© Коллектив авторов, 2020

Терещенко В.П.¹, Булыгин А.С.¹, Заводский Р.Ю.², Куликова Е.В.¹,
Сенников С.В.^{1,3}

Получение дендритных клеток мышей *in vitro* с помощью Flt3-L и их характеристика

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630099, г. Новосибирск, Российская Федерация² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 630091, г. Новосибирск, Российская Федерация³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 630090, г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме

Введение. В настоящее время для модуляции адаптивного иммунного ответа с целью коррекции тех или иных заболеваний человека активно разрабатываются клеточные вакцины на основе миелоидных дендритных клеток (мДК). Однако об эффективности применения плазматоидных дендритных клеток (пДК) в тех же целях все еще мало данных.

Цель исследования – разработка протокола получения пДК мышей с помощью рекомбинантного Flt3-L *in vitro* и описание фенотипических и функциональных свойств полученных дендритных клеток (ДК) для решения вопроса о возможности их использования при создании клеточных вакцин.

Материал и методы. ДК получали путем культивирования клеток костного мозга мышей в присутствии Flt3-L. Относительное количество и фенотип ДК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, а морфологию ДК – с помощью флуоресцентной микроскопии. Функциональные свойства ДК изучали по их способности индуцировать Трег-клетки и пролиферацию CD4⁺-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов. Экспрессию рецептора хемоаттрактанта CCR9 на ДК оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Показано, что с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно *in vitro* получение культур ДК с относительно высоким содержанием B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в полученных культурах отличались морфологией и степенью зрелости. В смешанной культуре лимфоцитов полученные *in vitro* ДК, обладали свойствами незрелых ДК, что проявлялось в их способности генерировать повышенное количество Трег и вызывать сниженную пролиферацию CD4⁺-лимфоцитов. При стимуляции полученных ДК с помощью CpG ДНК наблюдалось их созревание, и снижение способности к индукции Трег и увеличение способности к индукции пролиферации CD4⁺-лимфоцитов, т. е. приобретение иммуногенной функции. Относительно небольшое количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК несли на поверхности рецептор хемоаттрактанта CCR9, однако количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих CCR9 внутриклеточно, стремилось к 100 %.

Заключение. Таким образом, с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно *in vitro* получение культур B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, пригодных к применению при разработке клеточных вакцин для подавления нежелательного адаптивного иммунного ответа и для индукции желательного.

Ключевые слова: Flt3-L; плазматоидные дендритные клетки; миелоидные дендритные клетки; CCR9

Статья поступила 03.03.2020. Принята в печать 16.04.2020.

Для цитирования: Терещенко В.П., Булыгин А.С., Заводский Р.Ю., Куликова Е.В., Сенников С.В. Получение дендритных клеток мышей *in vitro* с помощью Flt3-L и их характеристика. Иммунология. 2020; 41 (3): 215–226. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-215-226

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00086).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Сенников Сергей Витальевич –
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
молекулярной иммунологии
ФГБНУ НИИФКИ
Минобрнауки России, Новосибирск,
Российская Федерация
E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Tereshchenko V.P.¹, Bulygin A.S.¹, Zavodskii R.Yu.², Kulikova E.V.¹,
Sennikov S.V.^{1,3}

Generation of murine dendritic cells *in vitro* using Flt3-L and their characteristics

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Ministry of Science and High Education of Russian Federation, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, 630091, Novosibirsk, Russian Federation

³ Novosibirsk State University, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract

Introduction. Currently, cell vaccines based on myeloid dendritic cells (mDCs) are being actively developed to modulate an adaptive immune response in order to correct certain human diseases. However, there is still little data on the effectiveness of the use of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) for the same purposes.

Aim of the study. Development of the protocol for *in vitro* generation of mice pDCs using recombinant Flt3-L and description of the phenotypic and functional properties of the obtained dendritic cells (DCs) to address the possibility of their use in the development of cell vaccines.

Material and methods. DCs were generated from mouse bone marrow cells using Flt3-L. Frequency and phenotype of the DCs were assessed by flow cytometry. DC's morphology was assessed using fluorescent microscopy. Treg frequency and CD4⁺-lymphocytes proliferation induced by DCs were assessed in mixed lymphocyte culture. The expression of CCR9 on DCs was assessed using flow cytometry.

