEPES pH 7,5, 10 мМ KCl, 10% (об./об.) глицерина, 340 мМ сахарозы, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 1X коктейль ингибитора протеаз (PIC)), добавляли равный объем буфера А 0,2% (об./об.) Triton X-100 и лизировали Т-клетки в течение 12 мин на льду. Т-клетки центрифугировали при 1200 g в течение 5 мин при 4°C, собирали надосадочную жидкость, представляющую фракцию РНК цитоплазмы. Осадок ядер промывали в 120 мкл буфера NRB (20 мМ HEPES pH 7,5, 50% (об./об.) глицерина, 75 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 1X PIC) при 900g в течение 5 мин при 4°C и ресуспендировали в 60 мкл буфера NRB, добавляли равный объем буфера NUN (20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 1 М мочевины, 1 % (об./об.) NP-40, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT) и лизировали Т-клетки в течение 5 мин на льду. Лизат центрифугировали при 1200 g в течение 5 мин при 4°C, собирали надосадочную жидкость, представляющую фракцию РНК нуклеоплазмы. Осадок хроматина промывали в 500 мкл буфера А при 1200g в течение 5 мин при 4°C и затем осадок, представлявший собой фракцию РНК хроматина, ресуспендировали в 50 мкл буфера А. Выделяли общую РНК, ассоциированную с нуклеоплазмой и хроматином, используя набор Maxwell RSC miRNA Tissue (Promega, кат. номер AS1460), следуя инструкциям производителя с небольшими модификациями.

### **Приготовление библиотеки РНК и секвенирование**

Целостность РНК проверяли с применением TapeStation (высококочувствительный анализ РНК Screentape) и для приготовления библиотек использовали 15-75 нг общей РНК. Удаляли рибосомную РНК с применением набора RiboGone-Mammalian (TaKaRa, кат. номер 634846) согласно инструкциям производителя и готовили библиотеки с

применением набора SMARTer Stranded RNA-Seq (TaKaRa, кат. номер 634836) согласно инструкциям производителя. Библиотеки секвенировали как парные чтения 100 или 150 п.н. на устройстве Illumina NextSeq 500. Готовили библиотеки RNA-seq для: 1) РНК хроматина и нуклеоплазмы наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя (4 индивидуума); 2) общей РНК наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя и наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, активированных с использованием частиц с анти-CD3/анти-CD28 в среде Th1 в течение 16 часов (3 индивидуума).

### **Обработка и выравнивание массивов данных RNA-seq**

Секвенированные и находящиеся в открытом доступе образцы RNA-seq обрабатывали и выравнивали по единому принципу. Данные по наивным CD8<sup>+</sup> (GSM3591829, GSM3591834) и активированным (GSM3591826, GSM3591831) Т-клеткам были взяты из Bedia et al., по мышинным эмбриональным стволовым клеткам – из проектного консорциума ENCODE (GSM2400249, GSM2400250), а по образцам тимоцитов – из Buratin et al. (GSM4222226, GSM4222227, GSM4222228, GSM4222229, GSM4222230). Следует отметить, что указанные массивы данных тщательно выбирали, чтобы они были сопоставимы с массивами данных, полученными в данной работе, а именно по выделению общей РНК и приготовлению библиотек, длине прочтений проанализированных библиотек. Файлы Fastq проверяли в отношении качества прочтений с применением FastQC v0.11.3. Алгоритм BBDuk из BBMap v38.51 использовали для удаления адаптеров из парных прочтений (ktrim=r k=23 mink=11 hdist=1 tpe tbo), исключения прочтений рРНК (k=31 hdist=1), совпадающих с депонированными последовательностями рибосомальной РНК человека (идентификационный номер в NCBI: U13369.1) и тримминга парных прочтений, то есть обрезания оснований с низким качеством прочтения. Прошедшие контроль качества парные прочтения использовали для выравнивания с применением STAR v2.5.4a (--outFilterScoreMinOverLread 0.3 --outFilterMatchNminOverLread 0.3 --outFilterMatchNmin 0 --outFilterMismatchNmax 10 --winAnchorMultimapNmax 200 --outFilterMultimapNmax 200) на референсный геном человека сборки hg38 или на референсный геном мыши сборки mm10 с применением аннотаций из файла GTF проекта GENCODE версии 25 для человека или GENCODE версии M21 для мыши, служащего в качестве базы данных границ сплайсинга.

### **Анализ главных компонент (PCA)**

Анализ PCA проводили на совокупном наборе транскрибируемых единиц, состоящем из 50596 генов из GENCODE версии 25 и 1180 подсемейств повторов из UCSC Repeat Masker, на геноме человека (hg38). Счетные данные для каждого гена получали на выровненных прочтениях с применением HTSeq v0.12.4 (htseq-count -s yes -nonunique all), а счетные данные для каждого подсемейства повторов получали, как описано ниже (см. подзаголовок «Количественная оценка экспрессии подсемейств TE в массивах данных RNA-seq»). Для выполнения PCA с применением DESeq2 использовали данные RNA-Seq, нормализованные путем преобразования, стабилизирующего дисперсию (vst). Диаграммы PCA строили с применением функции ggbiplot версии 0.55 пакета программ R.

### **Количественная оценка экспрессии подсемейств TE в массивах данных RNA-seq**

Количественную оценку мобильных элементов проводили на уровне класса (n равно 8), надсемейства (n равно 112) и подсемейства (n равно 1180) согласно аннотации на человеческий геном (hg38) в UCSC RepeatMasker. Выявляли пересечение прочтений с аннотацией UCSC Repeat Masker при помощи утилиты intersectBed из BedTools 2.29.2 (с параметром “-split”) и использовали в подсчете прочтения, перекрывающиеся с повтором цепь-специфическим образом минимум на 10 п.н. Чтобы уменьшить влияние на подсчеты прочтений, которые картировались более чем на один участок генома, прочтения, перекрывающиеся с множеством повторяющихся локусов одного и того же подсемейства, подсчитывали один раз, и то же самое проделывали на уровне надсемейства и класса. Кроме того, пары прочтений подсчитывали как одну единицу. Это позволяло избежать системной ошибки в подсчетах для областей длинных и коротких повторов. Нормализованные количества прочтений на уровне класса, надсемейства и подсемейства подсчитывали с применением DESeq2.

### **Реконструкция новых LINE1-содержащих транскриптов *de novo***

Создавали исчерпывающий каталог LINE1-содержащих транскриптов в хроматиновом компартменте наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя путем объединения двух различных подходов для сборки транскриптов *de novo* (с нуля). Вкратце, прочтения RNA-seq хроматина из 4 биологических реплик, картированные

корректными парами (значения в поле flag в файле .sam: 99, 147, 83 и 163), объединяли в общий пул, в сумме достигавший 113 миллионов корректно прочитанных пар. Для более надежной реконструкции транскриптов, содержащих ТЕ, использовали два независимых алгоритма: Trinity 2.8.4 <sup>75</sup> с картированием на геном (--SS\_lib\_type FR --genome\_guided\_bam --genome\_guided\_max\_intron 10000 --genome\_guided\_min\_reads\_per\_partition 3) в паре с PASA 2.3.3 <sup>76</sup> (-C -R --ALT\_SPLICE --ALIGNERS blat,gmap --CPU 1 --transcribed\_is\_aligned\_orient) и StringTie 2.0 <sup>77</sup> (--rf -a 3). Моноэкзонные транскрипты исключали из дальнейшего анализа, как уже проделывали ранее в <sup>78,79</sup>, чтобы отфильтровать транскрипты, возможно являющиеся артефактами вследствие транскрипционного шума или низкой точности полимеразы, кроме того, они трудно поддаются биоинформатической оценке и требуют подробного курирования вручную. Отбирали мульти-экзонные транскрипты, пересекающиеся с ТЕ (UCSC Repeatmasker). Для получения нового и системного каталога избыточных транскриптов отбирали только те транскрипты, которые имели ТЕ-содержащий экзон (intersectBed -f 0,8 -g -s), обнаруженный обеими программами автоматической сборки. Отобранные транскрипты объединяли с применением StringTie (merge -i -f 0), получая унифицированный набор транскриптов ТЕ. Транскрипты ТЕ аннотировали по транскриптам из файла GTF проекта GENCODE версии 25 при помощи утилиты gffcompare 0.11.2. Наконец, реконструированные *de novo* транскрипты ТЕ, имеющие по меньшей мере 20 п.н. перекрытия между экзоном и локусом LINE1, аннотировали как LINE1-содержащие транскрипты, извлекали 3072 транскрипта. Гены, содержащие в своей позиции в геноме транскрипты LINE1, в дальнейшем обозначаются как «гены, содержащие LINE1».

### **Количественная оценка экспрессии новых транскриптов LINE1**

Авторы изобретения оценивали экспрессию транскриптов LINE1, используя Salmon 1.1.0 (в режиме селективного выравнивания с параметрами по умолчанию) для минимизации искажающего влияния схожих и частично перекрывающихся канонических транскрипционных изоформ и для включения прочтений, которые картировались более чем на один участок. Для генерации индекса salmon использовали референсный транскриптом, содержащий как транскрипты из GENCODE версии 25, так и реконструированный транскриптом ТЕ (см. подзаголовок «Реконструкция новых

LINE1-содержащих транскриптов *de novo*»).

### **Фильтрация новых транскриптов LINE1**

Вначале отфильтровывали транскрипты LINE1, которые экспрессировались сильнее (более высокие значения TPM) во фракции хроматина по сравнению с фракцией нуклеоплазмы наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток по меньшей мере в 3 из 4 реплик и экспрессировались слабее (более низкие значения TPM) в активированных Т-клетках по сравнению с наивными CD4<sup>+</sup> Т-клетками по меньшей мере в 2 из 3 реплик, извлекали 1884 LINE1-содержащих транскрипта, которыми был специфически обогащен хроматин наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток. 1884 LINE1-содержащих транскрипта картировали на межгенную область или к транскрибируемую единицу (ген), выявляя их пересечение с известными транскриптами из GENCODE версии 32 при помощи intersectBed из bedtools 2.29.2. Если картирование на единственный ген или межгенную область было невозможно, ген классифицировали как «неоднозначный». Обнаружили, что 1647 транскриптов из 1884 были аннотированы как известные транскрибируемые единицы, 81 были межгенными и 156 были неоднозначными (см. также подзаголовок «Характеризация транскриптов LINE1»). Из 1647 транскриптов, у которых выявляли пересечение с транскрибируемой единицей, 112 были картированы на некодирующие гены и 1535 - на кодирующие белок гены, из которых 1469 находились в той же ориентации (в случае транскриптов LINE1, у которых выявляли пересечение как с кодирующими, так и с некодирующими транскрибируемыми единицами GENCODE, для картирования использовали кодирующие белок транскрипты). 1013 транскриптов из 1469 транскриптов имели LINE1-содержащий экзон в начале (один из первых двух экзонов) или в конце (один из двух последних экзонов) новых транскриптов LINE1. Кроме того, из 1013 LINE1-содержащих транскриптов выбирали те, которые имели LINE1-содержащий экзон со средним сигналом H3K36me3, в два раза превышающим средний сигнал H3K9me3, как свидетельство транскрипции данной области хроматина<sup>80,81</sup>. Сигналы H3K36me3 и H3K9me3 получали путем обработки предварительно выровненных данных ChIP-seq с использованием ресурса Roadmap Epigenomics (см. анализ данных ChIP-seq). Наконец, отбрасывали транскрипты LINE1, у которых экзоны LINE1 удлинились и перекрывались с UTR гена хозяина, как возможные артефакты или уже аннотированные транскрипты. Данная стратегия позволила обнаружить 461 новый

транскрипт LINE1.

### **Характеризация транскриптов LINE1**

Обогащение обнаруженными новыми 461 транскриптами LINE1 среди подсемейств LINE1 анализировали при помощи точного теста Фишера в геномном распределении всех 132 подсемейств LINE1, присутствующих в геноме человека (hg38), аннотированных в UCSC RepeatMasker (см. дополнительные данные, Фиг. 4 с,d). Локусы LINE1 аннотировали по характеристикам LINE1 (5'UTR, ORF1, межгенные, ORF2 и 3'UTR) на основании их выравнивания на L1.4 (идентификационный номер GenBank L19092.1). Последовательность L1.4 аннотировали с применением L1Xplorer, локусы LINE1 выравнивали на L1.4 при помощи blastn. Чтобы охватить все локусы LINE1, которые могут быть эволюционно схожими или отличными от последовательности L1.4, применяли blastn с двумя различными параметрами: одним для близкородственных последовательностей (-word\_size 4 -gapopen 5 -gapextend 2 -reward 2 -penalty -3 -dust no -soft\_masking false) и другим для различающихся последовательностей (-word\_size 4 -gapopen 8 -gapextend 6 -reward 5 -penalty -4 -dust no -soft\_masking false). Найденные при помощи Blast последовательности с наибольшим покрытием локусами LINE1 отбирали в качестве наилучших совпадений и аннотировали по характеристикам LINE1 на основании их позиции в выравнивании на последовательность L1.4 (см. дополнительные данные, Фиг. 4f). Транскрипты LINE1 с сигналом полиаденилирования, обнаруженным по меньшей мере в трех из пяти реплик, считали полиаденилированными (см. дополнительные данные, Фиг. 4g). Осуществляли поиск консенсусных последовательностей мотивов сплайсинга в 461 транскрипте LINE1. Графическое изображение консенсусной последовательности (Logo) на границах LINE1-содержащих экзонов в начале или конце транскриптов LINE1 получали с применением WebLogo 3.7.4 (см. дополнительные данные Фиг. 4h).

### **Валидация транскриптов LINE1 при помощи PCR**

Валидацию транскриптов LINE1 осуществляли при помощи PCR с ДНК-полимеразой GoTaq G2 Flexi (Promega, кат. номер M7806). PCR реакции проводили на кДНК наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (для верификации сплайсинга новых транскрипционных вариантов использовали контроль без обратной транскриптазы). Конструировали праймеры для транскриптов *IFNGR2.L1*, *MED23.L1*, *HIRA.L1*, *EED.L1*, *ASH2L.L1*,



*ARCP2.L1*, *DDX6.L1*, *RAB22a.L1* и соответствующих канонических мРНК. Ампликоны, полученные при помощи PCR, проверяли путем электрофореза в 1,6% агарозном геле. Все транскрипты прошли валидацию по меньшей мере у 3 различных индивидуумов.

### **Количественная оценка экспрессии генов и контроля в массивах данных RNA-seq**

Выровненные прочтения использовали для генерации количества прочтений на ген с применением HTSeq v0.12.4 (`htseq-count -s yes --nonunique all`) и GENCODE версии 25 и нормализовали как число фрагментов на килобазу на миллион картированных прочтений (FPKM), используя в качестве размера библиотеки общее число прочтений, картируемых в пределах координат моделей генов. Значения экспрессии LINE1-содержащих генов отбирали среди всех генов, подвергавшихся количественной оценке.

### **Ingenuity Pathway Analysis**

В анализ сетей, выполнявшийся при помощи программного обеспечения Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)), включали 407 LINE1-содержащих генов. В приложение загружали список идентификаторов LINE1-содержащих генов. Каждый идентификатор гена картировали на его соответствующий ген-объект в базе данных Ingenuity Pathways Knowledge Base и обозначали фокусным геном. Для создания сетей принимали в расчет 70 генов на сеть и величину значимости более 40. Сети представлены в привязке к субклеточной локализации генов, а связи основаны на непосредственном (сплошные линии) и опосредованном взаимодействии (пунктирные линии). В графическом изображении гены представлены как узлы, а биологическое взаимодействие между двумя узлами представлено как ребро.

### **Приготовление и секвенирование библиотеки кДНК Nanopore**

Готовили библиотеки, взяв 75 нг РНК хроматина с применением набора для баркодирования PCR-cDNA Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies, UK) и следуя инструкциям производителя. РНК из трех независимых образцов обрабатывали и баркодировали по-отдельности и объединяли в пул готовые библиотеки для выполнения секвенирования. Качество и средний размер библиотек проверяли при помощи TapeStation (Agilent, CA, USA). Секвенирование осуществляли с применением платформы MinION и проточной ячейки R9.4.1 (Oxford Nanopore Technologies).

### **Анализ данных секвенирования Nanopore**

Сигнал кДНК Nanopore извлекали в отдельные файлы прочтений при помощи программного обеспечения для определения оснований Guppy версии 5.0.7 с параметрами “guppy\_basecaller --flowcell FLO-MIN106 --kit SQK-PCB109 --barcode\_kits SQK-PCB109 --trim\_barcodes”. Прочтения из трех биологических реплик выравнивали на референсный транскриптом, содержащий данные Gencode v25 и реконструированные TE-содержащие транскрипты (см. подзаголовок «Реконструкция новых LINE1-содержащих транскриптов *de novo*») с применением minimap2 версии 2.17-r941 с параметрами “-ax map-ont”. Присутствие транскриптов LINE1 в данных Nanopore проверяли, отбирая транскрипты с единственным выравниванием. Для получения транскрипционного профиля транскриптов LINE1 с применением длинных прочтений определяли покрытие при помощи команды bedtools genomcov с параметрами “-ignoreD -bg”, путем разбиения транскриптов LINE1 на 100 бинов и расчета среднего значения и стандартной ошибки среднего для каждого бина при помощи R 3.6.2.

#### **Имунопреципитация хроматина (ChIP)**

Анализ ChIP осуществляли, как описано в <sup>82</sup>, с небольшими модификациями. Для образования поперечных сшивок в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и активированных в течение 16 ч использовали 1% формальдегид. Перекрестно-сшитые клетки лизировали в буфере для обработки ультразвуком (10 mM TrisHCl pH 8, 2 mM EDTA, 0,25% SDS, с добавлением 1x полного ингибитора протеаз без EDTA (Roche) и 1 mM PMSF (Merck)). Хроматин разрушали (BRANSON A250 с 3,2-мм сужающимся микрозондом; пять 1-мин циклов при амплитуде 25%, 50% рабочего цикла), проверяли путем разделения в 0,9% агарозном геле при 70 В. Осуществляли иммунопреципитацию путем инкубации 25 мкг хроматина, разведенного в 1,5x уравнивающего буфера (10 mM TrisHCl pH 8, 233 mM NaCl, 0,166% Na-дезоксихолат, 1,66% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1X полный ингибитор протеаз без EDTA и 1 mM PMSF) с 1-2 мкг антител (H3K4me3 (Millipore, кат. номер 07-473) и H3K36me3 (Abcam, кат. номер Ab9050)), в течение ночи на ротационном шейкере при 4°C. Иммунные комплексы выделяли с использованием магнитных частиц Dynabeads (с белком G; Invitrogen) в течение 2 ч на ротационном шейкере при 4°C. Частицы промывали два раза 600 μл буфера RIPA с низким содержанием соли (10 mM TrisHCl pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,1% Na-дезоксихолат, 1% Triton X-100), два раза 600 мкл RIPA с высоким содержанием

соли (10 мМ TrisHCl pH8, 500 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS, 0,1% Na-дезоксихолат, 1% Triton X-100), два раза 600 мкл RIPA-LiCl (10 мМ TrisHCl pH8, 250 мМ LiCl, 1 мМ EDTA, 0,5% Na-дезоксихолат, 0,5% NP-40) и, наконец, 600 мкл 10 мМ TrisHCl pH8. Во все буферы RIPA добавляли 1X полный ингибитор протеаз без EDTA и 1 мМ PMSF. Поперечные сшивки разрушали путем инкубации частиц в элюирующем буфере (10 мМ TrisHCl pH8, 2% SDS) при 65°C в течение ночи. Иммунопреципитированную ДНК очищали при помощи частиц для очистки продуктов PCR AMPure XP (Beckman Coulter), следуя инструкциям производителя. Готовили библиотеки ДНК из 25 нг очищенной ДНК, используя набор для приготовления библиотек ДНК NEBNext Ultra I для Illumina (NEB), без селекции по размерам и посредством 8 циклов PCR амплификации. Очистку библиотек производили с использованием частиц AMPure XP, элюировали H<sub>2</sub>O, не содержащей нуклеаз, и секвенировали в обоих направлениях по 150 п.н. на платформе NextSeq 500 (Illumina).

#### **Анализ данных ChIP-seq**

Для отбора транскриптов LINE1 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках использовали массивы данных для H3K36me<sub>3</sub> (ENCFF152WXT, ENCFF324OZH, ENCFF416GLM, ENCFF783JQO) и H3K9me<sub>3</sub> (ENCFF197EDP, ENCFF287UWA, ENCFF338SVK, ENCFF753UAT), с их соответствующими образцами ДНК до иммунопреципитации (ENCFF044KMD, ENCFF343ILJ, ENCFF421BMD, ENCFF737YRO), опубликованные в ENCODE. Кратность обогащения после ChIP относительно контрольной ДНК до иммунопреципитации определяли при помощи macs 2.2.6 с выбором параметров “-f BAM -g 3049315783 -p 1e-2 --nomodel --extsize [средний размер фрагментов в ENCODE] --keep-dup all -B --SPMR --broad“ для модуля callpeak и “-m FE” для модуля bdgcmp. Сигнал обогащения H3K36me<sub>3</sub> по сравнению с H3K9me<sub>3</sub> рассчитывали как log<sub>2</sub> отношения с применением утилиты bigWigCompare из deeptools 3.4.1 с размером бина 10 п.н.

Кроме того, по результатам ChIP-seq H3K36me<sub>3</sub> и H3K4me<sub>3</sub> изучали состояние хроматина в LINE1-содержащих генах при активации Т-клеток или нокдауне LINE1 (см. выше). Объединяли в пул прочтения технических реплик и оценивали качество прочтений до и после тримминга с применением FastQC 0.11.9. Осуществляли тримминг прочтений, то есть обрезали основания, определенные с низким качеством, при помощи

Trimmomatic 0.39 в режиме парноконцевого секвенирования с параметрами: “ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50”, или в режиме одноконцевого секвенирования с референсным файлом адаптеров “TruSeq3-SE.fa” и такими же параметрами, как указано выше. Подвергнутые триммингу прочтения выравнивали на сборке человеческого генома hg38 с применением Bowtie 1.2.3 с параметрами “-m 1 --best --strata -v 3” and “-X 2000 --fr” только для парноконцевого секвенирования. После выравнивания парноконцевые прочтения, которые не картировались корректными парами, а также дублирующиеся прочтения удаляли при помощи Samtools 1.9<sup>83</sup>. Поиск пиков в экспериментах ChIP осуществляли с применением модуля callpeak в macs 2.2.6, загружая файл выравнивания мишени ChIP и соответствующей контрольной ДНК до иммунопреципитации, с параметрами “--keep-dup all -g 3049315783 -B -p 0.01” для образцов как H3K4me3, так и H3K36me3 и “--broad” только для H3K36me3, специфическими для парноконцевого секвенирования параметрами “-f BAMPE” и специфическими для одноконцевого секвенирования параметрами “-f BAM --nomodel --extsize 200”. Для построения треков покрытия производили вычитание фонового сигнала из скоплений фрагментов с применением модуля macs2 bdgcmp с параметрами “-m FE”. В качестве контроля для LINE1-содержащих генов использовали случайную выборку такого же количества генов из пула кодирующих белок генов, имеющих по меньшей мере один пик метки H3K36me3, с применением встроенной команды “shuf” утилит GNU coreutils. Распределение положений H3K36me3 и H3K4me3 на LINE1-содержащих генах и контрольных генах получали путем разбиения моделей генов на 40 бинов, при этом фланкирующие области -1,5 и +3 т.п.н. разбивали на бины длиной по 150 п.н. с применением deeptools 3.4.1 computeMatrix с параметрами “-m 6000 -b 3000 -a 3000 -bs 150”, рассчитывали среднее значение по репликам и медианное значение по генам и применяли к данным сглаживание кубическими сплайнами с применением встроенной в R 3.6.2 функции “smooth.spline”.

#### **Анализ обогащения мотивами**

Обогащение мотивами анализировали с применением алгоритма AME из пакета MEME версии 5.3.3 с параметрами “--scoring avg --method fisher --hit-lo-fraction 0.25 --evaluate-report-threshold 10.0 --control --shuffle-- --kmer 2” как для ДНК-, так и для РНК-

связывающих мотивов. Среди мотивов связывания транскрипционных факторов, представленных в базе данных HOCOMOCO Human (v11 CORE), осуществляли поиск возможных промоторных последовательностей генов-хозяев транскриптов LINE1. Промоторные области получали по пересечению пиков H3K4me3 и H3K27Ac в двух биологических репликах, обнаруженных в пределах 5 т.п.н. в направлении против хода транскрипции и 1 т.п.н. в направлении по ходу транскрипции от сайтов инициации транскрипции генов-хозяев, с применением bedtools версии 2.29.2. TF с log2 кратности изменения CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> менее -2 в протеомном анализе и менее 0 в массивах данных RNA-seq считали “ведущими CD4<sup>+</sup> специфическими TF”. В последовательностях РНК LINE1, содержащихся в экзоне LINE1 новых транскриптов, осуществляли поиск мотивов, распознаваемых РНК-связывающими белками, представленных Ray et al. 2013 (PMID23846655).