Results. It was shown that the use of Flt3-L provides *in vitro* generation of bone marrow-derived cultures with a relatively high content of B220⁺CD11c⁺-pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs. The B220⁺CD11c⁺-pDCs and the Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs obtained differed in morphology and degree of maturity. In a mixed lymphocytes culture, the dendritic cells were able to generate an increased amount of Treg and cause a reduced proliferation of CD4⁺-lymphocytes, thus manifesting an immature phenotype. Further maturation of the DCs via CpG DNA stimulation led to an increased immunogenicity, according the Treg reduction and enhanced CD4⁺-lymphocytes proliferation in mixed lymphocytes culture. We found that a relatively small number of B220⁺CD11c⁺-pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs carried the CCR9 chemotaxis receptor on their surface, however, the number of B220⁺CD11c⁺-pDCs and the Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs carrying intracellular CCR9 tended to 100 %. Thus, the use of Flt3-L provides the opportunity of *in vitro* generation of B220⁺CD11c⁺ pDCs and Sirpα⁺CD11c⁺-mDCs that can be useful in the field of cell vaccine development to direct an adaptive immune response decreasing undesirable immune reactions or increasing desirable.

Keywords: Flt3-L; plasmacytoid dendritic cells; myeloid dendritic cells; CCR9

Received 03.03.2020. Accepted 16.04.2020.

For citation: Tereshchenko V.P., Bulygin A.S., Zavodskii R.Yu., Kulikova E.V., Sennikov S.V. Generation of murine dendritic cells *in vitro* using Flt3-L and their characteristics. Immunologiya. 2019; 41(3): 215–26. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-215-226 (in Russian)

Funding. The research was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project no.16-15-00086).

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

В настоящее время для коррекции тех или иных заболеваний человека активно разрабатываются подходы к модуляции адаптивного иммунного ответа с помощью дендритных клеток (ДК). Так, ДК предложено использовать для индукции противоопухолевого иммунного ответа [1, 2], подавления патологического иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях [3–5] и супрессии

трансплантационных реакций, таких как реакция отторжения [6] и реакция «трансплантат против хозяина» [7].

Однако для всех этих целей применяют миелоидные ДК (мДК), полученные из моноцитов периферической крови человека или костного мозга мышей с помощью ГМ-КСФ. При этом свойства и эффективность плазмациитоидных ДК (пДК) в тех же моделях остаются малоизученными.

For correspondence

Sergey V. Sennikov –
MD, PhD, Professor,
Head of Laboratory
of molecular immunology
RIFCI, Novosibirsk,
Russian Federation

E-mail: sennikovsv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Применение пДК может быть особенно целесообразно при необходимости индукции иммунной толерантности, т. е. подавления нежелательного иммунного ответа, поскольку показано активное участие незрелых B220⁺CD11c⁺-пДК в негативной селекции тимоцитов и поддержании центральной иммунной толерантности. Так, незрелые B220⁺CD11c⁺-пДК захватывают в периферических тканях собственные антигены и под действием сигналов рецептора хемотаксиса CCR9 мигрируют в тимус, где, представляя захваченные антигены развивающимся тимоцитам, обеспечивают процесс негативной селекции и поддержание центральной иммунной толерантности к собственным антигенам [8].

B220⁺CD11c⁺-пДК могут быть получены с помощью Flt3-L – фактора роста ДК. *In vivo* получение пДК осуществляется с помощью введения лабораторным животным клеточной линии, экспрессирующей Flt3-L, и последующего выделения B220⁺CD11c⁺-пДК из лимфоидных органов животного [9–12]. Данный метод позволяет генерировать *in vivo* незрелые пДК с фенотипом, не отличающимся от фенотипа пДК, полученных в физиологических условиях [9]. Однако в результате данного способа получают относительно небольшие количества B220⁺CD11c⁺-пДК (около 15 % от всех CD11c⁺-ДК, при-

сутствующих в лимфоидных органах [11]), чего может быть недостаточно для реализации клеточных технологий модуляции иммунного ответа. Более того, данный способ – введение реципиенту Flt3-L-продуцирующих клеточных линий – не может быть применен для человека при трансляции подобных технологий в клиническую практику.

Альтернативой является генерация B220⁺CD11c⁺-пДК с помощью рекомбинантного Flt3-L *in vitro*. Так, B220⁺CD11c⁺-пДК получают при культивировании отсортированных предшественников ДК [13, 14] или костного мозга мышей [15, 16] в присутствии различных доз рекомбинантного Flt3-L. Однако функциональные и фенотипические свойства генерируемых *in vitro* B220⁺CD11c⁺-пДК, а также экспрессия ими CCR9, отражающая способность клеток мигрировать к источнику его лиганда CCL25 (например, в тимус) [9, 17], слабо охарактеризованы.