### **Результаты**

Далее авторы изобретения представляют наблюдения, касающиеся динамики экспрессии LINE1 в Т-лимфоцитах периферической крови человека, в дисфункциональных/анергичных Т-клетках *in vitro* и в TIL, и их обнаружение в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках.

**РНК LINE1 экспрессируется в хроматине наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и регулируется посредством пути mTORC1 при активации и дифференцировке.**

Для исследования экспрессии TE в человеческих Т-лимфоцитах авторы изобретения анализировали надсемейства LINE1, Alu и HERV при помощи RNA FISH и qRT-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя и в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти, выделенных у здоровых индивидуумов. Обнаружили, что РНК LINE1 специфически экспрессируются в ядрах наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя (Фиг. 1a-c). РНК Alu скорее демонстрируют широкое распределение в околядерном пространстве у всех субпопуляций Т-клеток (Фиг. 9a-c), тогда как РНК HERV экспрессируются слабо (Фиг. 9d-f). РНК LINE1 почти исключительно присутствуют во фракции хроматина наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Фиг. 1d и Фиг. 9g) и ассоциированы с участками открытого хроматина, как определено по колокализации с гистоновой меткой H3K4me3 (Фиг. 9h,i). Длительные воздействия актиномицином D оказывают умеренное влияние на уровни РНК LINE1, указывая, что эти РНК не транскрибируются с высокой

скоростью в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 1e). Далее анализировали, какова динамика РНК LINE1 при активации и дифференцировке Т-клеток, обнаружив, что их экспрессия быстро снижается и остается на низком уровне в ходе дифференцировки в направлении эффекторных клеток (то есть Th1, Th2 Th17, Фиг. 1f и Фиг. 9j,k).

Авторы изобретения предположили, что специфические сигнальные пути Т-клеток осуществляют тонкую регуляцию уровней РНК LINE1. Поэтому авторы изобретения обрабатывали активированные или дифференцированные CD4<sup>+</sup> Т-клетки различными иммуносупрессивными лекарственными средствами, мишенями которых являются пути mTORC1, кальциневрина или NF-κB (Фиг. 1g), обнаружив, что ингибитор mTORC1 рапамицин восстанавливает уровни РНК LINE1 в активированных и дифференцированных Т-клетках (Фиг. 1h и Фиг. 9l-n). Для подтверждения этих данных *in vitro* авторы изобретения задались вопросом, влияет ли ингибирование mTORC1 на уровни РНК LINE1 *in vivo*. Для этого они исследовали экспрессию LINE1 в CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти, выделенных из крови пациентов, перенёвших трансплантацию почки, получавших ингибитор mTORC1 эверолимус, и пациентов с лимфангиолейомиоматозом (LAM) [MIM: 606690]<sup>20</sup>, пожизненно получавших аналог рапамицина сиролимус<sup>21</sup>. Обнаружили, что, в отличие от здоровых индивидуумов, CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти у этих пациентов вновь экспрессируют РНК LINE1 (Фиг. 1i-k), что согласуется с ингибирующим влиянием mTORC1 на экспрессию РНК LINE1 *in vitro*. Таким образом, продемонстрировали, что РНК LINE1 локализованы в хроматине CD4<sup>+</sup> Т-клеток, где их экспрессия быстро снижается после активации Т-клеток mTORC1-зависимым образом.

**LINE1, экспрессирующиеся в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, при сплайсинге образуют неканонические варианты транскриптов генов клеточной активации.**

Для определения, какие элементы LINE1 экспрессируются и как формируются транскрипты LINE1, авторы изобретения секвенировали РНК хроматина и нуклеоплазмы наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя. На начальном этапе анализа производили подсчет прочтений на уровне классов, надсемейств и семейств TE и затем сравнивали количество прочтений во фракциях хроматина и нуклеоплазмы. Подтверждали, что среди классов TE, LINE, и в частности, семейство L1M (эволюционно древнее, присутствующее у приматов и широко представленное у других млекопитающих) является наиболее экспрессируемым, и ими обогащен хроматин, тогда

как семейства L1P и L1H экспрессируются на низком уровне, и ими обогащена нуклеоплазма (Фиг. 10a,b). Этот результат отличается от того, что было обнаружено в mESC, где больше всего экспрессируются эволюционно молодые способные к ретротранспозиции подсемейства L1md\_T и L1md\_A по сравнению с эволюционно древними L1\_Mus1 и L1\_Mus3 (<sup>11</sup> и Фиг. 10a,b). В Т-клетках почти половина прочтений LINE1 являются химерными (то есть картируются как на LINE1, так и на неповторяющуюся область) и 79% прочтений происходят из LINE1, локализованных в кодирующих белок генах (Фиг. 10d,e), поэтому с наибольшей вероятностью включаются в новые варианты транскриптов. В mESC большинство прочтений LINE1 целиком происходят из элементов LINE1, более широко распределенных по геному (Фиг. 10f,g), что подтверждает, что у мыши в ходе развития экспрессируются другие LINE1, нежели в человеческих Т-клетках. Для обнаружения вариантов транскриптов, содержащих LINE1, авторы изобретения осуществили цепь-специфическую сборку транскриптома *de novo* по геному с применением двух алгоритмов, Trinity <sup>22</sup> и StringTie <sup>23</sup> (см. Методы). Идентифицировали 3072 мультиэкзонных транскрипта, содержащих по меньшей мере один экзон с LINE1. Для получения достоверного списка транскриптов LINE1 авторы изобретения применили несколько критериев фильтрации, основанных на воспроизводимости их присутствия у различных индивидуумов и свидетельствах транскрипции экзона LINE1 на уровне хроматина (отношение H3K36me3/H3K9me3 <sup>24,25</sup>). Авторы изобретения извлекли 461 транскрипт LINE1, представляющие собой неканонические сплайс-варианты, происходящие из 407 кодирующих белок генов. Удалось подтвердить присутствие и точно реконструировать 88% из этих транскриптов LINE1 при помощи длинных прочтений nanopore, выполненных на фракции хроматина наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Фиг. 11a) и несколько были подтверждены посредством rt-PCR в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках, выделенных у 3 различных индивидуумов (Фиг. 11b-i). Прошедшие сплайсинг LINE1 имеют короткую длину (в среднем 371 п.н.), преимущественно, укороченными элементами ORF2 и ими обогащены различные подсемейства L1M (то есть L1ME4a, L1MC4, L1ME4b) (Фиг. 12a-c); в частности, 80% из этих LINE1 располагаются в интроне (Фиг. 12d) и проходят сплайсинг в виде новых экзонов, содержащих LINE1 и фрагмент интрона (Фиг. 12e). Следует отметить, что они являются эволюционно древними элементами LINE1, которые представляют собой

укороченную форму полноразмерных элементов LINE1, которые подверглись ремоделированию в ходе эволюции, превратившись в вырожденные элементы, которые не способны к ретротранспозиции и не кодируют какой-либо белок, необходимый для ретротранспозиции. Действительно, для того, чтобы продемонстрировать, что наблюдавшийся механизм не зависит от механизма ретротранспозиции, авторы изобретения обрабатывали наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки ингибиторами ЗТС и выполняли RNA-FISH, обнаружив, что окрашивание РНК LINE1 оставалось абсолютно неизменным (Фиг. 12f).

На Фиг. 2а показано, как реконструировали репрезентативные транскрипты LINE1 (например, *ARPC2*). Присутствие *HIRA.L1* в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках и снижение их экспрессии при активации дополнительно подтверждали методом флуоресцентной РНК-гибридизации *in situ* с детекцией единичных молекул (smRNA-FISH), обнаружив уникальную часть экзона LINE1 (Фиг. 2b,с и Фиг. 13а).

Для понимания функциональной значимости 407 кодирующих белок генов, из которых происходят транскрипты LINE1, авторы изобретения провели анализ сетей при помощи программы IPA (Ingenuity Pathway Analysis) и обнаружили прямую и устойчивую связь с генами, необходимыми для клеточной активации (например, экспрессии генов, клеточной сигнализации и межклеточных взаимодействий, клеточного цикла). Вместе взятые, вышеуказанные эксперименты позволили обнаружить большой набор ранее неизвестных вариантов неканонических транскриптов генов, необходимых для клеточной активации, что позволяет предположить, что данные транскрипты участвуют в поддержании CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя.

Поскольку транскрипты LINE1 происходят из генов клеточной активации и локализованы в хроматине, авторы изобретения задались вопросом, способны ли они регулировать экспрессию соответствующих кодирующих белок генов (далее обозначаемых каноническими транскриптами). Прежде всего, авторы изобретения обнаружили, что транскрипты LINE1 локализованы *in cis* в своих геномных локусах, как показано на примере *HIRA* и *RABB22A* в экспериментах с комбинированной DNA-RNA FISH (Фиг. 2d и Фиг. 13с). Затем авторы изобретения произвели истощение транскриптов *HIRA.L1* или *RABB22A.L1* в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках при помощи антисмысловых олигонуклеотидов (ASO), сконструированных к неповторяющейся области экзона



LINE1, и обнаружили повышение экспрессии только соответствующего канонического транскрипта (Фиг. 2 e,f и Фиг. 13d). Наконец, авторы изобретения произвели делецию LINE1 из интрона генов *IFNGR2* и *ARPC2* с применением рибонуклеопротеидных (RNP) комплексов Cas9 с sgRNA, комплементарным уникальным областям, фланкирующим повтор, и подтвердили, что в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках 1) элемент LINE1 необходим для образования транскрипта LINE1 и 2) транскрипты LINE1 выполняют регуляторную роль, действуя строго *in cis* (Фиг. 2g-i и Фиг. 13e-h). Таким образом, указанные результаты подтверждают, что транскрипты LINE1 приостанавливают экспрессию соответствующих канонических транскриптов в хроматине.

**Транскрипты LINE1 действуют *in cis* в комплексе с нуклеолином, снижая экспрессию LINE1-содержащих генов в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках.**

Авторы изобретения задались вопросом, как транскрипты LINE1 эпигенетически контролируют экспрессию генов, из которых они происходят. Авторы изобретения осуществили нокдаун транскриптов LINE1 путем обработки наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в состоянии покоя ASO к LINE1 в течение 48 ч (Фиг. 3a,b). Любопытно, что в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя, в которых производили нокдаун их РНК LINE1, наблюдалось повышение экспрессии LINE1-содержащих генов (Фиг. 3c).

Поскольку РНК LINE1 способны регулировать конденсацию хроматина и сайленсинг генов<sup>38,49,51</sup>, авторы изобретения задались вопросом, будет ли влиять нокдаун транскриптов LINE1 на организацию хроматина в Т-клетках в состоянии покоя. Для этого оценивали уровень нескольких гистоновых меток (то есть H3K36me3, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3) при помощи количественного вестерн-блоттинга экстрактов гистонов<sup>73</sup> и иммуноокрашивания наивных Т-клеток, обработанных в течение 48 часов при помощи ASO к LINE1 и обнаружили, что истощение РНК LINE1 приводит к выраженному увеличению H3K36me3, таким образом указывая на ремоделирование хроматина для активной транскрипции, возникающее в отсутствие клеточной активации (Фиг. 3d и Фиг. 14a-c). Авторы изобретения изучали H3K36me3 в экспериментах ChIP-seq на наивных Т-клетках с истощением РНК LINE1 и с интересом обнаружили, что повышение H3K36me3 являлось специфичным для LINE1-содержащих генов, то же самое наблюдалось при активации Т-клеток (Фиг. 3e и Фиг. 14 d-h), таким образом было продемонстрировано, что в отсутствие активации возможно

высвобождение LINE1-содержащих генов из-под репрессирующей активности транскриптов LINE1.

Поскольку опубликованы сведения, что в mESC нуклеолин, белок, связывающий РНК LINE1<sup>86</sup>, образует комплекс с РНК LINE1 и Kap1, регулируя клеточную идентичность и гены 2-клеточной стадии дифференцировки<sup>51</sup>, авторы изобретения задались вопросом, каково взаимоотношение между нуклеолином РНК LINE1 в Т-клетках. Производили иммунопреципитацию РНК при помощи антител к нуклеолину, обнаружив, что он находится в комплексе с транскриптами LINE1 (Фиг. 3h). Интересно, что обработка ASO к нуклеолину фенотипически копирует действие ASO к LINE1, способствуя транскрипции LINE1-содержащих генов и повышению H3K36me3 (Фиг. 15 a,d). Когда осуществляли истощение нуклеолина в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках в состоянии покоя путем их обработки специфическими ASO в течение 48 часов, уровни РНК LINE1 оставались неизменными, однако после разделения субклеточных фракций доля РНК LINE1, ассоциированной с хроматином снижалась, указывая на то, что нуклеолин задействован в связывании РНК LINE1 с хроматиновым компартментом. (Фиг. 3i,j и Фиг. 15 e). Наконец, авторы изобретения задались вопросом, способна ли модуляция РНК LINE1 влиять на эффекторную функцию Т-клеток. Вначале наивные CD4<sup>+</sup> Т-клетки, истощенные по РНК LINE1, активировали и дифференцировали в течение 7 суток в эффекторные Th1 клетки, наблюдая, что в этих клетках удваивалось образование транскрипционного фактора Tbet и секреция эффекторного цитокина IFN $\gamma$  (Фиг. 3k,l); важно отметить, что такой же фенотип наблюдался при нокдауне нуклеолина в таких же условиях (Фиг. 3m,n). Взятые вместе, эти результаты указывают, что РНК LINE1 регулируют переключение транскрипции в наивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах из состояния покоя в активированное состояние, действуя на хроматин в комплексе с нуклеолином через ремоделирование хроматина H3K36me3.

#### **Транскрипты LINE1 регулируются в CD4<sup>+</sup> Т-клетках транскрипционным фактором IRF4.**

Поскольку транскрипты LINE1 происходят из генов, задействованных в клеточной активации, авторы изобретения задались вопросом, почему CD8<sup>+</sup> Т-клетки не экспрессируют транскрипты LINE1 в отличие от схожих с ними по развитию CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Для этого изучали профиль экспрессии 461 транскрипта LINE1 и канонических

транскриптов, используя данные RNA seq предшественников Т-клеток и наивных и активированных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток (Фиг. 4а, см. Методы). Среди всех предшественников Т-клеток транскрипты LINE1 экспрессировали исключительно наивные CD4<sup>+</sup>, что подтверждало предыдущие результаты (Фиг. 4b и Фиг. 1a-c). Интересно, что канонические транскрипты также являются специфическими для CD4<sup>+</sup> Т-клеток: в частности, в активированных CD4<sup>+</sup> Т-клетках экспрессия транскриптов LINE1 понижена, тогда как экспрессия канонических транскриптов повышена (Фиг. 4b,c и Дополнительные данные, Фиг. 16a,b). Затем авторы изобретения осуществляли поиск в массивах данных RNA-seq (см. Методы) и протеомных массивах данных <sup>26</sup> транскрипционных факторов (TF), у которых экспрессия в CD4<sup>+</sup> была выше по сравнению с CD8<sup>+</sup> Т-клетками, и мотивами связывания которых были обогащены промоторы LINE1-содержащих генов, которые могли отвечать за дифференциальную регуляцию указанных локусов. По результатам данного анализа первое место занял IRF4, что авторы изобретения сочли интересным, поскольку сообщалось, что он является ключевым фактором в активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток <sup>27,28</sup> (Фиг. 16c). Во-первых, авторы изобретения подтвердили, что IRF4 почти отсутствует в CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 4d) и его экспрессия повышается при активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток (Фиг. 16d), и во-вторых, продемонстрировали при помощи ChIP, что IRF4 связан с промоторами LINE1-содержащих генов в наивных CD4<sup>+</sup>, но не в CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 4e); затем провели истощение IRF4 в наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках при помощи ASO к IRF4 (Фиг. 4f и Фиг. 16e,f) и обнаружили значительное снижение экспрессии как LINE1, так и канонических транскриптов (Фиг. 4g), что указывало, что данный TF контролирует их CD4<sup>+</sup> специфическую экспрессию. В целом, указанные данные позволяют предположить, что в ходе развития Т-клеток LINE1 и соответствующие канонические транскрипты, являющиеся специфическими для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, находятся под контролем транскрипционного фактора IRF4.

**При активации Т-клеток экспрессия транскриптов LINE1 снижается под влиянием репрессоров сплайсинга PTBP1/MATR3 и фактора элонгации GTF2F1, содействующих экспрессии канонических транскриптов.**

Поскольку IRF4 является ключевым фактором при активации Т-клеток и непосредственно задействован в регуляции локусов LINE1-содержащих генов, каким

образом понижается экспрессия транскриптов LINE1 в активированных CD4+ Т-клетках? Как ранее сообщалось Attig et al., несколько гетеромерных РНК-связывающих белков связываются с интронными LINE1, влияя на их линиеспецифический сплайсинг; в частности, PTBP1 и MATR3 подавляют сплайсинг РНК внутри и вокруг LINE 29. Более того, поскольку авторы изобретения сообщали, что снижение экспрессии РНК LINE1 находится под контролем mTORC1 (Фиг. 1), вышеупомянутый массив данных сопоставили с тем, что был представлен Hsu et al. 30, в котором были подробно описаны белки, регулируемые mTORC1. Был обнаружен единственный белок, GTF2F1, который связывался с интронным LINE1, а также регулировался mTORC1. GTF2F1 представляет собой фактор элонгации транскрипции, который фосфорилируется при активации Т-клеток 31. Поэтому исследовали роль PTBP1, MATR3 и GTF2F1 в регуляции транскриптов LINE1 в активированных CD4+ Т-клетках. Проводили эксперименты с иммунопреципитацией РНК при помощи антител к PTBP1 и GTF2F1, продемонстрировавших, что эти два фактора связываются с экзонами LINE1 специфически в активированных CD4+ Т-клетках (Фиг. 5a-d). Более подробно, как показано на примере *RAB22A*, PTBP1 связывается только с пре-мРНК, что согласуется с его подавляющей сплайсинг ролью, тогда как GTF2F1 связывается как с пре-мРНК, так и с прошедшими сплайсинг каноническими транскриптами, как и ожидалось для фактора элонгации транскрипции (Фиг. 5e-g). Действительно, когда осуществляли истощение PTBP1, MATR3 и GTF2F1 при помощи ASO в наивных CD4+ Т-клетках, а затем их активировали, обнаруживалось, что экспрессия транскриптов LINE1 повышалась, а канонических транскриптов понижалась (Фиг. 5h и Фиг. 17), что указывало на обратную зависимость между LINE1 и каноническими транскриптами. Авторы изобретения пришли к выводу, что транскрипты LINE1 являются неканоническими сплайс-вариантами, которые подавляются PTBP1/MATR3/GTF2F1, что способствует экспрессии канонических транскриптов при активации клеток.

**Транскрипты LINE1 вновь накапливаются в TIL благодаря IRF4 и нуклеолину и вследствие утраты PTBP1/GTF2F1-опосредованного механизма.**

Анализировали динамику РНК LINE1 в Т-клетках, выделенных из опухолевого микроокружения, где эффекторные Т-клетки зачастую становятся дисфункциональными. Несмотря на то, что последние публикации описывают вклад

транскрипционных факторов и эпигенетических модификаций в дисфункциональное состояние, лежащие в его основе механизмы недостаточно изучены<sup>91-93</sup>. В этой связи, оценивали содержание РНК LINE1 в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, выделенных из нескольких образцов колоректального рака (CRC), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) и соответствующих прилежащих неопухолевых тканей. Следует отметить, что сигнал РНК LINE1 наблюдался во внутриопухолевых CD4<sup>+</sup> Т-клетках памяти и, что было неожиданным, также во внутриопухолевых CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти во всех образцах опухоли, тогда как в неопухолевых прилежащих тканях сигнал в Т-клетках памяти не обнаруживался, аналогично тому, что наблюдалось в периферической крови (Фиг. 6а,б).

Затем исследовали экспрессию РНК LINE1 в дисфункциональных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках, истощенных *in vitro* в результате воздействия на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки стимулирующего моноклонального антитела к CD3 каждые двое суток<sup>66 67</sup>. Многократная стимуляция анти-CD3 индуцирует ожидаемую остановку роста, повышение PD-1 и уменьшение секреции эффекторных цитокинов как в CD4<sup>+</sup>, так и в CD8<sup>+</sup> Т-клетках (Фиг. 18). Примечательно, что наблюдалось однотипное накопление заново РНК LINE1 в ядрах этих дисфункциональных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток: в частности, наблюдалось специфическое увеличение транскриптов LINE1 с сопутствующим снижением экспрессии LINE1-содержащих генов (Фиг. 6с-ф). Обнаружили, что уровни белка фактора транскрипции IRF4 и нуклеолина в истощенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках повышались, что согласовалось с накоплением транскриптов LINE1, при этом содержание GTF2F1 в истощенных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетках снижалось (Фиг. 7а). В частности, при помощи RIP обнаружили, что транскрипты LINE1 больше связаны с нуклеолином, при этом они теряли связывание с PTBP1 и GTF2F1 (Фиг. 7б). Нокдаун IRF4 подтверждает, что указанный фактор транскрипции отвечает за транскрипцию LINE1 также в случае истощения (Фиг. 7с,д и Фиг. 18е). Вместе взятые, эти данные демонстрируют, что в истощенных Т-клетках и в ТП транскрипты LINE1 накапливаются вновь, и что это является следствием IRF4 – нуклеолин-опосредованного образования транскриптов LINE1 и стабилизации в хроматине, тогда как подавляющий механизм, опосредованный через PTBP1/GTF2F1, утрачивается.

#### **Уровень транскриптов LINE1 контролирует эффекторный ответ ТП.**

Чтобы оценить, можно ли дисфункциональное поведение, наблюдающееся у

внутриопухолевых Т-клеток, по меньшей мере частично объяснить накоплением РНК LINE1 и, следовательно, модулировать посредством нацеленного воздействия на LINE1, выделяли внутриопухолевые CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки и осуществляли нокдаун их транскриптов LINE1 при помощи ASO к LINE1. Затем у клеток, истощенных по LINE1, измеряли экспрессию ингибитора иммунных контрольных точек, образование эффекторных цитокинов и способность уничтожать клетки-мишени (Фиг. 8a). Обнаружили, что процент положительных по PD-1, LAG3 и TIM3 клеток снижался в результате нацеленного воздействия на LINE1 (Фиг. 8b,c) и в соответствии с этими результатами также наблюдалось увеличение секреции эффекторных цитокинов (IFN $\gamma$  и гранзима В у CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, перфорина А у CD8<sup>+</sup> Т-клеток) в ТИЛ памяти, истощенных по LINE1 (Фиг. 8d,e). Эти данные позволяют предположить повышение функциональности ТИЛ, и для подтверждения этого также измеряли способность уничтожать клетки-мишени у CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> ТИЛ памяти, обработанных ASO к LINE1, в сравнении с внутриопухолевыми Т-клетками, обработанными нерелевантными ASO, показав, что способность ТИЛ к уничтожению практически удваивалась при нокдауне LINE1 (Фиг. 8f,g).

В дополнение к этому, нокдаун РНК LINE1 в Т-клетках, предварительно истощенных *in vitro*, приводил к восстановлению секреции эффекторных цитокинов (IFN $\gamma$  и гранзима В у CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, перфорина А у CD8<sup>+</sup> Т-клеток) (Фиг. 19a-e) и способности к уничтожению (Фиг. 19f,g), при этом пролиферация при обработке ASO к LINE1 не изменялась (Фиг. 19h,i). Вместе взятые, эти данные демонстрируют, что уровни РНК LINE1 регулируют эффекторный ответ Т-клеток, а их накопление во внутриопухолевых Т-клетках связано с дисфункциональным поведением, которое может быть частично ревертировано под воздействием ASO к РНК LINE1.

### Последовательности

Консенсусная последовательность последовательностей LINE1, которые наиболее представлены в реконструированных транскриптах LINE1 в Т-клетках.

>L1ME4A L1 Homo sapiens

```
cttgtatccagaatatataaagaacgcctacaactcaacaataaaaaaacgaattcccaacaaaaaacggacaaggacacgaana
gaccgtttacaagaagaatggaaataactancgaacatgaaaaatgttcaacctactaataatcaagaaatgcaattaaaaca
acaatgagatnccgttcttctcgtctancaaactggcanagataaaaaagataatakccagtgttggtgaggatgtggagaacggg
```

cactctatacactgctgggtgggagtataaattggtacaacctttctggaaggcaatttggcaatatntatcaaaagccttaaaaatgttcat  
 accctttgaccagcaattccacttctaggaatctatcctaaggaaataatcagaaatgtgnacaaagatttacgtacaaagatgttacc  
 gcagtattattataatagcaaaaaattggaacaacctaagtccaataataggggantggtaaataaattatggtacatccatacaat  
 ggaatattatgcagccat

taaaaatnatgtttcgaagaatatttaatgacatgggaaaatgctcatgatataatgtaagtgaaaaagcaggntacaaaactgtatat  
 acagtatgatctcaactttgtataaaattacatatataaatgtatacgtatntacatagaaaaaagactggaaggaaatacaccaaaatgt  
 aacagtgggtatctctgggtgggattatgggtgatttttcttttcttttctttgtattttctgtattttccaaatttttacaatgaacatgtatt  
 acttttataatcagaaaaaaa (SEQ ID NO:1)

>L1M4B L1 Homo sapiens

aaggagttcacttctggaatggcagcatgaggagctccgnagaccnctcccagcgaacaancataactggtgaaaatttttta  
 aaaaaacaaccattaaagtctctggaattgtcctaagggcatacagcaaatgaagaacatttattcaagaaaatctactaaatctcagt  
 aagaacagtgagagtctgtggcacttgagccacgaccgctccaccctccccctcccagctcagcntgacagaagctccactcc  
 gggcgggtgcgccaagaagacggggctccctctcccctcagctcccagtcaggntacgggtatctcncggggaggggcagggc  
 gccagcatttctcatcccctccagctccngttgcagaggctaaattccaggtgagttagctgagaggtcgggggctcccttctcca  
 cccagccccactcatagggcggaggctctaccccaggcgcggcagggccgagaatactggggccctgattgccctcaccagctc  
 gctcatagggcggaggtccacgcccgggagaggcaagccgagaagaccagaggctaccgccccgcccagcgccttctcataa  
 agcaggggtgtcactccgagagaagcgggcccactgtccccgccccagctccggagcagtggtcagagattttgccaggggga  
 gaggcagnccataagaacagagagctccgaagctctcccaaaggaactgactttattgaaacagagtgtgggggaagttaagccta  
 agggactctcgaaaacaatggagattttggtgtaagcaattaagaggaggctggttagctccatgagagcaacaagctaaaccatag  
 gccagctagttaccagagagaaccagggaagagacagctaaagaagagccctcctggggtcagaacaaacctcaaagactggcct  
 caaaaactaccctrcaaaggggcccgaatttaattggatcagactgtggagcaatttatgccccagggcattgtcgaaaacaatagag  
 caatcagccggcaattagtgagcctaacagctgggtgtgataccaannaggcagacagcttaacagagagatcagggaaagaga  
 cagtcaaagagagccctgctaaaaccactgtcatcccagggtgactgtgcgcatgcccaggctgcgccctctgaggagcgacatca  
 gaggcttcactgngggggaaatagacttcaataaatagtccagccaagtcactaaacaataaacaagcaaaaaacaancan  
 gagccggggnggggaatcagtatccagagttgctacaatatattacctaaatgtccagtttcaacaaaaaattatgagacatgcaa  
 gaaacaggaaagtgtgaccatacacaggaaaaaagcaggcaacagaaactgcctgtgagagggccagatgtcggatttagcag  
 aaaaagacttcaaagcagccattataaatatgtcaagaactaaaggaaaccatgcttaagaagtaaagggaaggtatgatgacaatgt  
 ctcatcaaatagagantatcaataaagagatagaattataanaaaaaaccaaattggaaattctggagttgaaaagtacaataactgaaa  
 tgaaaaattcactagaggggctcaacagtagatttganctggcagaagaaaagaatcagtraacttgaagatagatcaatagagattatg  
 caatctgaagaacagaaagaaaaaaagaatgaagaaaaatgaacagagcctcagagaaatgtgggacaccatyaagcataccaac  
 atatacatacatggacagacaacaacatatacataatgggagtaccagaaggagagagagaagagagagaaaggagcagaaaaaat





ttcctagaanyaagacacacaaaactacyaaaactgactcaagaagaaataganaatctgaatagacctataaaantnaagagattga  
 attagtaantntaaaaactnccyacaaaaaaagcccagncccagatggcttactgggtgaattctccaaanattfaaanagaattaatac  
 caattattcacctnttccaaaaatagaagaggaggnayactnccnaactnattctatgaggccagtattatcctgataccaaaaccag  
 ncaaagacatncaaaaagaaaagaaaa (SEQ ID NO:2)

>L1MC4 L1 Homo sapiens

ctaatactactaataatacaaaaaactcttaaaattgaaggataaaaagncaaaaaccnaatannaatgggnaaaagacatgaacag  
 acaattcacnaaaaatnataaaatggcccttaagcatataaaaagatgttcancctcacntataattagagaaacgcaaattaaactaca  
 ccgagataccatttctcaccancagatcggcaaaaattaaagatggcaatatannctgttggcgaggctgtgggnaacnggna  
 ctctatacactgctgggtgggagtgc aaattggtacaactnctttggaaganaattggcagnttctaataaaactacacntgcntttacac  
 tttgaccattagtcccacttctagaatttacctanagaaatacttctaacagntcaaaaatacacatgtacagggatgttcatagcagt  
 nttattntaatngtaaaaanattggaacaatcnaaatgtccatcagcaggagaatggntgaataaactatggtncatccacacaatgga  
 atactatncagctgtaaaaaagaatgaggaagatctctgtaataatgtggagnatttcggaacatnntntnagttgaaaaagnang  
 cgcaaaaagagtataatantatgctaccctcatataagaaagaaaggggatagagaaaatatacatatctgctcatttggcaaaaag  
 aaacacagaaaagataancaganactaatgagattggttaccacaggaanngggtgggaatggggaggaaaggacggaagga  
 atggggggcagtgacacttttctgagtatactttttgtatagttctaacttttgnaccatgtaatgtttcacatactcaagaaatgaataan  
 taaatcaacaaggatggggganaactcaaatgaatacaaacagaaacaatgaaccwaactgtatttcaaatgaataacataacc  
 aactgaagggggnaggaagaaaagaactaaccaagtaacttttgaacacagttttgactatatgcctcaggctaaagacaaaa  
 agaactntaaacaatattgaactctagttagtaggcttattttccgcagnggcatgggtagcaattctgaaactactttctgtatattctag  
 gactgagcaataagtaaatatattnggataatgggagccaggttctcactgtcggagaagggagttacaaataggaaaggggga  
 agactagaatgaaccctgtggtgttgattggaattggaggtatcagtggaactcatgggttttaatanatagatatacagacagacag  
 atatagaaatagatatagatataatgtgntgtgtatgtgtatgtatatacgtacatatatttctagctctgtccactgagagggcctaga  
 agcaatgacaccccagtagcaatgagcacacctagcggccagatcttggtttctaaataaccatttccactaaaaggaaccagggtcc  
 ttggagaaatggctgattcagggctggggcagggaaagtacaagatgagcctggaacatcttgttgccagaaagtaaggaagtg  
 ctcaaagaatgatggggacatgtcaaaaggacacaggagccagctgaaggggctcccactggccaaatctgggacaatttgagcat  
 caaataaataatgatagtaatggattataaccattgaataaaataagaatccatgagtcactgatataaataaataaataaataatg  
 ggggagaagggaaaagctcttcttacagtagaatgccaactaataatgtagaaggaatgatggaattagaaaatcaccatttgcaac  
 catcatagtaataattgattcaggcaagaatcatcaatggatgctaaaactagtgggtgaaagtttgatgagnaacaggatatttacatagt  
 ctcaaagtatctcccacaaaatacttattaattacaaggggaaaatagtaactttacagtggagaaacctggcagacaccacctaac  
 caagtgatcaaaagtaaacatcaccagtaatgggacaaatcgacatcatgtgcctcctgatatgatgactgagaaggacacaacatcat  
 tctgtggtatttctccaaaaatgcataacctgaatctaataatcatgaggaaacatcagacaaaccaaattgaggacattctacaaaataa  
 ctggcctgtactcttcaaaaatgtcaaggtcatgaaagacaaagaaagactgaggaactgttccagattaagggagactaaagagacat

gacaactaaatgcaacgcgtgatcctggattggatcctggaccaganttttttgctataaaggacattattgggacaactggcgaaattt  
 gaataaggctctgtagattagataatagtagttatcaatgtaatttctgattttgatnattgtactgtggttatgtaagagaa  
 tgccttgttttaggaaatacacactgaagtatttagggtaanggggcatcatgtctgcaacttactctcaaattgggtcagaaaaaaaaat  
 atgtatatgnanacagagaatgataaagcaaatgtggcaaatgtaacatttggggaatctgggtgaagggtatacgggaattctttgta  
 ctattctgcaacttttctgtaagtctgaaattatttcaaaataaaaagttaaaaa (SEQ ID NO:3)

ASO к LINE1 могут быть нацелены на такие элементы LINE1, которые специфически экспрессируются в наивных CD4+ Т-клетках (см. Результаты).

Номенклатура для приведенных выше последовательностей является следующей (ниже указан код нуклеотида согласно IUPAC и соответствующее основание):

A: аденин

C: цитозин

G: гуанин

T (или U): тимин (или урацил)

R: A или G

Y: C или T

S: G или C

W: A или T

K: G или T

M: A или C

B: C или G или T

D: A или G или T

H: A или C или T

V: A или C или G

N: любое основание

. или - : гЭП

### Литература

- 1 de Koning, A. P., Gu, W., Castoe, T. A., Batzer, M. A. & Pollock, D. D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet* **7**, e1002384, doi:10.1371/journal.pgen.1002384 (2011).
- 2 Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921, doi:10.1038/35057062 (2001).
- 3 Chuong, E. B., Elde, N. C. & Feschotte, C. Regulatory activities of transposable elements: from conflicts to benefits. *Nat Rev Genet* **18**, 71-86, doi:10.1038/nrg.2016.139 (2017).

- 4 Feschotte, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* **9**, 397-405, doi:10.1038/nrg2337 (2008).
- 5 Percharde, M., Sultana, T. & Ramalho-Santos, M. What Doesn't Kill You Makes You Stronger: Transposons as Dual Players in Chromatin Regulation and Genomic Variation. *Bioessays* **42**, e1900232, doi:10.1002/bies.201900232 (2020).
- 6 Kazazian, H. H., Jr. & Moran, J. V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat Genet* **19**, 19-24, doi:10.1038/ng0598-19 (1998).
- 7 Viollet, S., Monot, C. & Cristofari, G. L1 retrotransposition: The snap-velcro model and its consequences. *Mob Genet Elements* **4**, e28907, doi:10.4161/mge.28907 (2014).
- 8 Okada, N., Hamada, M., Ogiwara, I. & Ohshima, K. SINEs and LINEs share common 3' sequences: a review. *Gene* **205**, 229-243, doi:10.1016/s0378-1119(97)00409-5 (1997).
- 9 Malik, H. S., Henikoff, S. & Eickbush, T. H. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Res* **10**, 1307-1318, doi:10.1101/gr.145000 (2000).
- 10 Canapa, A., Barucca, M., Biscotti, M. A., Forconi, M. & Olmo, E. Transposons, Genome Size, and Evolutionary Insights in Animals. *Cytogenet Genome Res* **147**, 217-239, doi:10.1159/000444429 (2015).
- 11 Kazazian, H. H., Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* **303**, 1626-1632, doi:10.1126/science.1089670 (2004).
- 12 Belancio, V. P., Hedges, D. J. & Deininger, P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* **18**, 343-358, doi:10.1101/gr.5558208 (2008).
- 13 Muotri, A. R. *et al.* Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* **435**, 903-910, doi:10.1038/nature03663 (2005).
- 14 Beck, C. R. *et al.* LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* **141**, 1159-1170, doi:10.1016/j.cell.2010.05.021 (2010).
- 15 Ewing, A. D. & Kazazian, H. H., Jr. High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. *Genome Res* **20**, 1262-1270, doi:10.1101/gr.106419.110 (2010).
- 16 Iskow, R. C. *et al.* Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* **141**, 1253-1261, doi:10.1016/j.cell.2010.05.020 (2010).
- 17 Baillie, J. K. *et al.* Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature* **479**, 534-537, doi:10.1038/nature10531 (2011).
- 18 Perrat, P. N. *et al.* Transposition-driven genomic heterogeneity in the Drosophila brain. *Science* **340**, 91-95, doi:10.1126/science.1231965 (2013).
- 19 Upton, K. R. *et al.* Ubiquitous L1 mosaicism in hippocampal neurons. *Cell* **161**, 228-239, doi:10.1016/j.cell.2015.03.026 (2015).
- 20 Coufal, N. G. *et al.* L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* **460**, 1127-1131, doi:10.1038/nature08248 (2009).
- 21 Reilly, M. T., Faulkner, G. J., Dubnau, J., Ponomarev, I. & Gage, F. H. The role of transposable elements in health and diseases of the central nervous system. *J Neurosci* **33**, 17577-17586, doi:10.1523/JNEUROSCI.3369-13.2013 (2013).
- 22 Saleh, A., Macia, A. & Muotri, A. R. Transposable Elements, Inflammation, and Neurological Disease. *Front Neurol* **10**, 894, doi:10.3389/fneur.2019.00894 (2019).
- 23 Payer, L. M. & Burns, K. H. Transposable elements in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **20**, 760-772, doi:10.1038/s41576-019-0165-8 (2019).

- 24 Deniz, O., Frost, J. M. & Branco, M. R. Regulation of transposable elements by DNA modifications. *Nat Rev Genet* **20**, 417-431, doi:10.1038/s41576-019-0106-6 (2019).
- 25 Mc, C. B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* **36**, 344-355, doi:10.1073/pnas.36.6.344 (1950).
- 26 McClintock, B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **21**, 197-216, doi:10.1101/sqb.1956.021.01.017 (1956).
- 27 Sundaram, V. *et al.* Widespread contribution of transposable elements to the innovation of gene regulatory networks. *Genome Res* **24**, 1963-1976, doi:10.1101/gr.168872.113 (2014).
- 28 Bodega, B. & Orlando, V. Repetitive elements dynamics in cell identity programming, maintenance and disease. *Curr Opin Cell Biol* **31**, 67-73, doi:10.1016/j.ceb.2014.09.002 (2014).
- 29 Pennisi, E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science* **337**, 1159, 1161, doi:10.1126/science.337.6099.1159 (2012).
- 30 Bourque, G. *et al.* Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. *Genome Res* **18**, 1752-1762, doi:10.1101/gr.080663.108 (2008).
- 31 Imbeault, M., Helleboid, P. Y. & Trono, D. KRAB zinc-finger proteins contribute to the evolution of gene regulatory networks. *Nature* **543**, 550-554, doi:10.1038/nature21683 (2017).
- 32 Morgan, H. D., Sutherland, H. G., Martin, D. I. & Whitelaw, E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* **23**, 314-318, doi:10.1038/15490 (1999).
- 33 Ferrari, R. *et al.* TFIIC Binding to Alu Elements Controls Gene Expression via Chromatin Looping and Histone Acetylation. *Mol Cell* **77**, 475-487 e411, doi:10.1016/j.molcel.2019.10.020 (2020).
- 34 Schmidt, D. *et al.* Waves of retrotransposon expansion remodel genome organization and CTCF binding in multiple mammalian lineages. *Cell* **148**, 335-348, doi:10.1016/j.cell.2011.11.058 (2012).
- 35 Zhang, Y. *et al.* Transcriptionally active HERV-H retrotransposons demarcate topologically associating domains in human pluripotent stem cells. *Nat Genet* **51**, 1380-1388, doi:10.1038/s41588-019-0479-7 (2019).
- 36 Faulkner, G. J. *et al.* The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet* **41**, 563-571, doi:10.1038/ng.368 (2009).
- 37 Rodriguez-Terrones, D. *et al.* A distinct metabolic state arises during the emergence of 2-cell-like cells. *EMBO Rep* **21**, e48354, doi:10.15252/embr.201948354 (2020).
- 38 Lu, J. Y. *et al.* Genomic Repeats Categorize Genes with Distinct Functions for Orchestrated Regulation. *Cell Rep* **30**, 3296-3311 e3295, doi:10.1016/j.celrep.2020.02.048 (2020).
- 39 Attig, J. *et al.* Heteromeric RNP Assembly at LINEs Controls Lineage-Specific RNA Processing. *Cell* **174**, 1067-1081 e1017, doi:10.1016/j.cell.2018.07.001 (2018).
- 40 Nekrutenko, A. & Li, W. H. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet* **17**, 619-621, doi:10.1016/s0168-9525(01)02445-3 (2001).
- 41 Perepelitsa-Belancio, V. & Deininger, P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet* **35**, 363-366, doi:10.1038/ng1269 (2003).

- 42 Roy-Engel, A. M. *et al.* Human retroelements may introduce intragenic polyadenylation signals. *Cytogenet Genome Res* **110**, 365-371, doi:10.1159/000084968 (2005).
- 43 Gong, C. & Maquat, L. E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**, 284-288, doi:10.1038/nature09701 (2011).
- 44 Kapusta, A. *et al.* Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet* **9**, e1003470, doi:10.1371/journal.pgen.1003470 (2013).
- 45 Kelley, D. & Rinn, J. Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs. *Genome Biol* **13**, R107, doi:10.1186/gb-2012-13-11-r107 (2012).
- 46 Fort, A. *et al.* Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance. *Nat Genet* **46**, 558-566, doi:10.1038/ng.2965 (2014).
- 47 Lu, X. *et al.* The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 423-425, doi:10.1038/nsmb.2799 (2014).
- 48 Hall, L. L. *et al.* Stable COT-1 repeat RNA is abundant and is associated with euchromatic interphase chromosomes. *Cell* **156**, 907-919, doi:10.1016/j.cell.2014.01.042 (2014).
- 49 Jachowicz, J. W. *et al.* LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat Genet* **49**, 1502-1510, doi:10.1038/ng.3945 (2017).
- 50 Fadloun, A. *et al.* Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 332-338, doi:10.1038/nsmb.2495 (2013).
- 51 Percharde, M. *et al.* A LINE1-Nucleolin Partnership Regulates Early Development and ESC Identity. *Cell* **174**, 391-405 e319, doi:10.1016/j.cell.2018.05.043 (2018).
- 52 Quezada, S. A. & Peggs, K. S. Tumor-reactive CD4+ T cells: plasticity beyond helper and regulatory activities. *Immunotherapy* **3**, 915-917, doi:10.2217/imt.11.83 (2011).
- 53 Catalano, I., Grassi, E., Bertotti, A. & Trusolino, L. Immunogenomics of Colorectal Tumors: Facts and Hypotheses on an Evolving Saga. *Trends Cancer* **5**, 779-788, doi:10.1016/j.trecan.2019.10.006 (2019).
- 54 Jerby-Arnon, L. *et al.* A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* **175**, 984-997 e924, doi:10.1016/j.cell.2018.09.006 (2018).
- 55 Jamal-Hanjani, M., Thanopoulou, E., Peggs, K. S., Quezada, S. A. & Swanton, C. Tumour heterogeneity and immune-modulation. *Curr Opin Pharmacol* **13**, 497-503, doi:10.1016/j.coph.2013.04.006 (2013).
- 56 Munn, D. H. & Bronte, V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* **39**, 1-6, doi:10.1016/j.coi.2015.10.009 (2016).
- 57 Yang, Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* **125**, 3335-3337, doi:10.1172/JCI83871 (2015).
- 58 Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 197-218, doi:10.1038/s41573-018-0007-y (2019).
- 59 Guo, X. *et al.* Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing. *Nat Med* **24**, 978-985, doi:10.1038/s41591-018-0045-3 (2018).

- 60 Lavin, Y. *et al.* Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* **169**, 750-765 e717, doi:10.1016/j.cell.2017.04.014 (2017).
- 61 Lei Zhang, X. Y., Liangtao Zheng, Yuanyuan Zhang, Yansen Li, Qiao Fang, Ranran Gao, Boxi Kang, Qiming Zhang, Julie Y. Huang, Hiroyasu Konno, Xinyi Guo, Yingjiang Ye, Songyuan Gao, Shan Wang, Xueda Hu, Xianwen Ren, Zhanlong Shen, Wenjun Ouyang & Zemin Zhang. Lineage tracking reveals dynamic relationships of t cells in colorectal cancer. *Nature*, doi:10.1038/s41586-018-0694-x (2018). (2018).
- 62 Savas, P. *et al.* Single-cell profiling of breast cancer T cells reveals a tissue-resident memory subset associated with improved prognosis. *Nat Med* **24**, 986-993, doi:10.1038/s41591-018-0078-7 (2018).
- 63 Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394-424, doi:10.3322/caac.21492 (2018).
- 64 Travis, W. D. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* **23**, 65-81, viii, doi:10.1016/s0272-5231(03)00061-3 (2002).
- 65 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **68**, 7-30, doi:10.3322/caac.21442 (2018).
- 66 Dunsford L.S., T. R. H., Rathbone E., Patakas A. *A Human In Vitro T Cell Exhaustion Model for Assessing Immuno-Oncology Therapies*. (Springer, 2020).
- 67 Yang, Z. Z. *et al.* TGF-beta upregulates CD70 expression and induces exhaustion of effector memory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **28**, 1872-1884, doi:10.1038/leu.2014.84 (2014).
- 68 Ricciardi, S. *et al.* The Translational Machinery of Human CD4(+) T Cells Is Poised for Activation and Controls the Switch from Quiescence to Metabolic Remodeling. *Cell Metab* **28**, 961, doi:10.1016/j.cmet.2018.09.010 (2018).
- 69 Marasca, F., Cortesi, A. & Bodega, B. 3D COMBO chrRNA-DNA-ImmunoFISH. *Methods Mol Biol* **2157**, 281-297, doi:10.1007/978-1-0716-0664-3\_16 (2021).
- 70 Shibayama, Y., Fanucchi, S. & Mhlanga, M. M. Visualization of Enhancer-Derived Noncoding RNA. *Methods Mol Biol* **1468**, 19-32, doi:10.1007/978-1-4939-4035-6\_3 (2017).
- 71 Cortesi, A. *et al.* 4q-D4Z4 chromatin architecture regulates the transcription of muscle atrophic genes in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Genome Res* **29**, 883-895, doi:10.1101/gr.233288.117 (2019).
- 72 Fontana, C. *et al.* Early maternal care restores LINE-1 methylation and enhances neurodevelopment in preterm infants. *BMC Med* **19**, 42, doi:10.1186/s12916-020-01896-0 (2021).
- 73 Bodega, B. *et al.* A cytosolic Ezh1 isoform modulates a PRC2-Ezh1 epigenetic adaptive response in postmitotic cells. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 444-452, doi:10.1038/nsmb.3392 (2017).
- 74 Werner, M. S. & Ruthenburg, A. J. Nuclear Fractionation Reveals Thousands of Chromatin-Tethered Noncoding RNAs Adjacent to Active Genes. *Cell Rep* **12**, 1089-1098, doi:10.1016/j.celrep.2015.07.033 (2015).
- 75 Grabherr, M. G. *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* **29**, 644-652, doi:10.1038/nbt.1883 (2011).
- 76 Haas, B. J. *et al.* Improving the Arabidopsis genome annotation using maximal transcript alignment assemblies. *Nucleic Acids Res* **31**, 5654-5666, doi:10.1093/nar/gkg770 (2003).

- 77 Perteza, M. *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nat Biotechnol* **33**, 290-295, doi:10.1038/nbt.3122 (2015).
- 78 Ramsay, L. *et al.* Conserved expression of transposon-derived non-coding transcripts in primate stem cells. *BMC Genomics* **18**, 214, doi:10.1186/s12864-017-3568-y (2017).
- 79 Ranzani, V. *et al.* The long intergenic noncoding RNA landscape of human lymphocytes highlights the regulation of T cell differentiation by linc-MAF-4. *Nat Immunol* **16**, 318-325, doi:10.1038/ni.3093 (2015).
- 80 Kolasinska-Zwierz, P. *et al.* Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet* **41**, 376-381, doi:10.1038/ng.322 (2009).
- 81 Spies, N., Nielsen, C. B., Padgett, R. A. & Burge, C. B. Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Mol Cell* **36**, 245-254, doi:10.1016/j.molcel.2009.10.008 (2009).
- 82 Schmidl, C., Rendeiro, A. F., Sheffield, N. C. & Bock, C. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nat Methods* **12**, 963-965, doi:10.1038/nmeth.3542 (2015).
- 83 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).
- 84 Han, J. S., Szak, S. T. & Boeke, J. D. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* **429**, 268-274, doi:10.1038/nature02536 (2004).
- 85 Ustyugova, S. V., Lebedev, Y. B. & Sverdlov, E. D. Long L1 insertions in human gene introns specifically reduce the content of corresponding primary transcripts. *Genetica* **128**, 261-272, doi:10.1007/s10709-005-5967-2 (2006).
- 86 Peddigari, S., Li, P. W., Rabe, J. L. & Martin, S. L. hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Res* **41**, 575-585, doi:10.1093/nar/gks1075 (2013).
- 87 Hsu, P. P. *et al.* The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* **332**, 1317-1322, doi:10.1126/science.1199498 (2011).
- 88 Tan, H. *et al.* Integrative Proteomics and Phosphoproteomics Profiling Reveals Dynamic Signaling Networks and Bioenergetics Pathways Underlying T Cell Activation. *Immunity* **46**, 488-503, doi:10.1016/j.immuni.2017.02.010 (2017).
- 89 Moir, L. M. Lymphangioliomyomatosis: Current understanding and potential treatments. *Pharmacol Ther* **158**, 114-124, doi:10.1016/j.pharmthera.2015.12.008 (2016).
- 90 Sehgal, S. N. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* **35**, 7S-14S, doi:10.1016/s0041-1345(03)00211-2 (2003).
- 91 Martinez, G. J. *et al.* The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8(+) T cells. *Immunity* **42**, 265-278, doi:10.1016/j.immuni.2015.01.006 (2015).
- 92 Philip, M. *et al.* Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* **545**, 452-456, doi:10.1038/nature22367 (2017).
- 93 Yue, X., Lio, C. J., Samaniego-Castruita, D., Li, X. & Rao, A. Loss of TET2 and TET3 in regulatory T cells unleashes effector function. *Nat Commun* **10**, 2011, doi:10.1038/s41467-019-09541-y (2019).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Супрессор или ингибитор экспрессии длинного диспергированного элемента 1 (LINE1 (L1)) для применения в лечении и/или предупреждении первичного или вторичного иммунодефицита или патологий, демонстрирующих иммуносупрессивный фенотип, предпочтительно рака и/или метастазов, более предпочтительно рака легкого, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), или колоректального рака (CRC), или вирусных заболеваний, таких как иммунодефициты, вызванные вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV),

где L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или состоит из нее.