Таким образом, для решения вопроса о возможности использования B220⁺CD11c⁺-пДК, индуцированных *in vitro* с помощью рекомбинантного Flt3-L, для модуляции иммунного ответа требуется отработать протокол получения достаточного количества ДК и охарактеризовать фенотипические и функциональные свойства получаемых ДК, что и стало целью данного исследования.

Рис. 1. Культуры дендритных клеток (ДК) на 5, 7 или 9-е сутки, полученные с помощью 100 или 200 нг/мл Flt3-L

А – абсолютное количество получаемых клеток при посадке 10⁶ клеток костного мозга (КМ); Б – относительное количество полученных CD11c⁺-ДК в культуре; В – относительное количество полученных B220⁺CD11c⁺-пДК в культуре; Г – относительное количество полученных Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в культуре; n = 6. Здесь и на рис. 4, 5 скобками указаны статистически значимые отличия (двухфакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки, p ≤ 0,05).

Рис. 2. Содержание B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в костном мозге мышей и культурах дендритных клеток (ДК), полученных с помощью Flt3-L за 7 сут

A – относительные количества ДК в костном мозге (0d) и культурах, полученных с помощью Flt3-L за 7 сут, $n = 6$. Скобками указаны достоверные отличия (t -тест, $p \leq 0,05$); *B* – пример цитофлуориметрии ДК костного мозга; *B* – пример цитофлуориметрии ДК, полученных с помощью Flt3-L к 7-м суткам.

Материал и методы

Лабораторные животные. В исследовании использовали самцов мышей C57BL/6 и BALB/c в возрасте 2–6 мес. Мышей содержали в виварии ФГБНУ НИИФКИ Минобрнауки России в условиях естественного освещения и неограниченного доступа к еде и воде.

Получение культур дендритных клеток. Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей мышей C57BL/6 промыванием костномозгового канала фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Далее клетки центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640. Клетки высаживали в 24-луночный планшет (TPP, Швейцария) по 1×10^6 клеток на лунку в 1 мл полной среды RPMI-1640. В лунки добавляли Flt3-L (R&D systems, США) в концентрации 100 нг/мл или 200 нг/мл. Половину среды с фактором роста меняли каждые 2–3 сут. Культуры снимали на 5, 7

и 9-е сутки для цитометрического анализа. В экспериментах по анализу фенотипа ДК после созревания, а также в экспериментах смешанной культуры лимфоцитов на последние сутки культивирования к дендритным клеткам добавляли 2 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) O55:B5 (Sigma, США) или 6 мкг/мл CpG ODN 1826 ДНК (Invivogen, США).

Смешанная культура лимфоцитов. Смешанную культуру лимфоцитов получали путем сокультивирования ДК мышей C57BL/6 с CD4⁺-лимфоцитами мышей BALB/c. ДК мышей C57BL/6 получали с помощью культивирования клеток костного мозга в течение 7 сут в присутствии 100 нг/мл Flt3-L с или без добавления ЛПС или CpG ДНК на последние сутки культивирования. CD4⁺-лимфоциты мышей BALB/c получали путем магнитной сортировки спленоцитов мышей BALB/c с помощью коммерческого набора CD4 MicroBeads mouse (Miltenyi Biotec, США). Чистота сортировки составляла 98–99 %. Половину полученных CD4⁺-

лимфоцитов метили витальным красителем CFSE путем инкубирования 10–12 млн клеток в 1 мл ФСБ с 5,6 мкг CFSE в течение 10–15 мин с последующей 2-кратной отмывкой в ФСБ с 50 % FCS. ДК мышей C57Bl/6 со-культивировали с CD4⁺-лимфоцитами мышей BALB/c в соотношении 1:10 в течении 5 сут со сменой ½ объема среды на 3-и сутки культивирования. Через 5 сут сокультивирования в полученных культурах методом проточной цитометрии оценивали относительное количество CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и уровень пролиферации CFSE-меченых CD4⁺-лимфоцитов.

Цитометрия. Для цитометрического анализа культуры ДК снимали на 5, 7, 9-е сутки культивирования и разводили в концентрации 0,5 млн клеток на 100 мкл полной среды RPMI-1640. Клеточные суспензии метили антителами, конъюгированными с флуорохромами: CD11c – Pe/Cy7; B220 – BV510, Sirpα – PercP/Cy5.5; PDCA-1 – BV421; CCR9 – PE; I-A(b) – APC; CD83 – FITC; CD86 – APC/Cy7 (Biolegend, США), 20 мин в темноте при комнатной температуре. Внутриклеточное мечение CCR9 проводили с помощью антитела антиCCR9-PE (Biolegend, США) и коммерческого набора для фиксации и пермеабиллизации True-Nuclear™ Transcription Factor Staining (Biolegend, США) согласно инструкции производителя. Меченые суспензии клеток отмывали однократно в 2 мл ФСБ с NaN₃ и анализировали на проточном цитометре BD FACSVerse (BD, США).