2. Супрессор или ингибитор экспрессии LINE1 (L1) для медицинского применения, где L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или состоит из нее.

3. Супрессор или ингибитор для применения по п. 1 или п. 2, где L1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

4. Супрессор или ингибитор для применения по любому из пп. 1-3, представляющий собой по меньшей мере одну молекулу, выбранную из группы, состоящей из:

а) полинуклеотида, такого как антисмысловая конструкция, антисмысловой олигонуклеотид, интерферирующая РНК-конструкция или siRNA (малая интерферирующая РНК) или кодирующий ее полинуклеотид,

б) антитела или его фрагмента;

в) полипептида;

г) малой молекулы;

д) полинуклеотида, кодирующего указанные антитело или полипептид или его функциональное производное;

е) вектора, содержащего или экспрессирующего полинуклеотид, как он определен в а) или д);

ж) компонента CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами / CRISPR-ассоциированный белок 9), например sgRNA (одиночная направляющая РНК);

з) генетически модифицированной клетки-хозяина, экспрессирующей указанные



полипептид или антитело или содержащей полинуклеотид, как он определен в а) или д), или по меньшей мере один компонент ж).

**5.** Супрессор или ингибитор для применения по п. 4, где полинуклеотид представляет собой выделенную ингибирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на LINE1.

**6.** Супрессор или ингибитор для применения по п. 5, где ингибирующая нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеотидов, комплементарных от 10 до 50 последовательным нуклеотидам SEQ ID NO: 1, 2 или 3.

**7.** Супрессор или ингибитор для применения по п. 6, где указанная ингибирующая нуклеиновая кислота представляет собой по меньшей мере один ингибитор РНК, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из: антисмыслового олигонуклеотида (ASO), гэпмера, миксмера, shRNA (короткая шпилечная РНК), siRNA, stRNA, snRNA (малая ядерная РНК), более предпочтительно указанная ингибирующая нуклеиновая кислота является модифицированной, такой как 2'-дезоксид-2'-фтор-β-D-арабинонуклеиновая кислота (FANA) ASO и/или содержит одну или более модифицированных связей или оснований.

**8.** Супрессор или ингибитор для применения по п. 7, где ASO содержит последовательность, способную гибридизоваться с последовательностью, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 1, 2 или 3, или комплементарную ей.

**9.** Супрессор или ингибитор для применения по любому из пп. 1-8, применяющийся в Т-клетках, предпочтительно наивных CD4<sup>+</sup> Т-клетках или CD8<sup>+</sup> Т-клетках, инфильтрирующих опухоль лимфоцитах ТИЛ, как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup>, В-клетках, естественных киллерных клетках или опухолевых клетках.

**10.** Супрессор или ингибитор для применения по любому из пп. 1-9 в комбинации с иммунотерапией и/или лучевой терапией и/или химиотерапевтическим средством и/или таргетными терапиями, которые способствуют образованию новых антигенов и иммунному ответу, и/или с адъювантами иммунной системы, предпочтительно указанная иммунотерапия включает введение ингибитора иммунных контрольных точек и/или иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), предпочтительно ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой или содержит одно или более антител к CD137; антител к PD-1 (белок программируемой клеточной гибели 1); антител к PDL1 (лиганд программируемой

клеточной гибели 1); антител к PDL2 или антител к CTLA-4.

**11.** Супрессор или ингибитор для применения по любому из пп. 1-10, применяющийся в адоптивном переносе клеток (ACT), лечении клеточной терапией, трансплантации несовместимого костного мозга, инфузии несовместимых НК-клеток или инфузии цитокин-индуцированных киллерных клеток (CIK), или где указанный супрессор или ингибитор инъецирован в опухолевый очаг, например в опухоль кишечника, меланому, или специфически доставлен посредством наночастиц в участок, представляющий интерес.

**12.** Фармацевтическая композиция, содержащая супрессор или ингибитор, как определено в любом из пп. 1-11, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель и возможно дополнительно содержащая терапевтическое средство.

**13.** Способ регулирования коммитирования наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток в направлении любой эффекторной линии и модулирования эффекторного ответа дисфункциональных Т-клеток, включающий стадию ингибирования экспрессии LINE1 в указанных клетках, где стадию ингибирования экспрессии LINE1 в указанных клетках осуществляют посредством по меньшей мере одного супрессора или ингибитора, как определено в любом из пп. 1-11.

**14.** Выделенная человеческая Т-клетка, В-клетка, НК-клетка или опухолевая клетка, где указанная клетка стабильно или транзиторно подвержена экспрессии LINE1 (L1),

где L1 содержит последовательность, имеющую 100, 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80% идентичности с SEQ ID NO: 1 или 2 или 3, или состоит из нее,

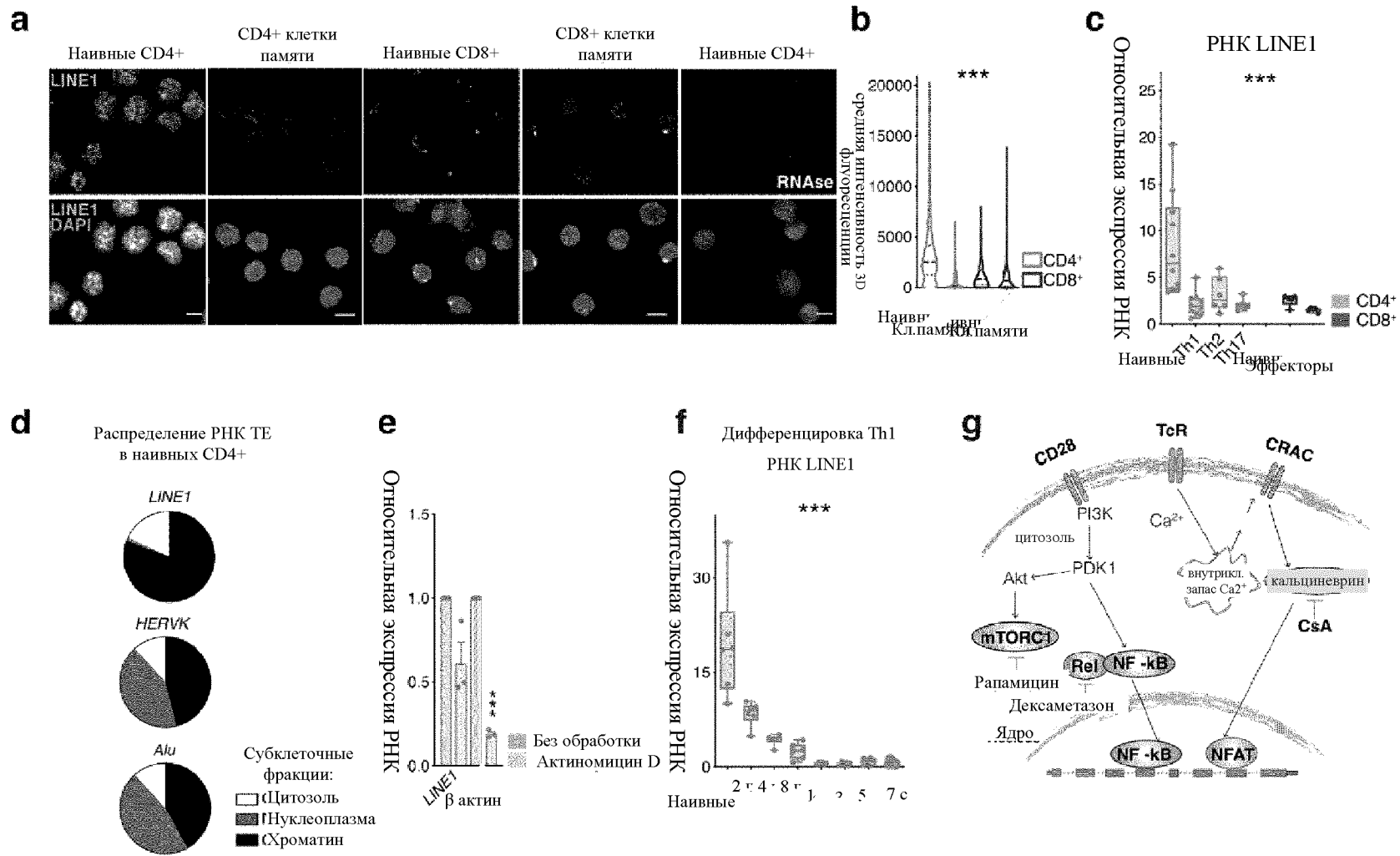
предпочтительно указанная клетка представляет собой наивную CD4<sup>+</sup> Т-клетку, или CD8<sup>+</sup> Т-клетку, или дисфункциональную Т-клетку, например TIL.

**15.** Композиция, содержащая по меньшей мере одну клетку или их комбинацию, как определено в п. 14, где указанная композиция предпочтительно дополнительно содержит по меньшей мере один физиологически приемлемый носитель.

**16.** Клетка по п. 14 или композиция по п. 15 для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно для применения в лечении и/или предупреждении первичного или вторичного иммунодефицита или патологий, демонстрирующих иммуносупрессивный фенотип, предпочтительно рака и/или метастазов, более предпочтительно рака легкого, еще более предпочтительно немелкоклеточной карциномы легкого (NSCLC), или колоректального рака (CRC), или

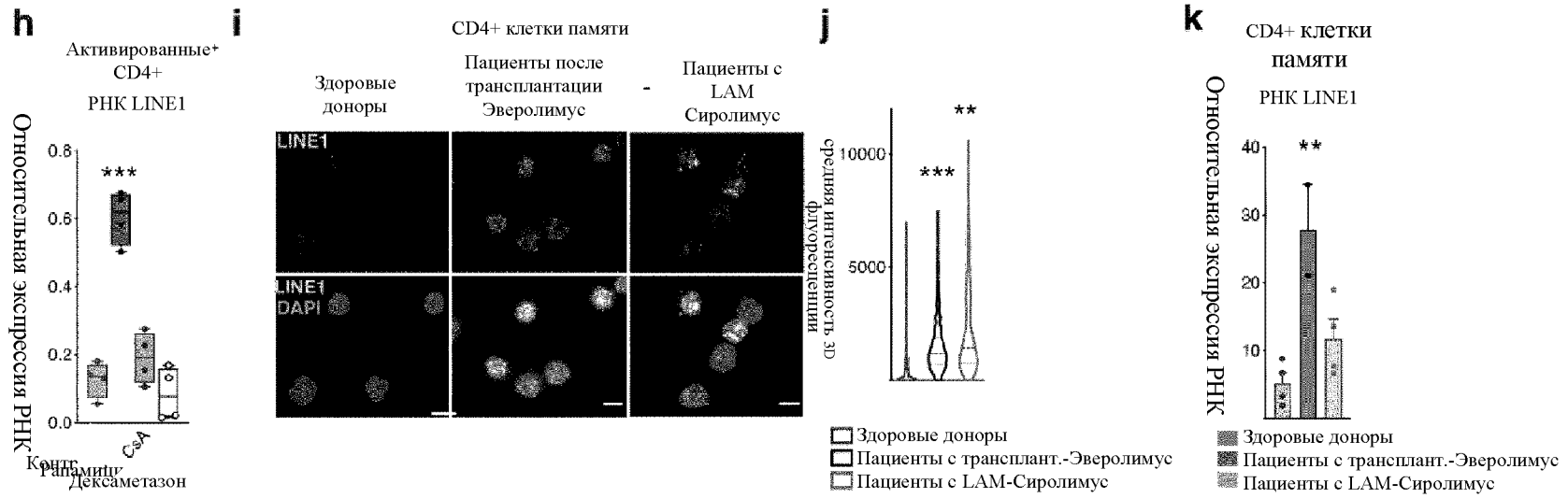
вирусных заболеваний, таких как иммунодефициты, вызванные вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV),

предпочтительно указанные клетка или композиция применяются в адоптивном переносе клеток (ACT), лечении клеточной терапией, трансплантации несовместимого костного мозга, инфузии несовместимых NK-клеток или инфузии цитокин-индуцированных киллерных клеток (CIK), или где указанные клетка или композиция инъекцированы в опухолевый очаг, например в опухоль кишечника, меланому, или специфически доставлены посредством наночастиц в участок, представляющий интерес.

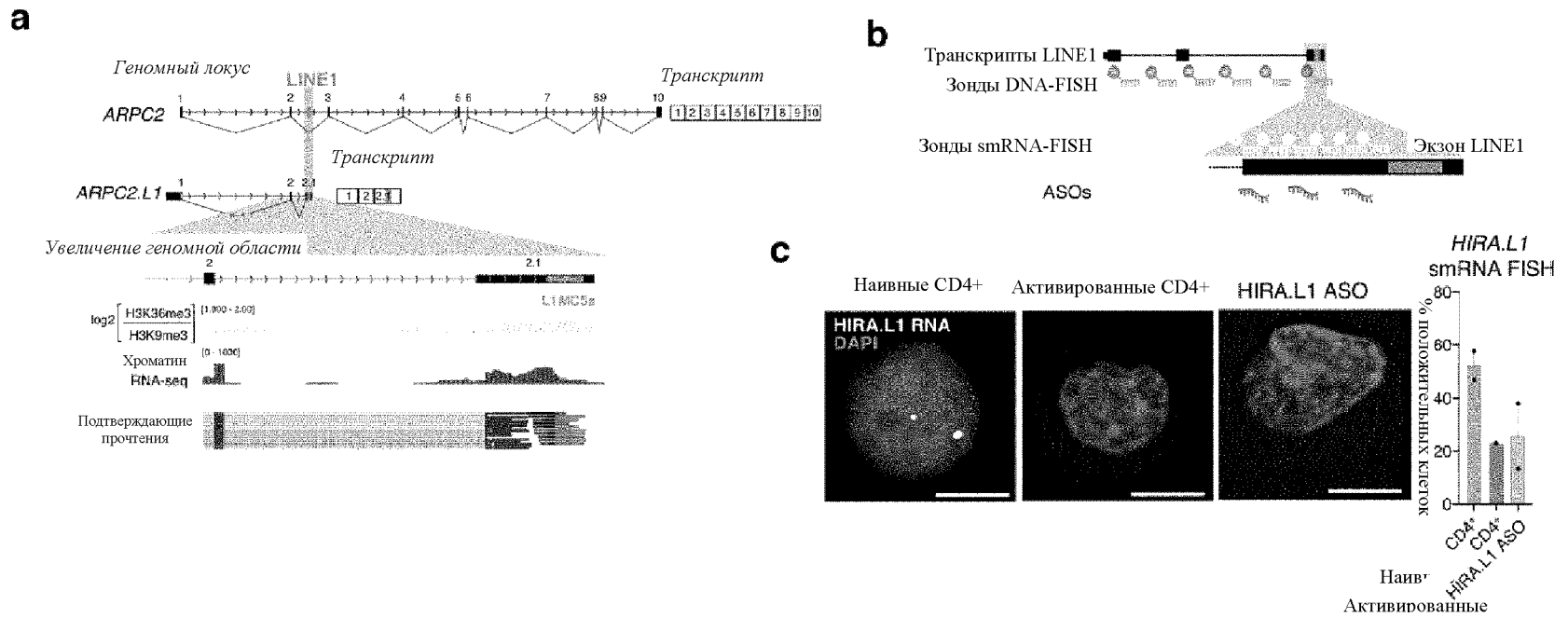


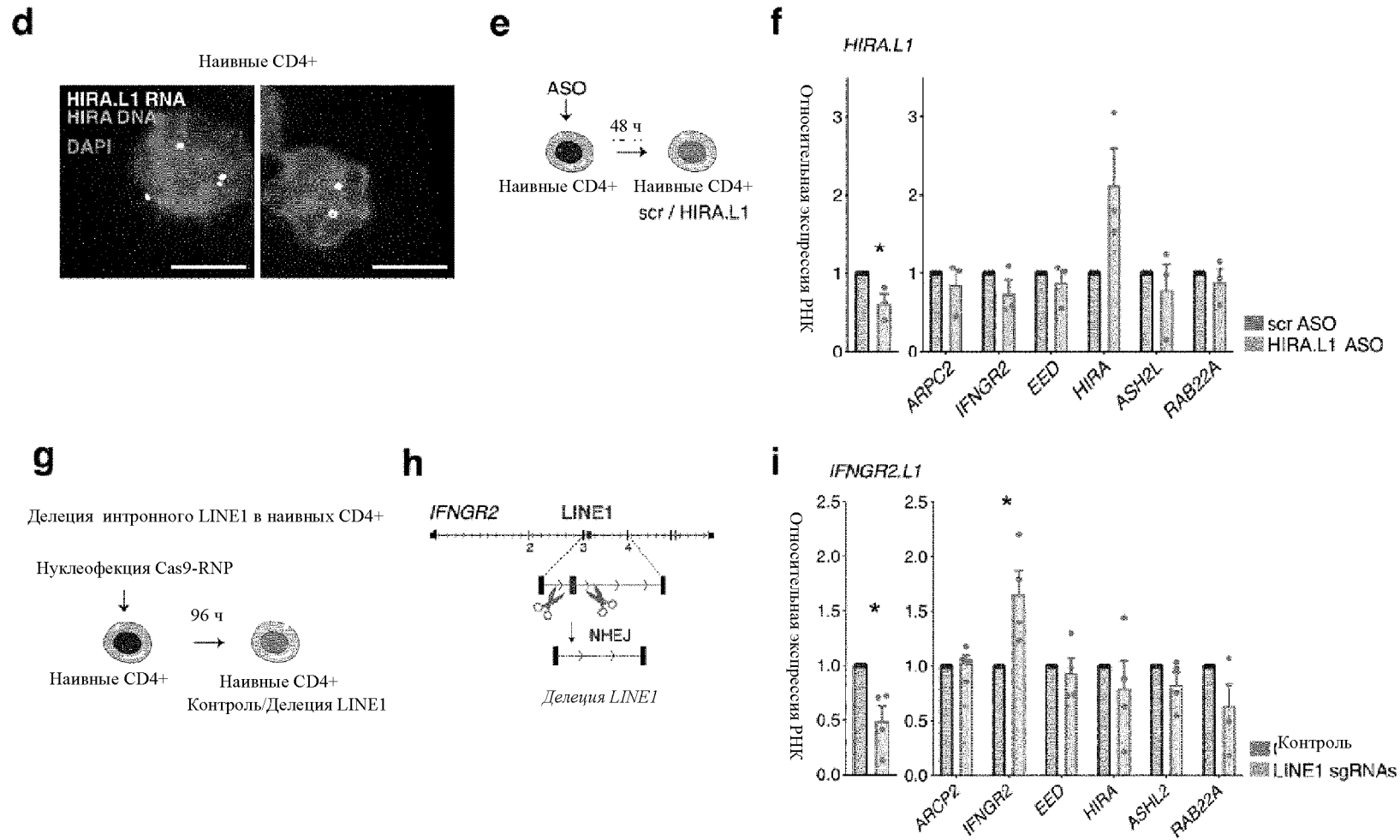
Фиг. 1 (1/2)

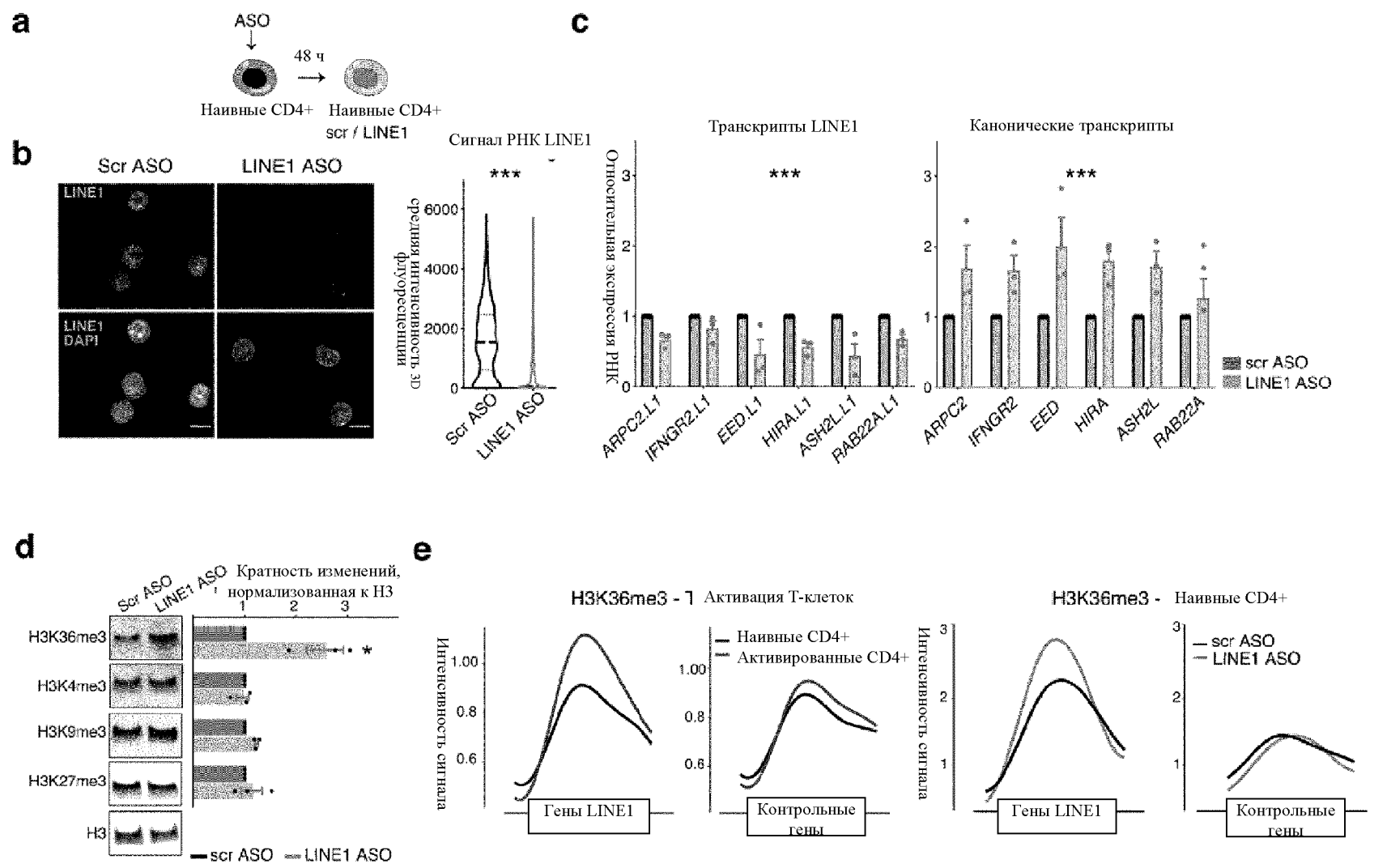
Фиг. 1 (2/2)



Фиг. 2 (1/2)



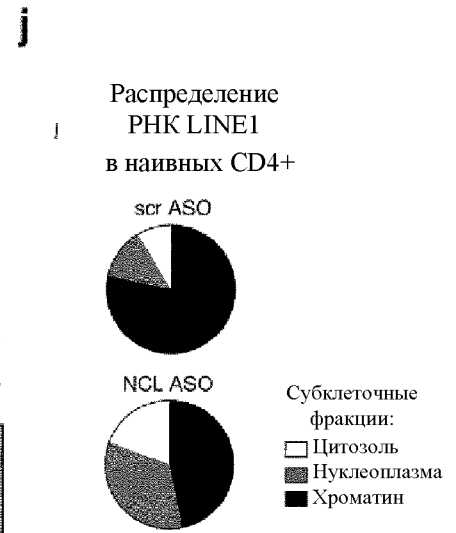
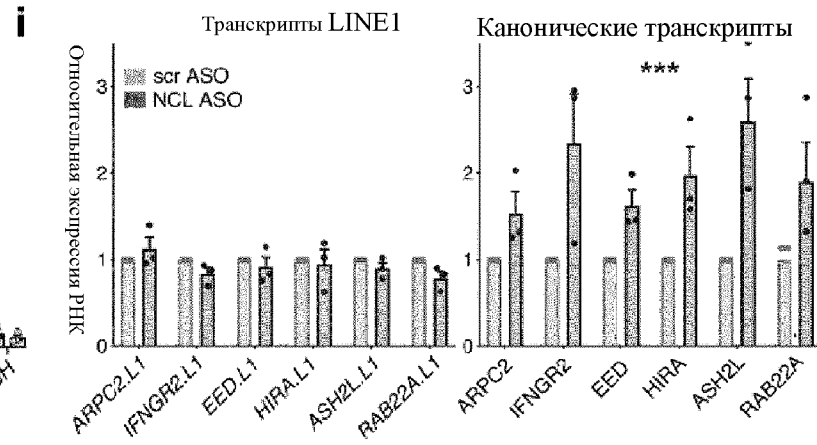
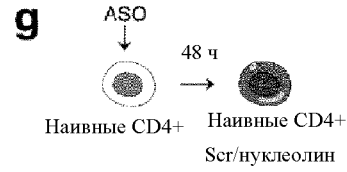
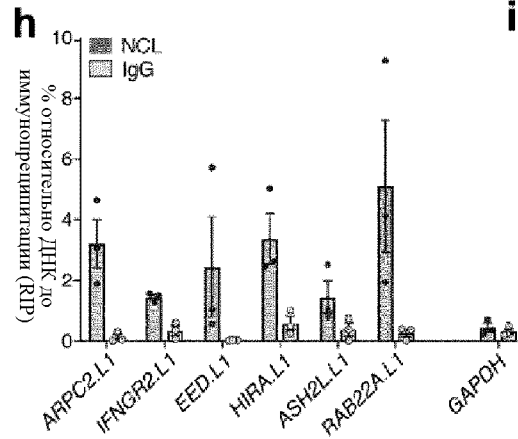




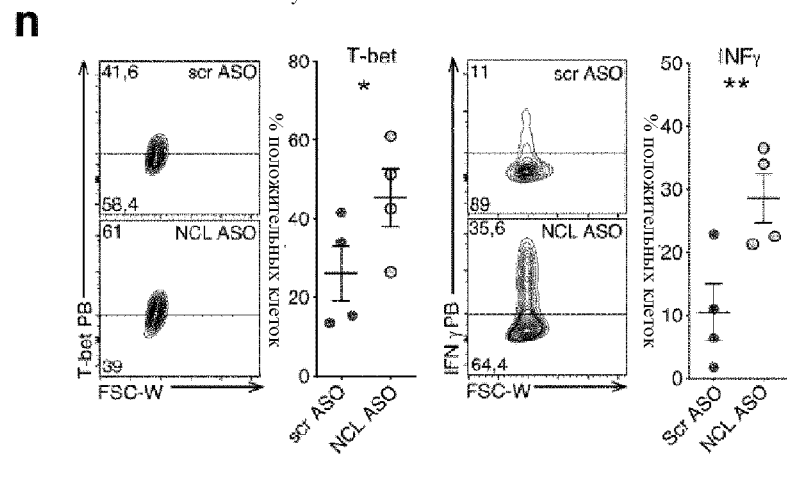
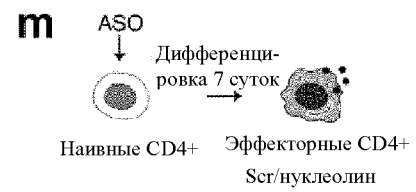
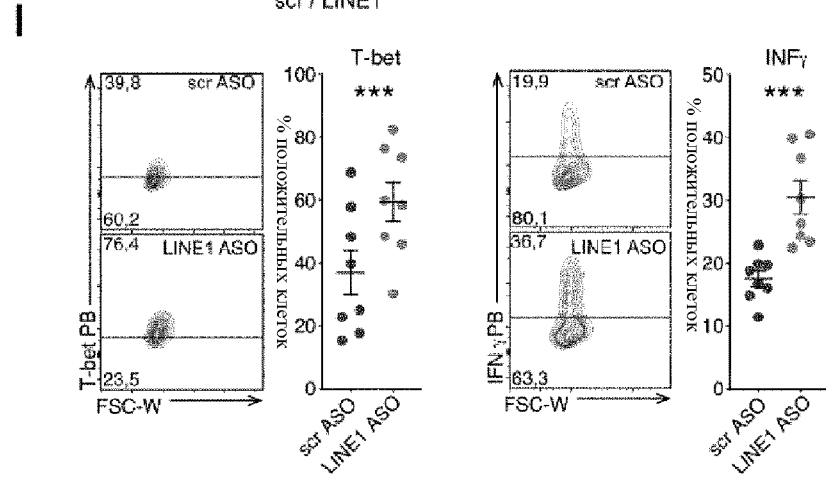
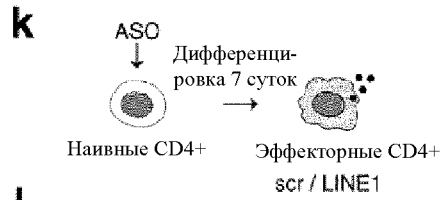
Фиг. 3 (1/3)



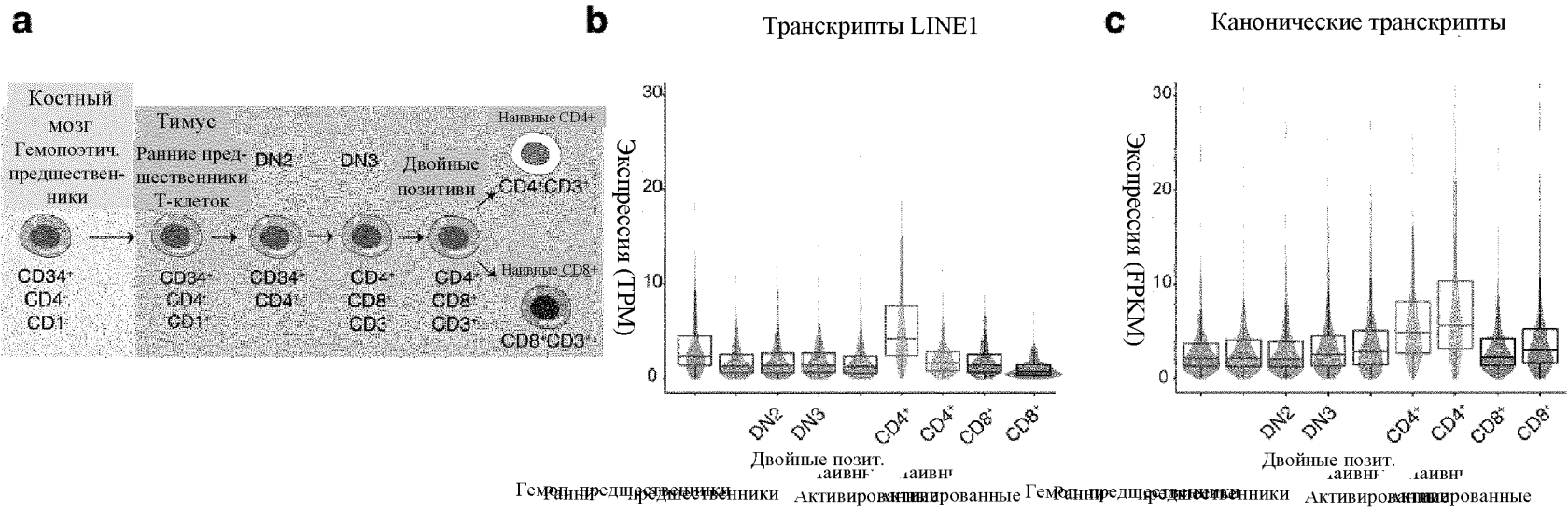
Фиг. 3 (2/3)

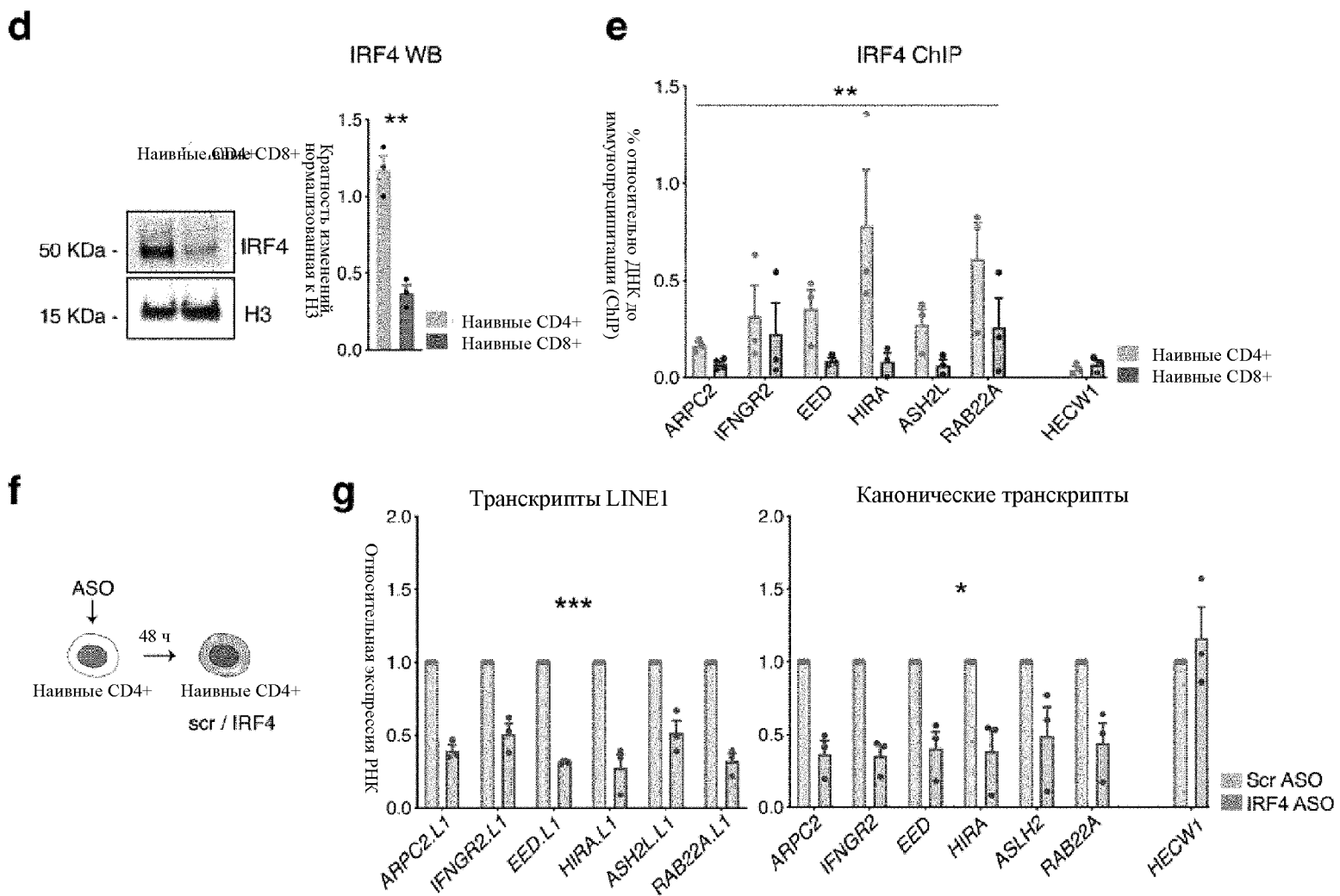


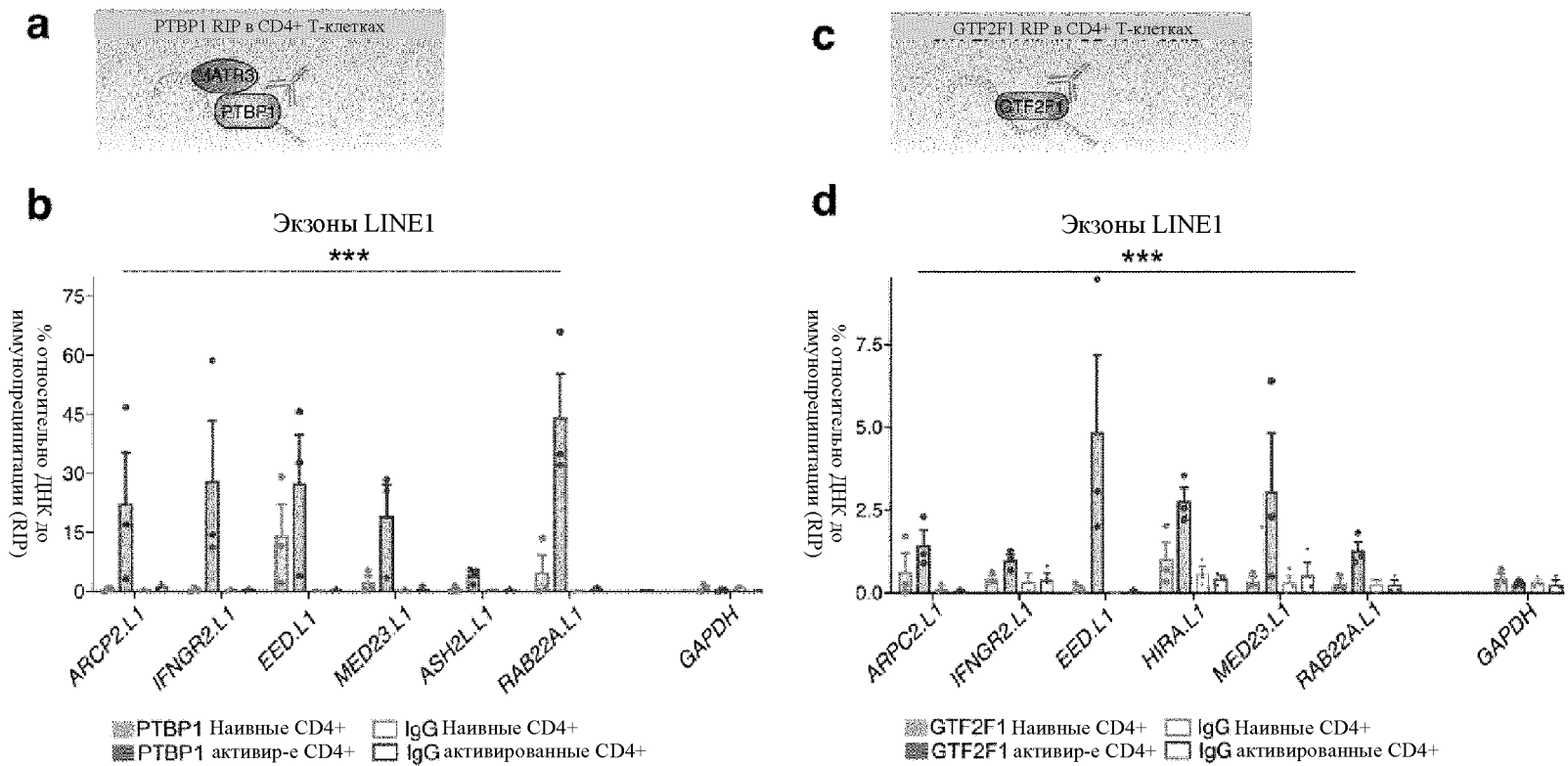
Фиг. 3 (3/3)



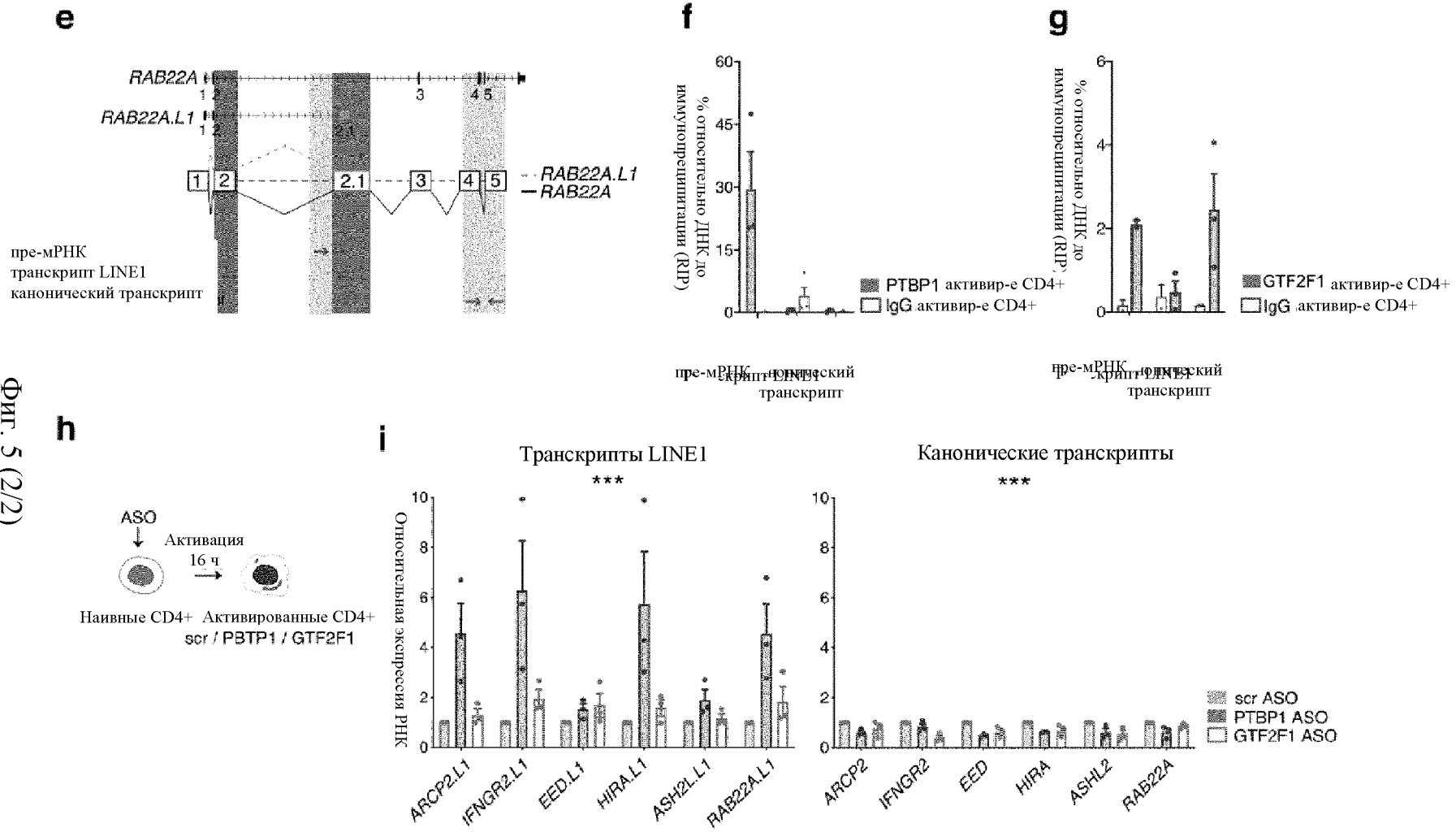
Фиг. 4 (1/2)



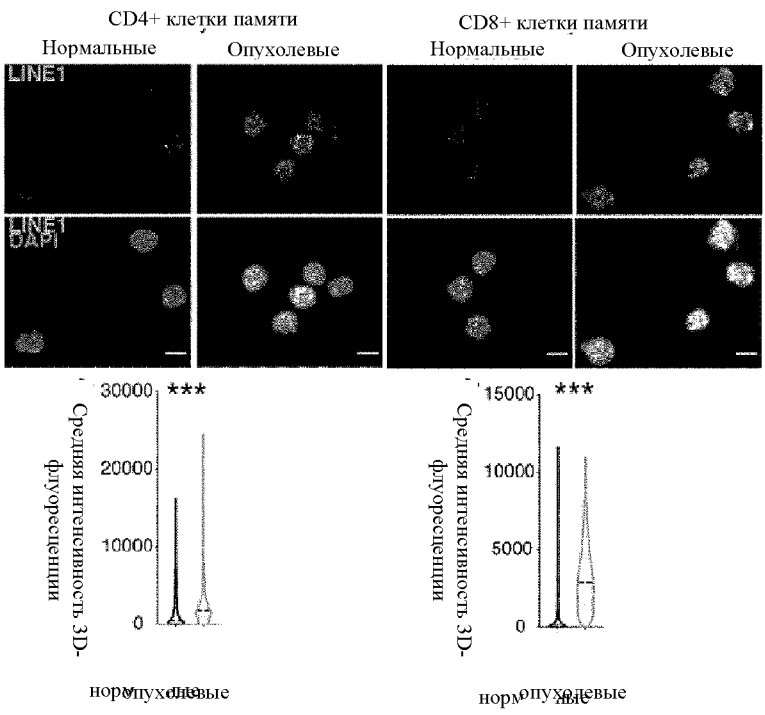




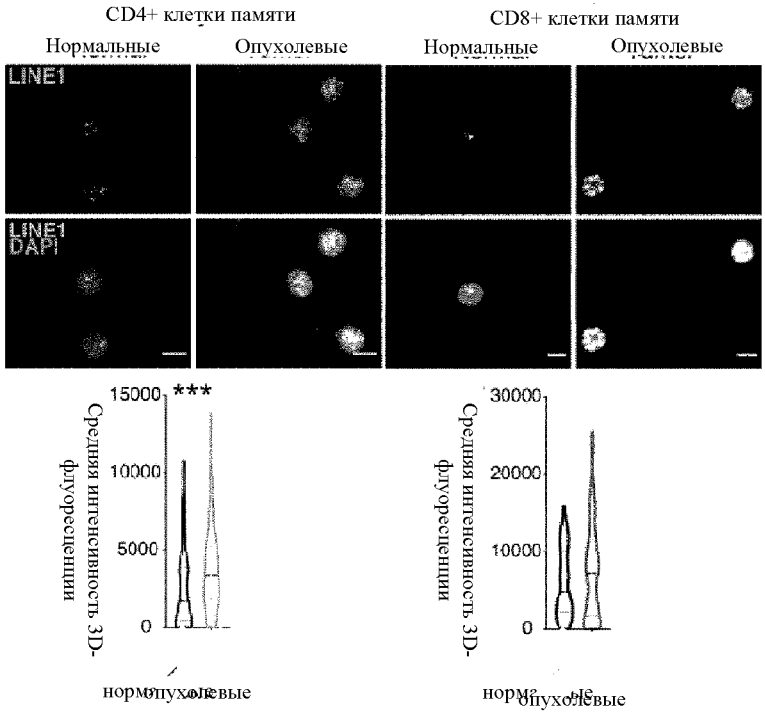
Фиг. 5 (1/2)