Для оценки относительного количества FoxP3⁺-Трег-клеток в смешанной культуре лимфоцитов 0,5 млн клеток полученных культур разводили в 100 мкл полной среды RPMI-1640 и метили антителами к поверхностным антигенам CD3 – BV421, CD4 – PerCP, CD25 – FITC (Biolegend, США). Мечение внутриядерного транскрипционного фактора FoxP3 проводили с помощью антитела анти-FoxP3-PE (Biolegend, США) и коммерческого набора для фиксации и пермеабиллизации True-Nuclear™ Transcription Factor Staining (Biolegend, США), согласно инструкции производителя.

Пролиферацию в смешанной культуре лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии по уменьшению флуоресценции CFSE в делящихся клетках.

Флуоресцентная микроскопия. Для флуоресцентной микроскопии культуры ДК снимали и метили антителами анти-B220-BV510, анти-Sirpα-PercP/Cy5.5 (Biolegend, США) 20 мин в темноте. Далее клетки отмывали в растворе ФСБ и высаживали в 24-луночные пластиковые планшеты (TPP, Швейцария). Через 4 ч выполняли флуоресцентную микроскопию на аппарате InCell Analyzer 6000 (GE, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Prism 7.0 (GraphPad Software, США). Согласно тесту Шапиро–Уилка, все исследованные выборки имели нормальное распределение. Значимость различий между выборками оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа с множественными сравнениями по Сидaku или Тьюки и *t*-тестом (конкретный статистический метод указан в подписях к рисункам). Различия сравниваемых параметров считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Значимые отличия проиллюстрированы на рисунках скобками. Данные на гистограммах показывают среднюю и стандартное отклонение.

Результаты

Количество дендритных клеток, получаемых *in vitro* с помощью Flt3-L

Согласно данным литературы, для получения B220⁺CD11c⁺-пДК *in vitro* применяется культивирование предшественников ДК, отсортированных из костного мозга мышей, в присутствии 100 нг/мл Flt3-L в течение 6–9 сут [13, 14]. Также для получения B220⁺CD11c⁺-пДК возможно культивирование клеток костного мозга мышей в присутствии 200 нг/мл Flt3-L в течение 7–9 сут [15, 16]. Поэтому для генерации B220⁺CD11c⁺-пДК было решено опробовать протоколы культивирования клеток костного мозга мышей C57Bl/6 в течение 5, 7, 9 дней в присутствии 100 или 200 нг/мл Flt3-L.

Абсолютное количество клеток, генерируемых в культурах под действием 100 и 200 нг/мл Flt3-L, оказалось значимо больше на 7 и 9-е сутки по сравнению с 5-ми сутками (рис. 1А). Также на 7 и 9-е сутки в куль-

Рис. 3. Микроскопия культур дендритных клеток (ДК), полученных с помощью Flt3-L

А – микроскопия в проходящем свете; Б – флуоресцентная микроскопия того же фрагмента; зеленым цветом выделены пДК, меченые анти-B220-BV510; красным – мДК, меченые анти-Sirpα-PerCP/Cy5.5. ×20.

Рис. 4. Фенотип B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных *in vitro* с помощью 100 нг/мл Flt3-L. Относительное количество клеток, несущих: I-Ab (МНС II) (А), CD83 (Б), CD86 (В); PDCA-1 (Г); n = 6.

турах наблюдалось значимо большее относительное количество CD11c⁺-ДК и B220⁺CD11c⁺-пДК по сравнению с 5-ми сутками (рис. 1Б, В). Под действием Flt3-L в культурах также наблюдалась генерация Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в количествах, сопоставимых с количеством B220⁺CD11c⁺-пДК (рис. 1Г).

Две выбранные дозы Flt3-L не отличались значимо в своей способности генерировать изучаемые виды ДК в культурах. Также количества всех изучаемых видов ДК значимо не отличались на 7 и 9-е сутки культивирования при использовании обеих выбранных доз Flt3-L (см. рис. 1).

Для определения целесообразности генерации B220⁺CD11c⁺-пДК *in vitro* с помощью Flt3-L было изучено количество ДК в костном мозге мышей сразу после его выделения. Относительные количества CD11c⁺-ДК, B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в костном мозге оказались значимо меньшими по сравнению с относительными количествами аналогичных ДК, генерируемых *in vitro* с помощью Flt3-L к 7-м суткам (рис. 2А). Пример цитофлуориметрии ДК костного мозга и культур ДК, полученных с помощью Flt3-L представлен на рис. 2 (Б, В).