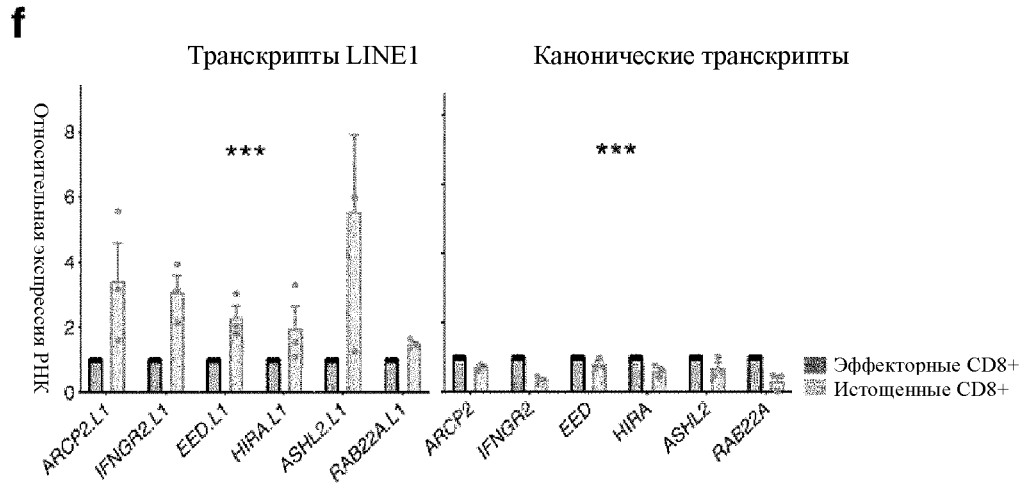
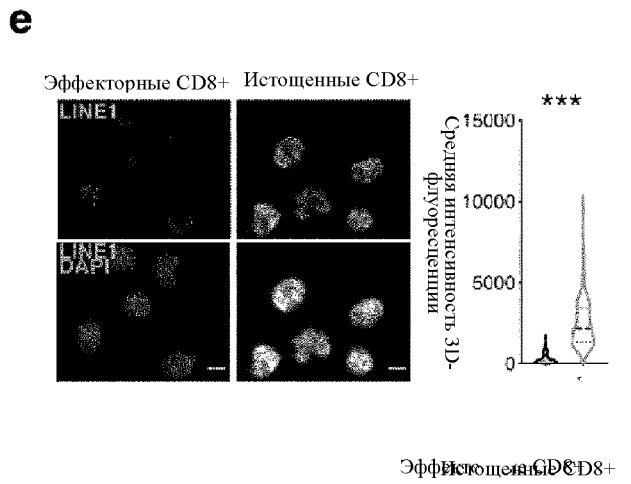
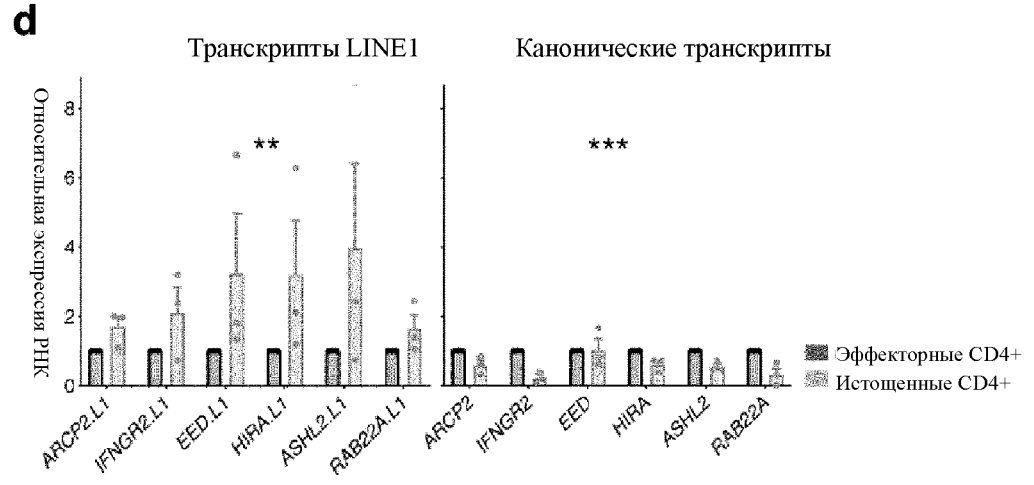
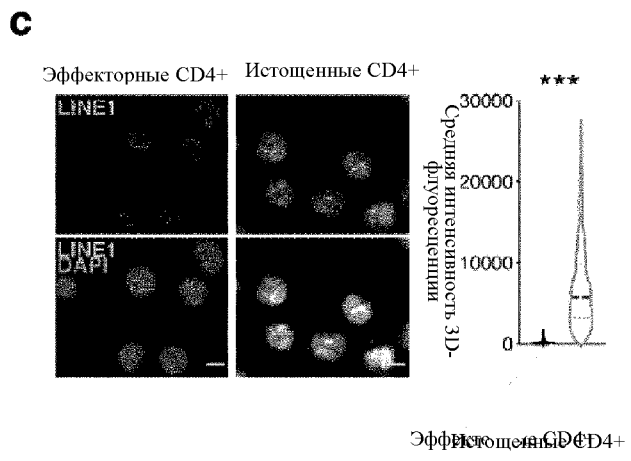
**a** Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), выделенные при колоректальном раке (CRC)



**b** Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), выделенные при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC)

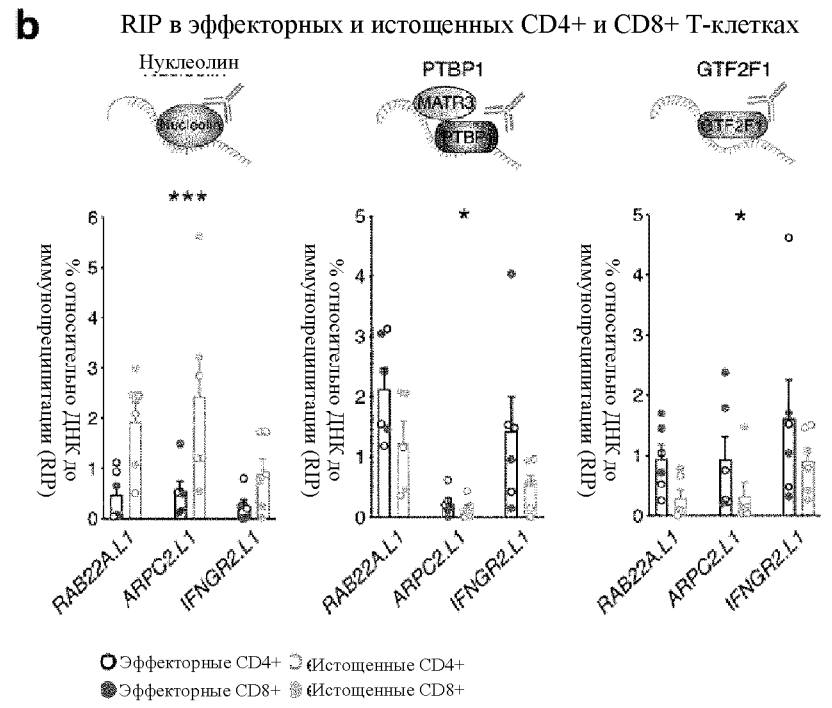
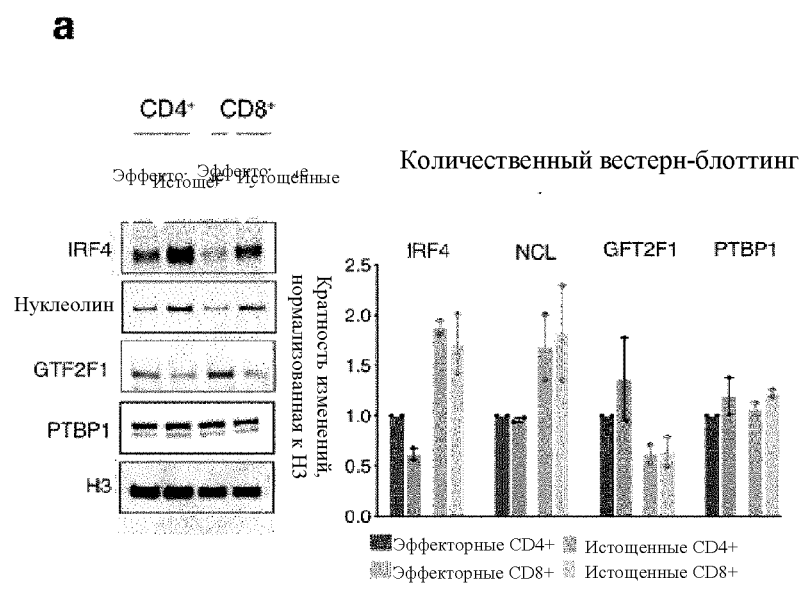


Фиг. 6 (1/2)



Фиг. 6 (2/2)

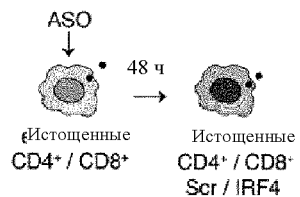




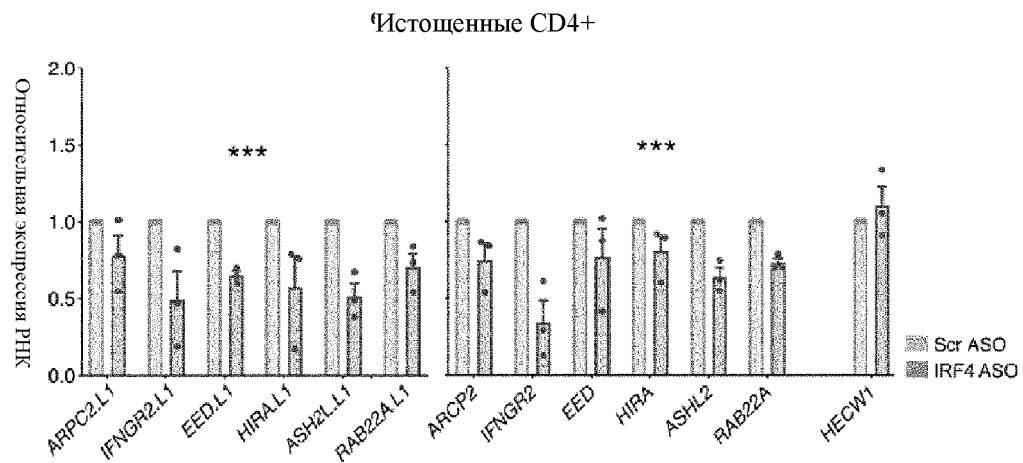
Фиг. 7 (1/2)

Фиг. 7 (2/2)

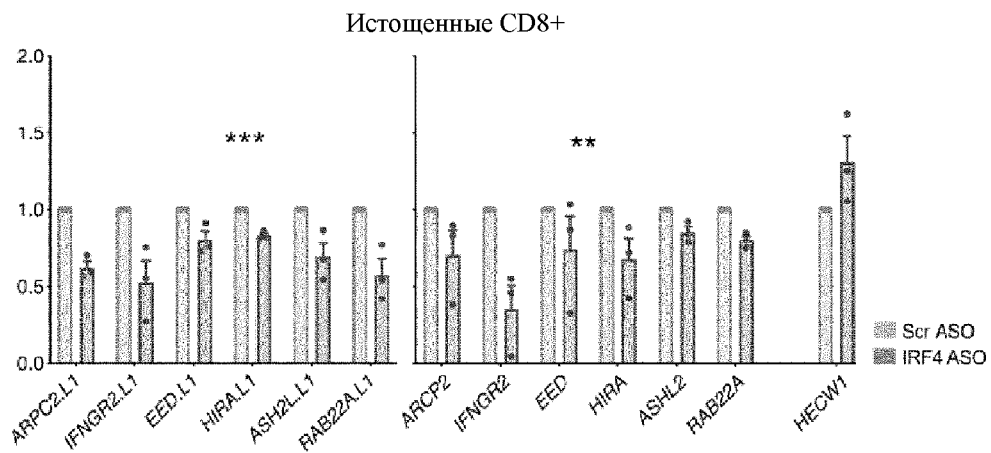
**с**



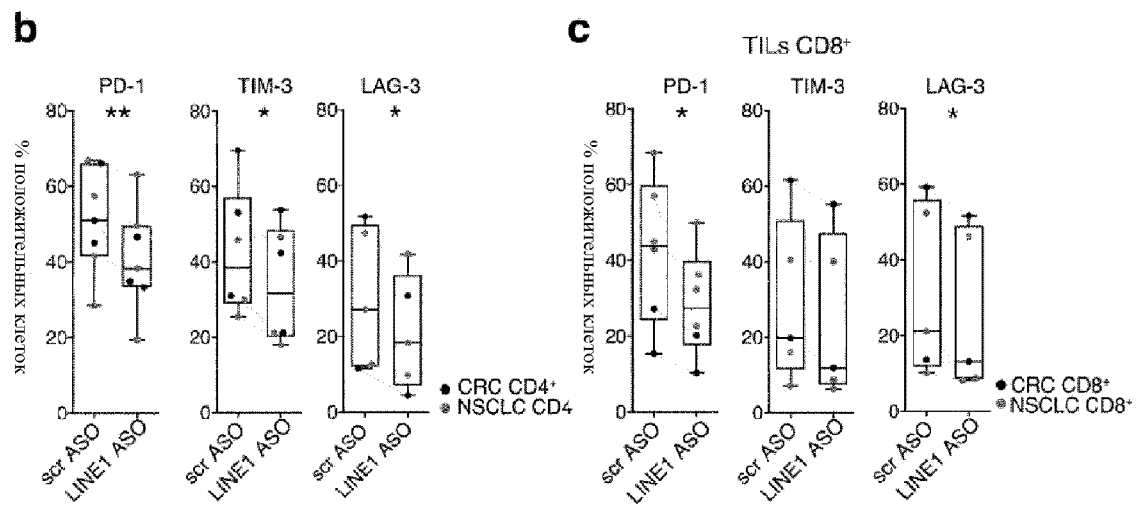
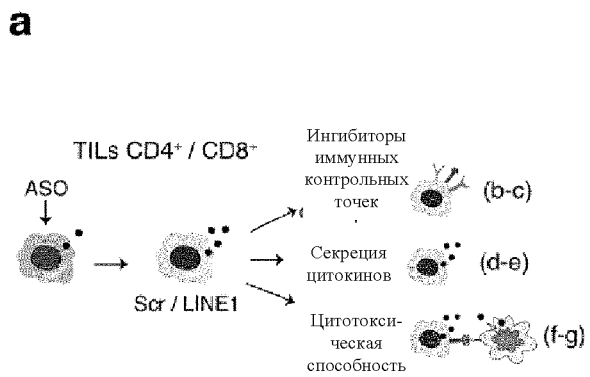
**д**



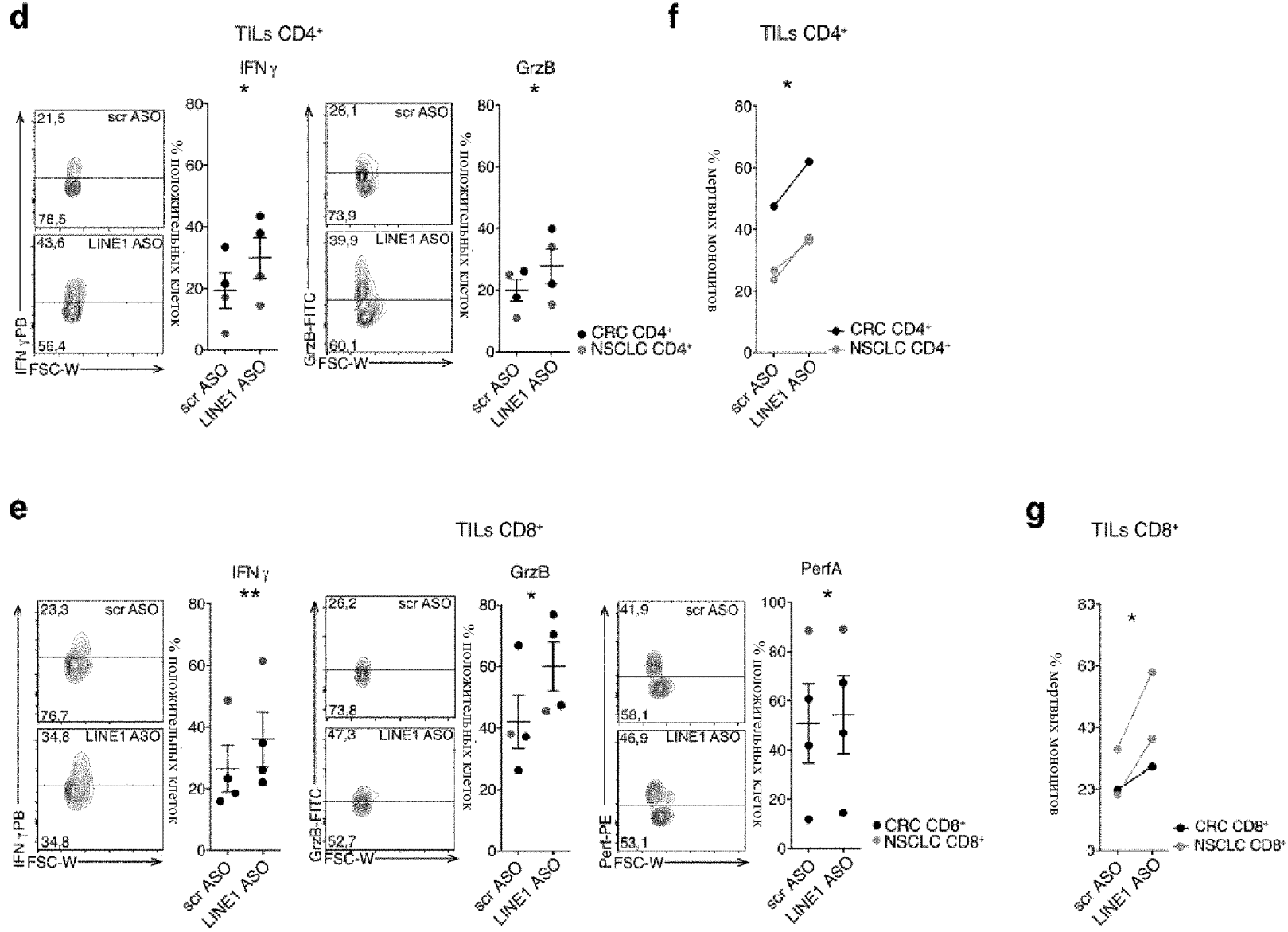
**е**

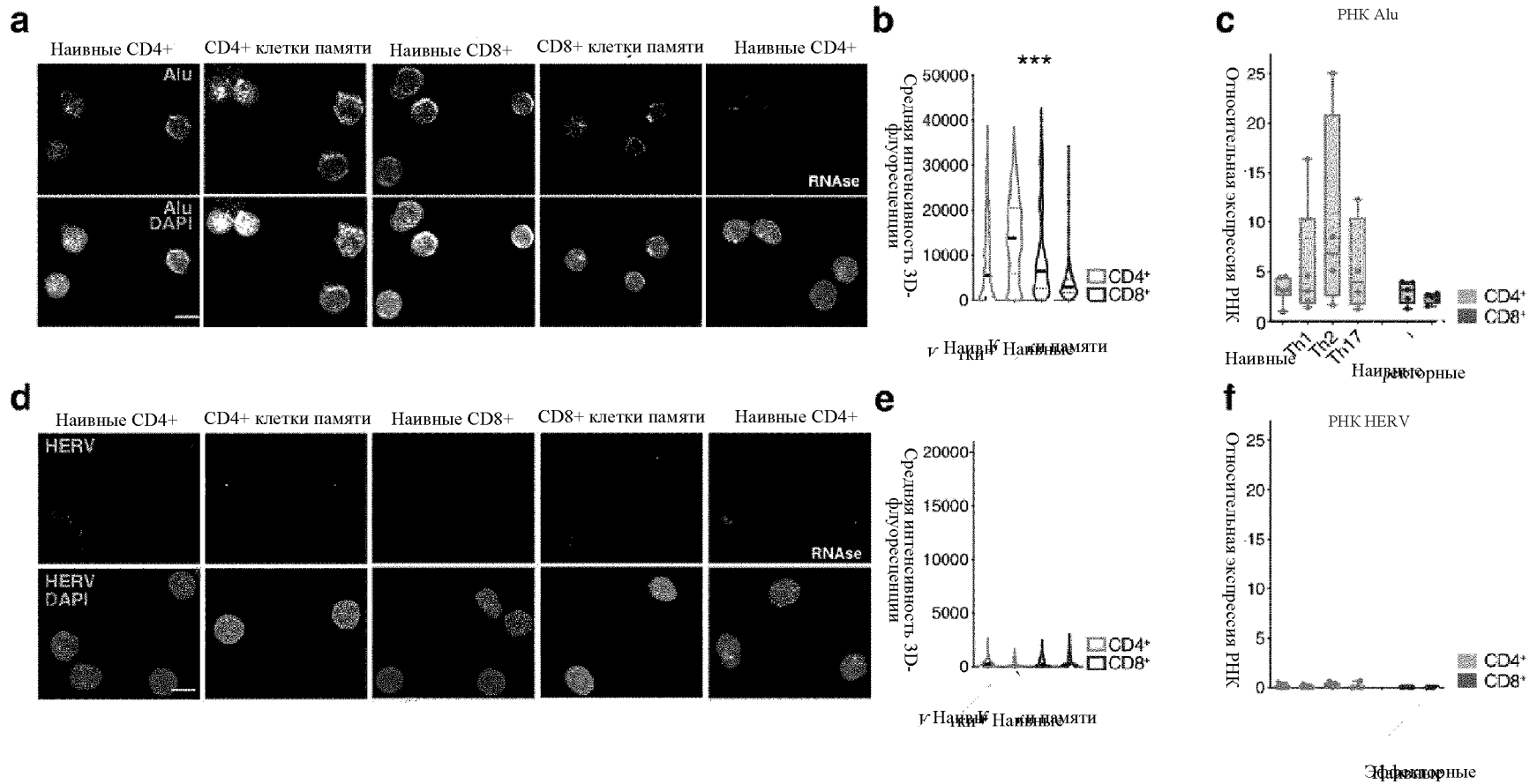


Фиг. 8 (1/2)



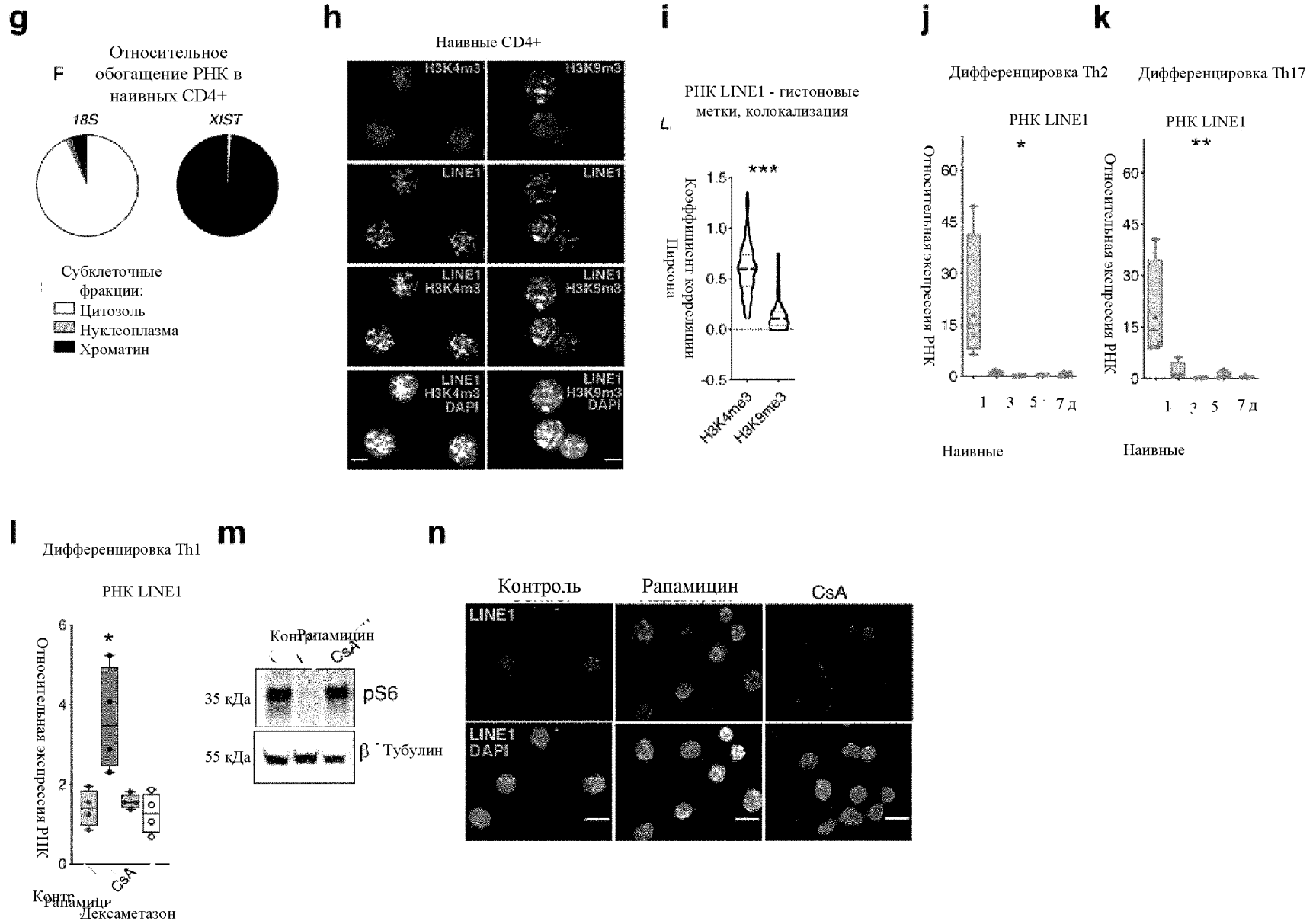
Фиг. 8 (2/2)





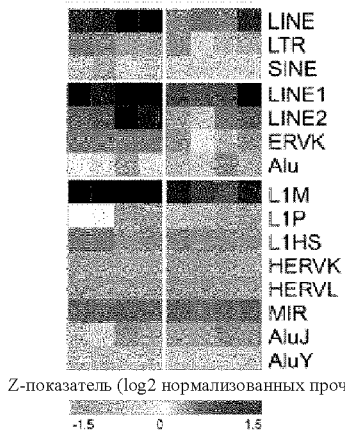
Фиг. 9 (1/2)

Фиг. 9 (2/2)

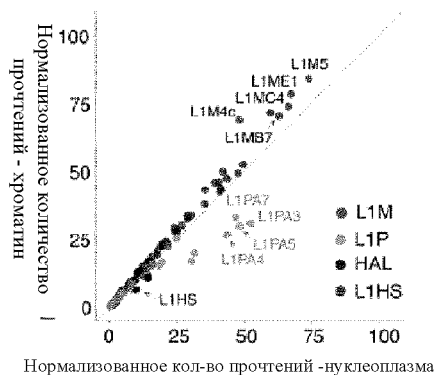


**a** Наивные CD4+ T-клетки

РНК : Хроматин Нуклеоплазма

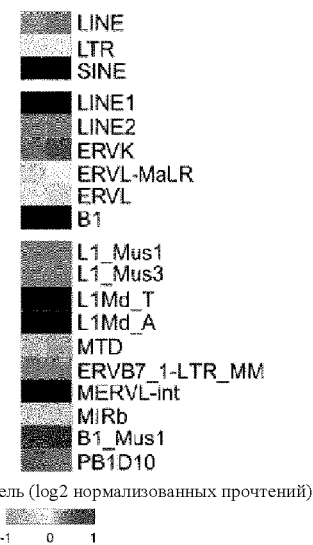


**b**



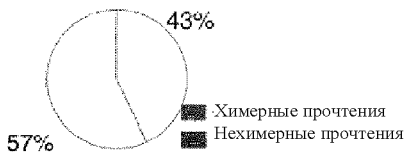
**c**

mESCs



**d**

Характеризация прочтений *Hs* LINE1



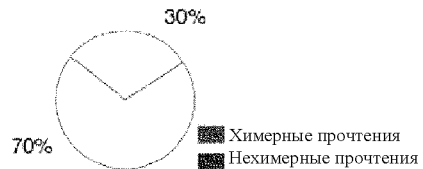
**e**

Геномное распределение *Hs* LINE1



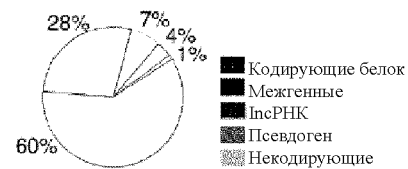
**f**

Характеризация прочтений *mM* LINE1

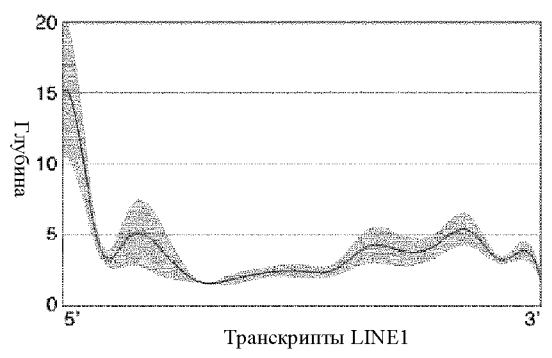


**g**

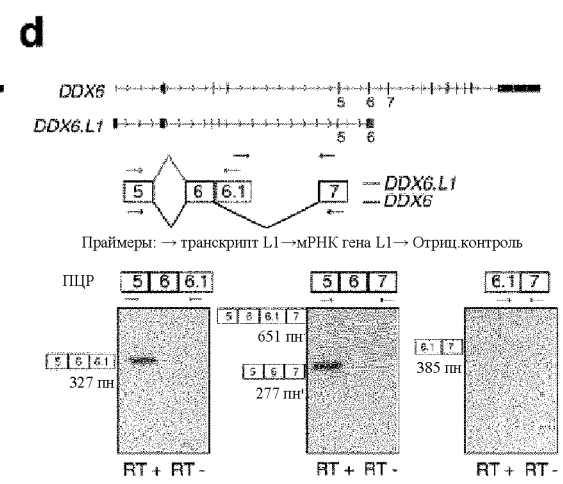
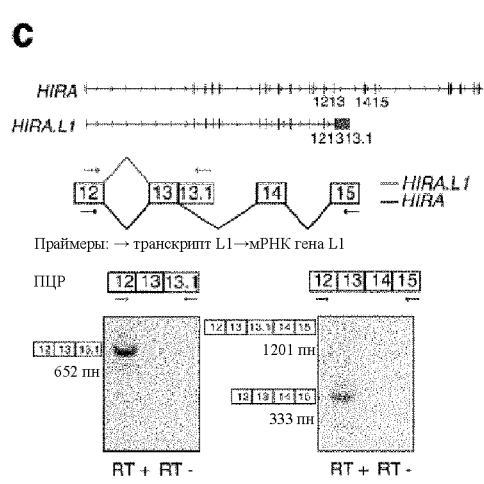
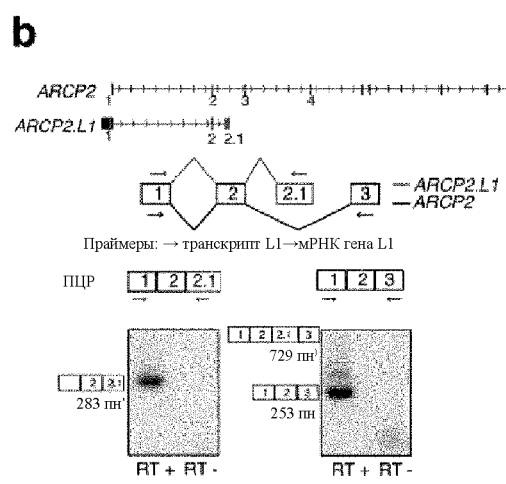
Геномное распределение *mM* LINE1



**a** Покрытие транскриптов LINE1 прочтениями Nanopore



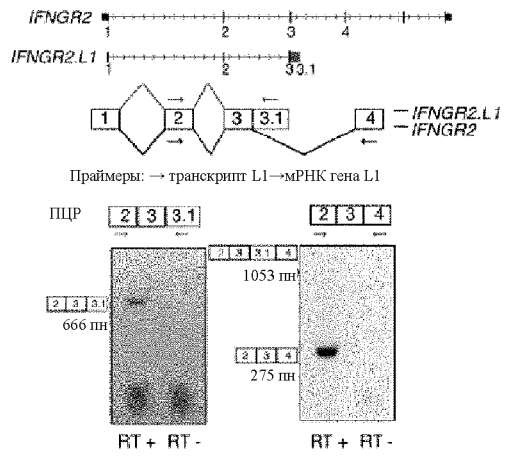
Фиг. 11 (1/2)



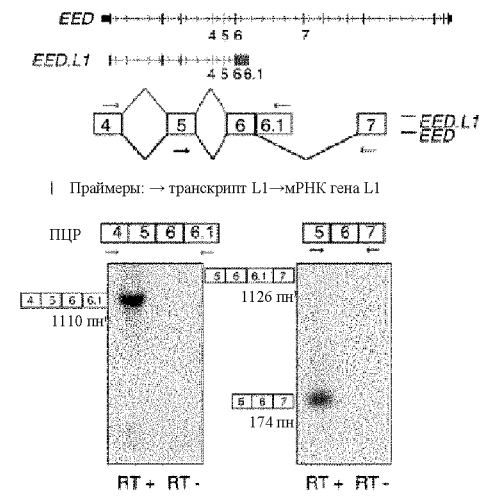
Фиг. 11 (1/2)



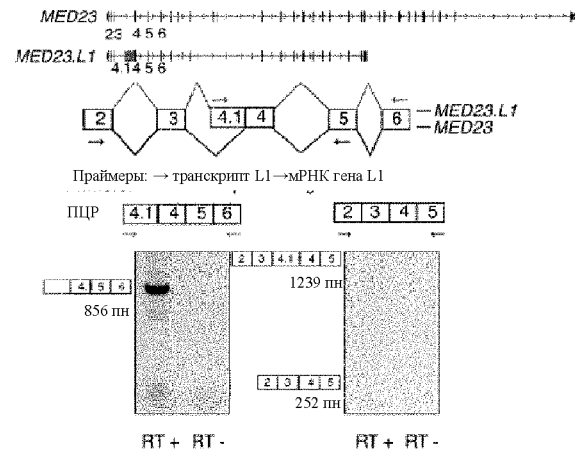
**e**



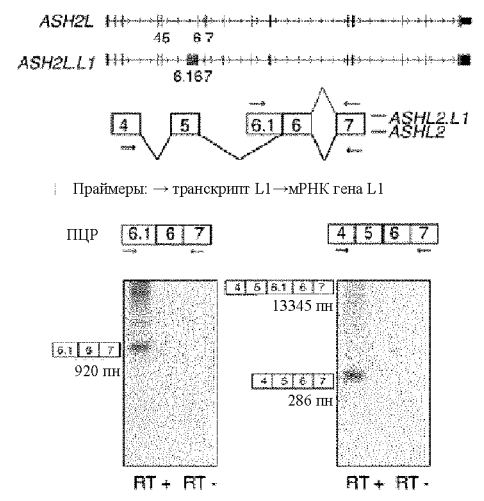
**h**



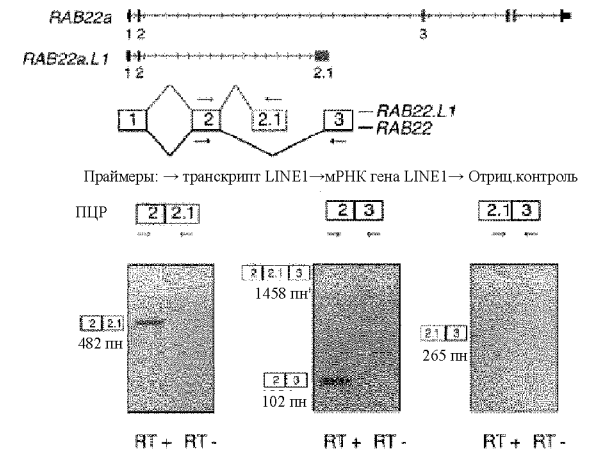
**f**



**i**

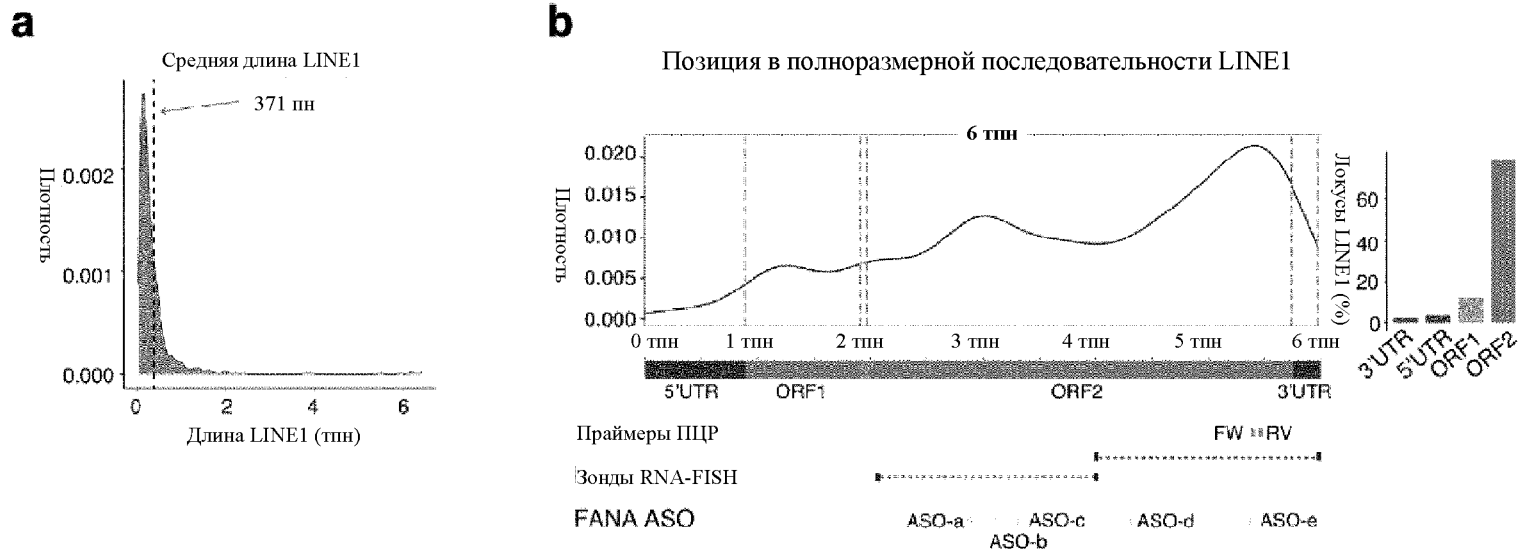


**g**



Фиг. 11 (2/2)

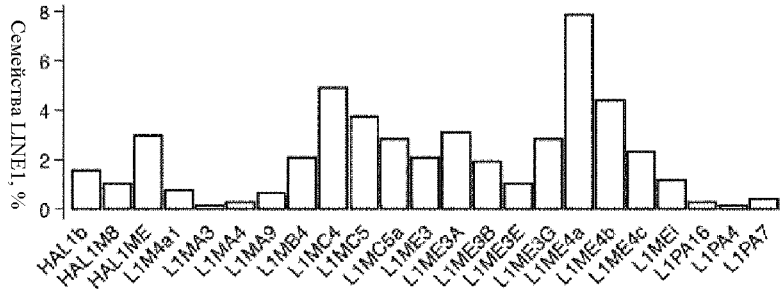
Фиг. 12 (1/2)



Фиг. 12 (2/2)

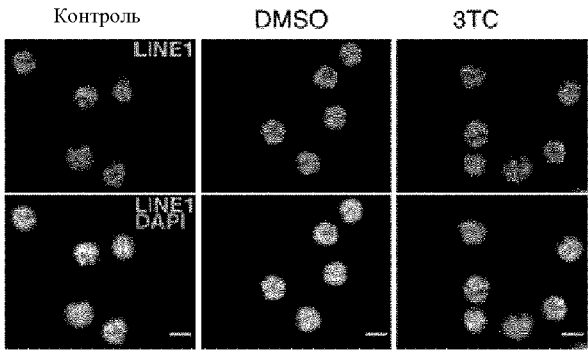
**c**

Обогащение подсемейств LINE1



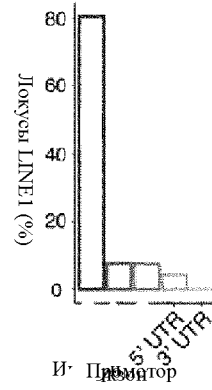
**f**

Наивные CD4+

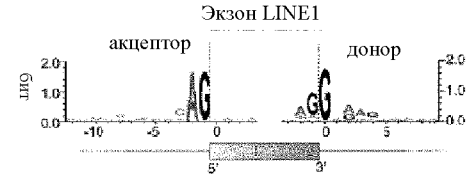


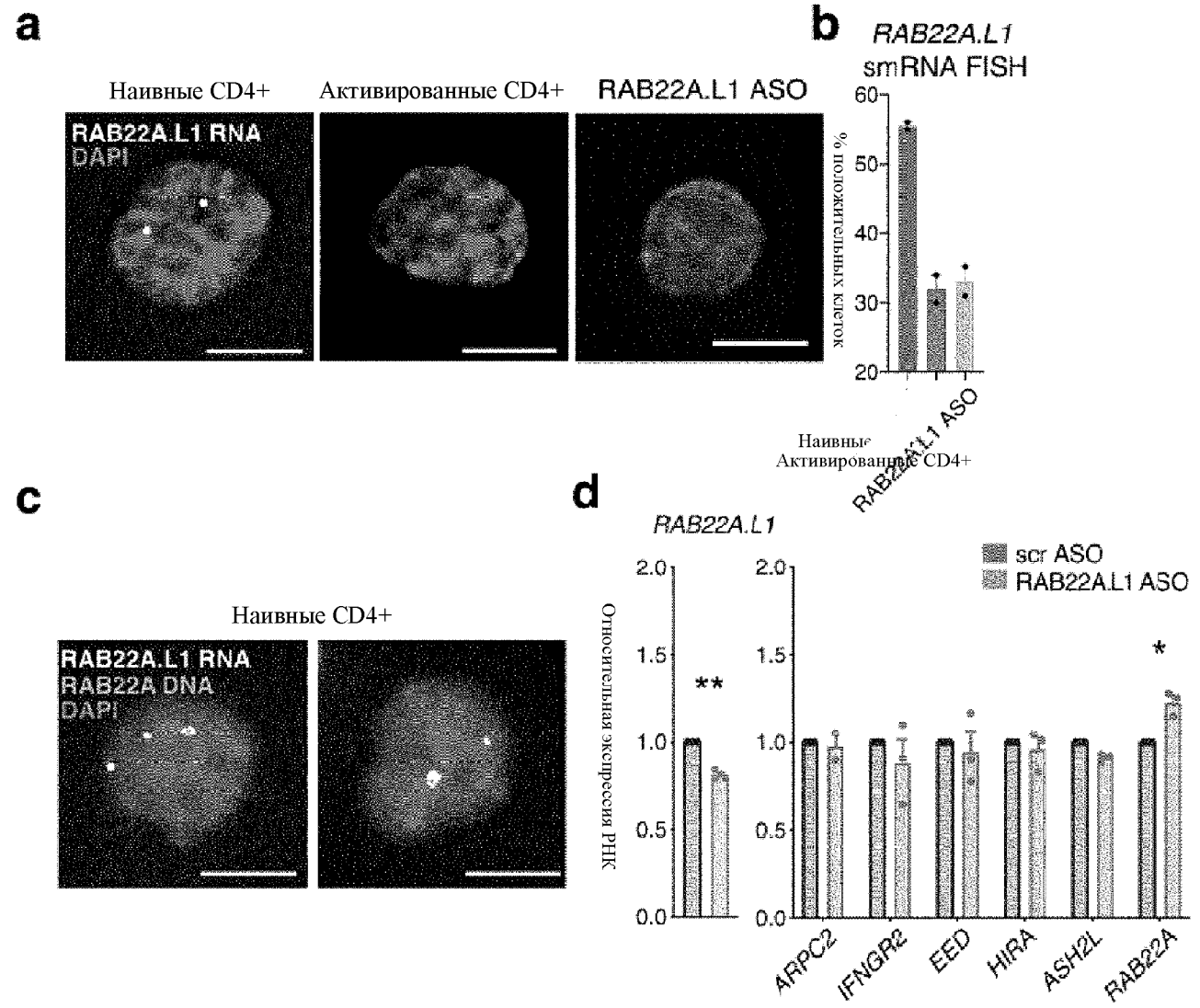
**d**

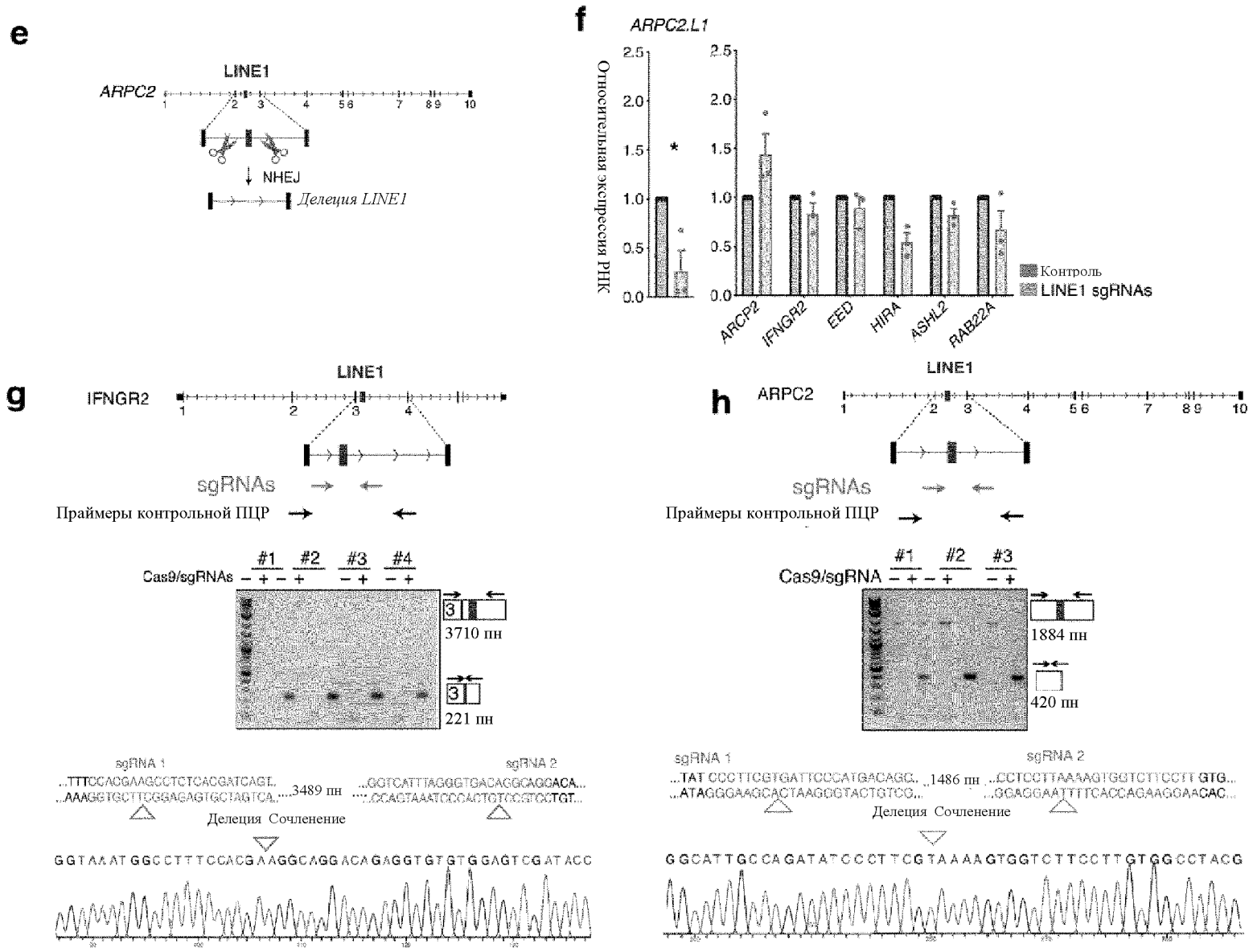
Распределение локусов LINE1 в генах

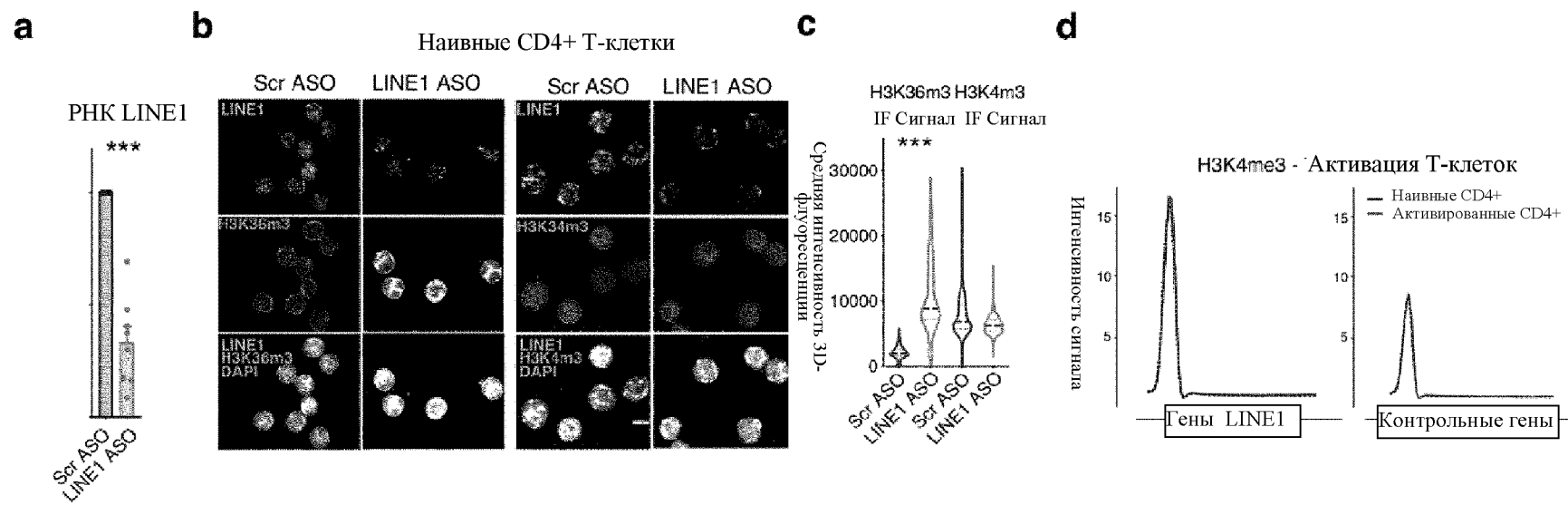


**e**

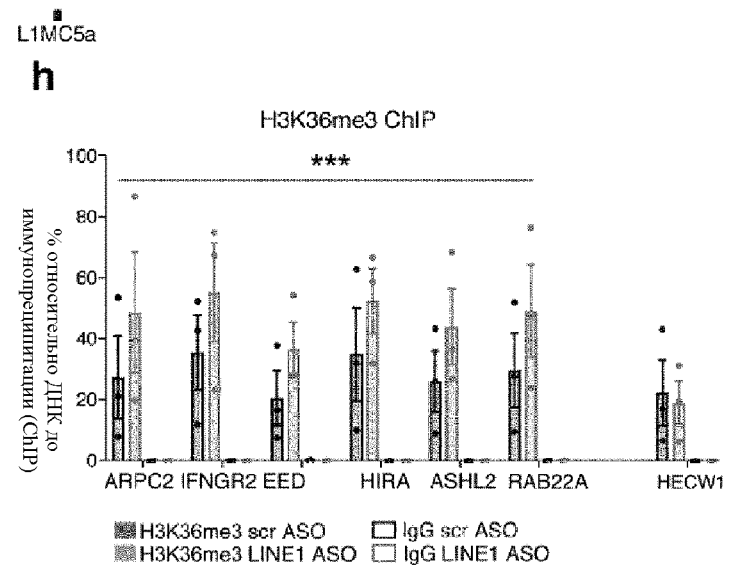
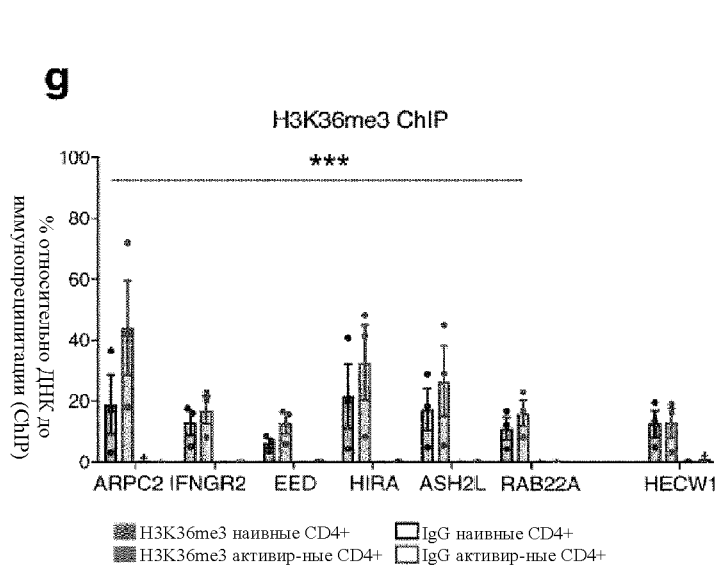
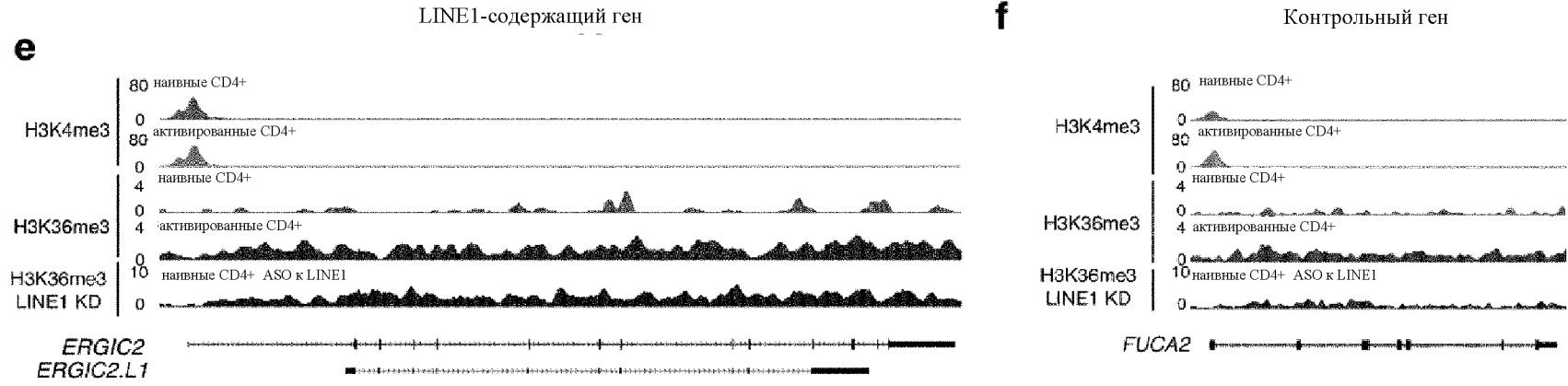




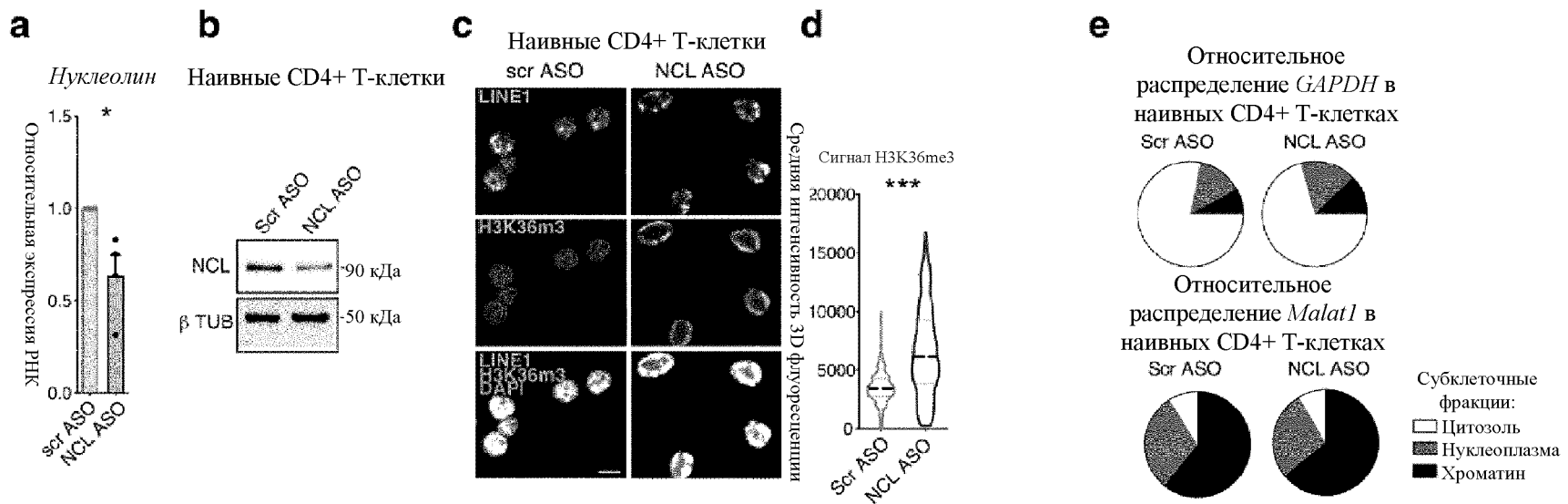




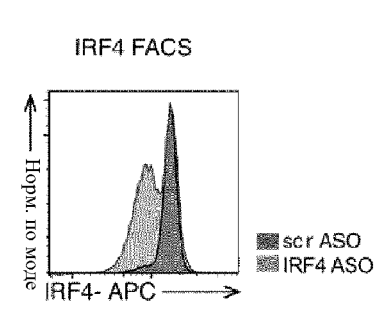
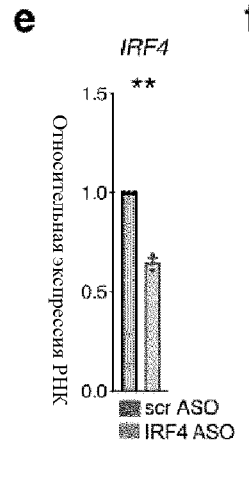
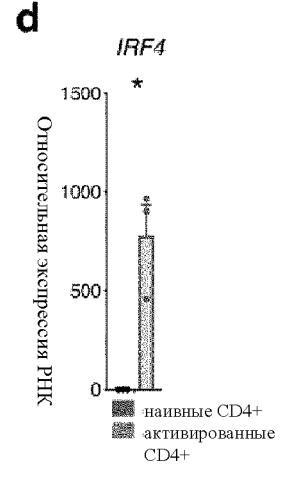
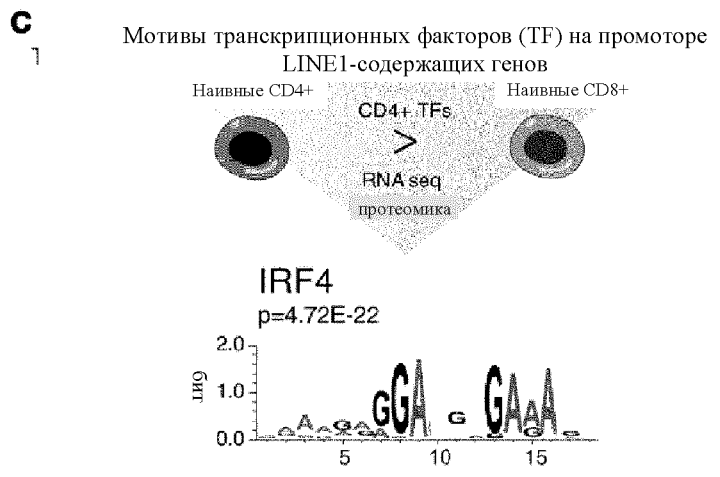
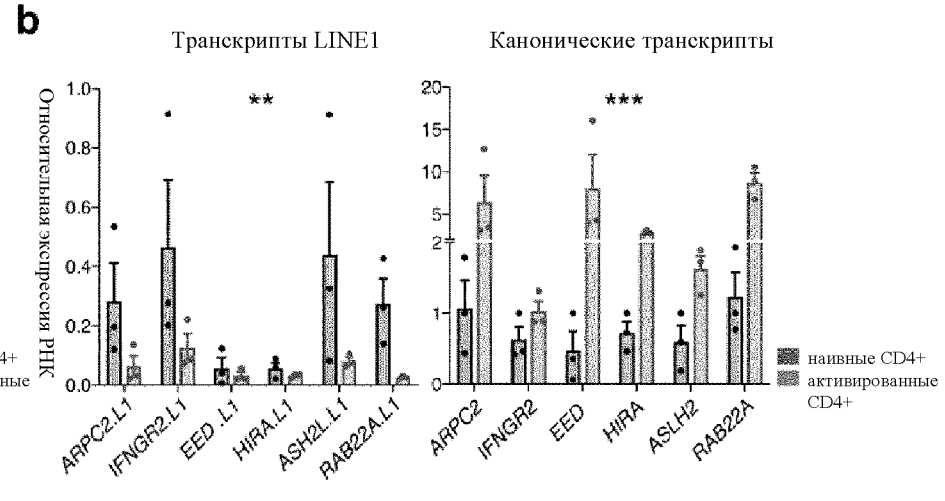
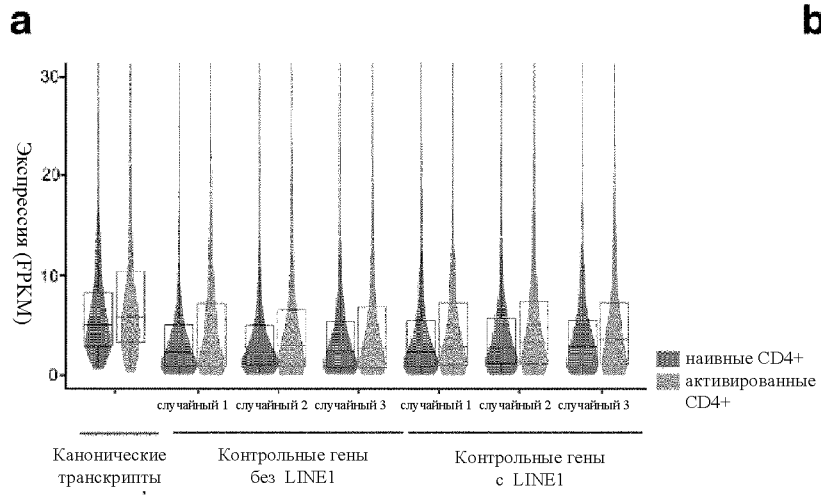
Фиг. 14 (1/2)



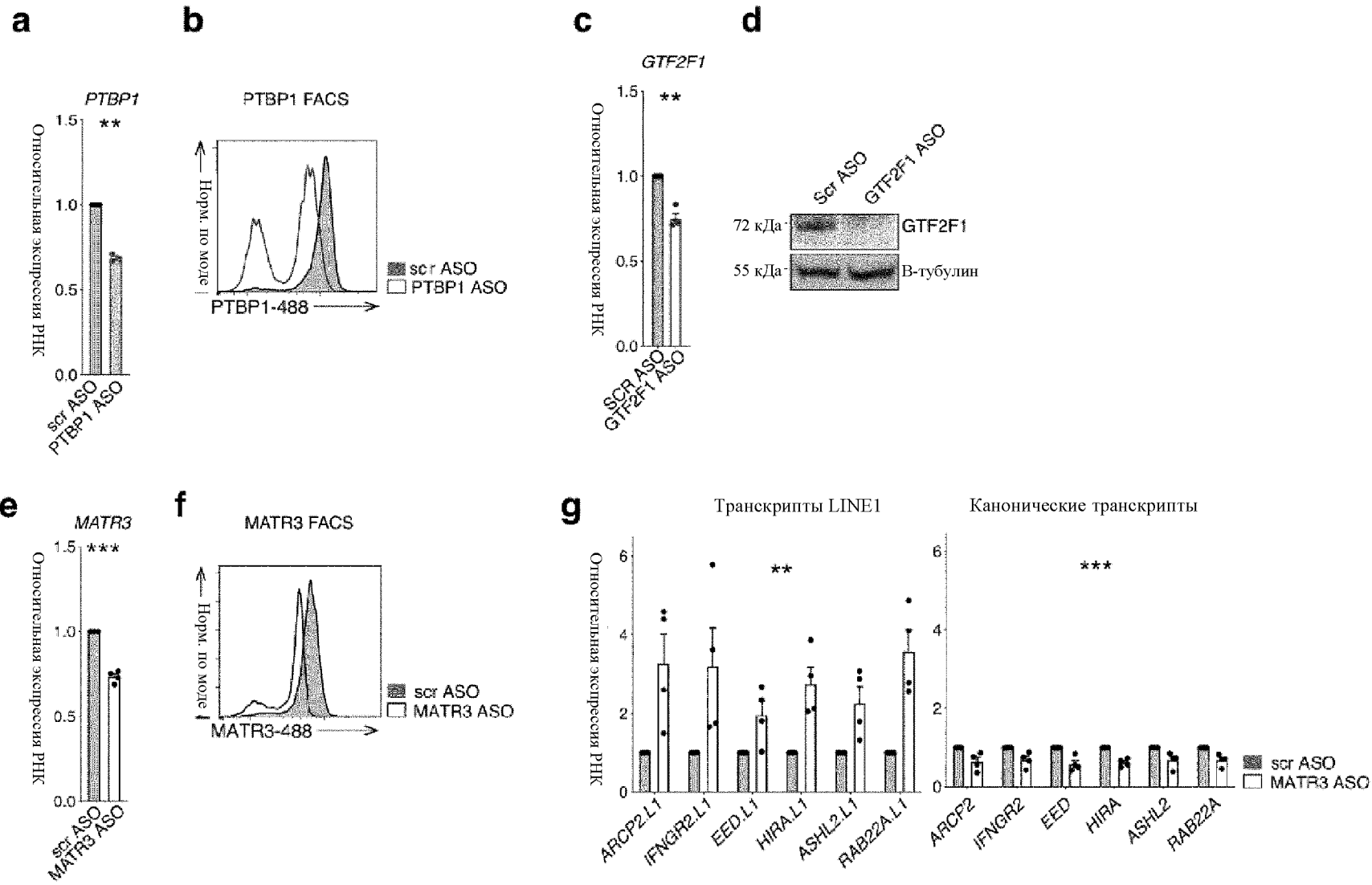
Фиг. 15

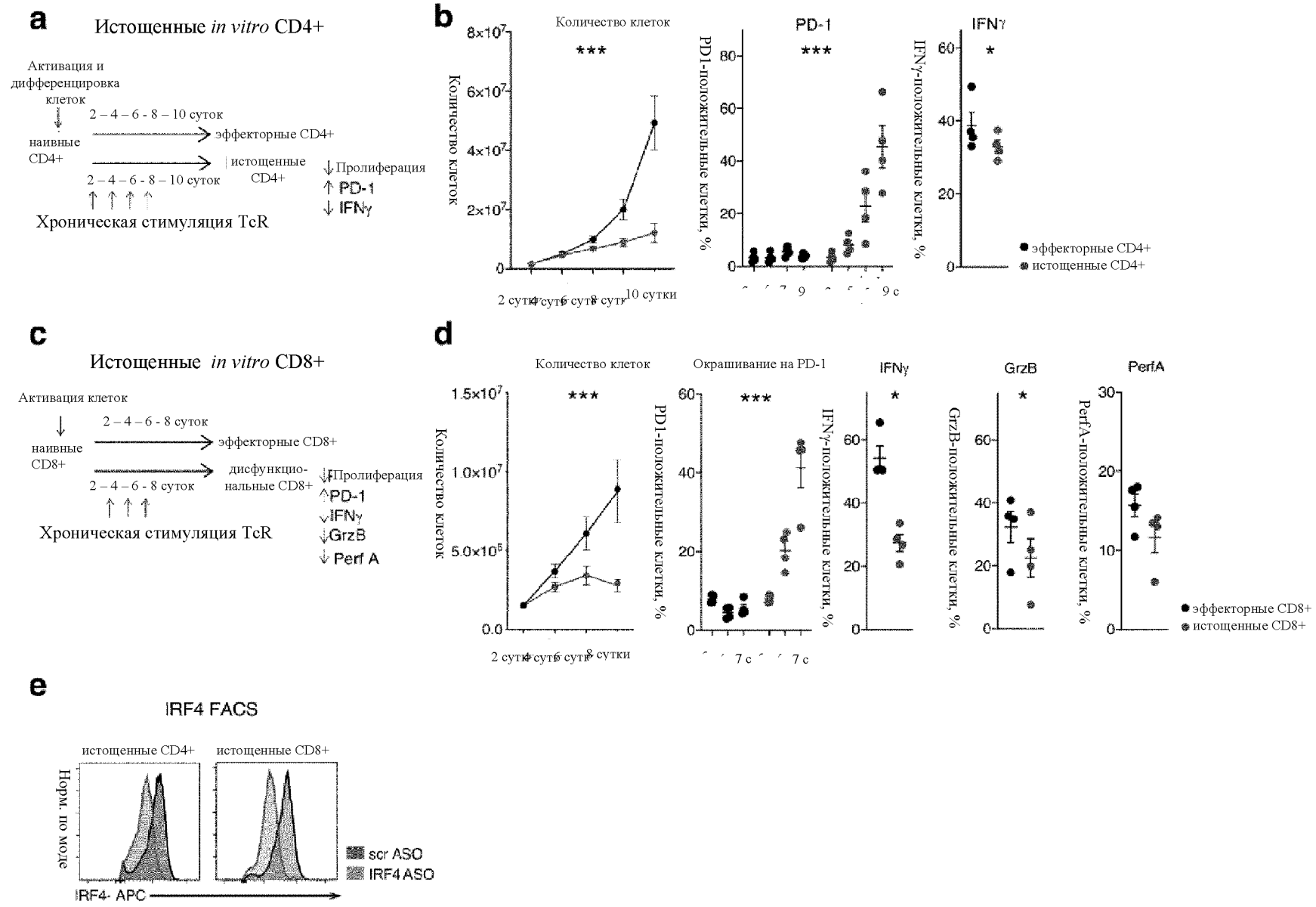






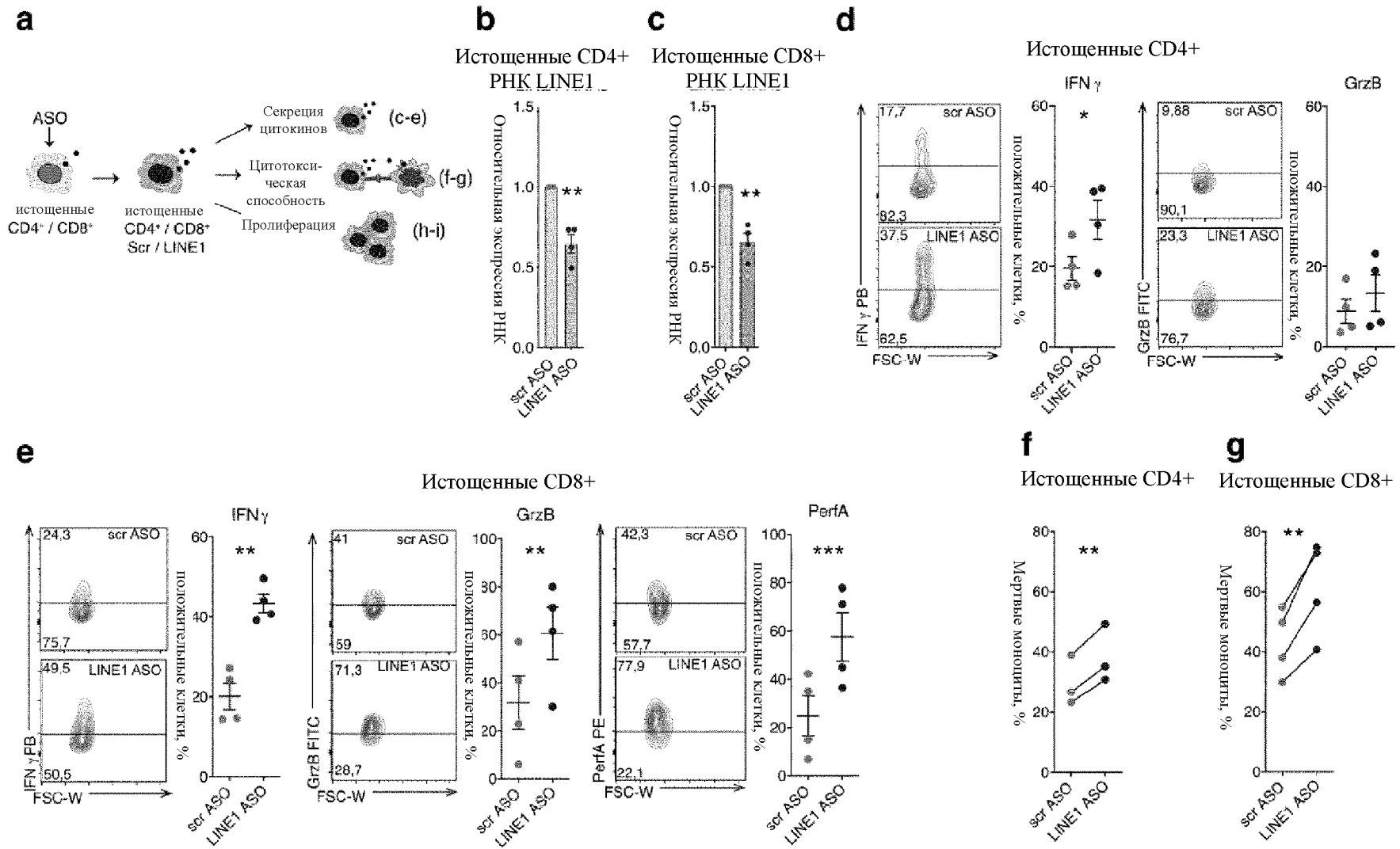
Фиг. 16





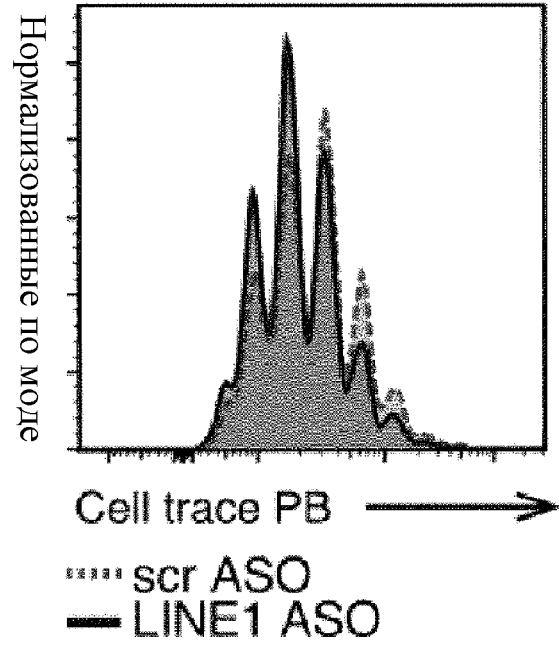
Фиг. 18

Фиг. 19 (1/2)



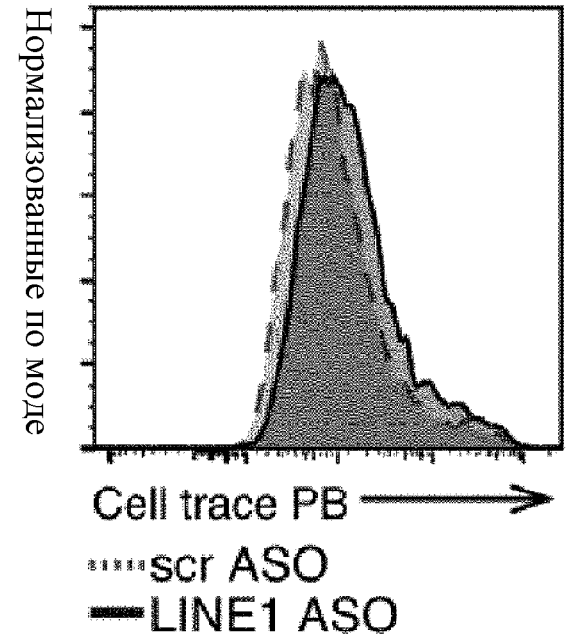
**h**

Истощенные CD4+



**i**

Истощенные CD8+



Фиг. 19 (2/2)