Морфология и фенотип дендритных клеток, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

Морфологически B220⁺CD11c⁺-пДК имели округлую или неправильную округлую форму с единичными

мелкими отростками (рис. 3). Sirpα⁺CD11c⁺-мДК являлись более крупными клетками с фибробластоподобной морфологией (см. рис. 3).

Относительные количества B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, экспрессирующих на своей поверхности I-Ab (МНС II), CD83 и CD86, увеличивались с возрастанием сроков культивирования (рис. 4А–В). При этом экспрессия данных молекул обнаруживалась на значимо большем количестве Sirpα⁺CD11c⁺-мДК по сравнению с B220⁺CD11c⁺-пДК на всех исследуемых сроках культивирования. Экспрессия специфического для пДК маркера PDCA-1 наблюдалась на большинстве B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на всех исследуемых сроках культивирования (рис. 4Г). Описанная картина наблюдалась при использовании обеих выбранных доз Flt3-L. При этом фенотип ДК, полученных с помощью 100 и 200 нг/мл Flt3-L, значимо не отличался.

По сравнению с ДК, полученными в культурах, значимо меньшее количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК костного мозга экспрессировали I-Ab (МНС II) (рис. 5). Также относительное количество PDCA-1⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК костного мозга оказалось значительно ниже по сравнению с относительным количеством PDCA-1⁺B220⁺CD11c⁺-пДК костного мозга и PDCA-1⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных в культурах (см. рис. 5).

При стимуляции полученных культур ДК ЛПС или CpG ДНК значимо увеличивалось относительное ко-

личество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК экспрессирующих CD83 и CD86, при этом относительное количество I-Ab⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК значимо снижалось (см. рис. 5). Аналогичный характер ответа на стимуляцию демонстрировали и ДК костного мозга. Но также при стимуляции ДК костного мозга ЛПС или CpG ДНК происходило значимое увеличение относительного количества I-Ab⁺B220⁺CD11c⁺-пДК и PDCA-1⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК и снижение PDCA-1⁺B220⁺CD11c⁺-пДК (см. рис. 5).

Функциональные свойства дендритных клеток, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

В смешанной культуре лимфоцитов ДК, полученные за 7 сут с помощью 100 нг/мл Flt3-L, вызывали генерацию значимо большего количества CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и значимо меньшего количества пролиферирующих CD4⁺-лимфоцитов по сравнению с культурами ДК, стимулированными CpG ДНК и по сравнению с количествами аналогичных клеток, присутствующих в CD4⁺-лимфоцитах, нестимулированных ДК (рис. 6). При этом нестимулированные культуры ДК и культуры, стимулированные ЛПС, не отличались значимо в своей способности генерировать Трег и индуцировать пролиферацию CD4⁺-лимфоцитов.

Характеристика экспрессии CCR9 на дендритных клетках костного мозга и дендритных клетках, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L

Относительно небольшое количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК свежевыделенного костного мозга и полученных 7-дневных культур имели на своей поверхности CCR9 (рис. 7А). Также средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9,

меченного антителом, на данных клетках принимала относительно низкие значения (рис. 7Б). Однако было отмечено, что через сутки после забора костного мозга в культурах значимо увеличивалось относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих на своей поверхности CCR9. При этом количество CCR9⁺B220⁺CD11c⁺-пДК на 1-е сутки культивирования оказалось значимо больше по сравнению с количеством CCR9⁺Sirpα⁺CD11c⁺-мДК (рис. 7А). Средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9, меченного антителом, проявляла аналогичный характер изменений на 1-е сутки культивирования (рис. 7Б). Пример цитометрии поверхностного CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на 0, 1 и 7-е сутки культивирования приведен на рис. 7 (В–Д).

Также было выявлено, что на всех сроках культивирования CCR9 локализуется преимущественно внутриклеточно, что проявлялось в относительно высоком количестве B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, позитивных по CCR9 при внутриклеточном окрашивании, а также в относительно высоких значениях средней геометрической интенсивности флуоресценции CCR9, меченого внутриклеточно (рис. 8А, Б). При этом количество Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих CCR9 внутриклеточно, а также средняя геометрическая интенсивности флуоресценции CCR9, меченого внутриклеточно, в Sirpα⁺CD11c⁺-мДК возрастали с увеличением сроков культивирования. Количество B220⁺CD11c⁺-пДК, несущих CCR9 внутриклеточно, на всех исследуемых сроках стремилось к 100%. Средняя геометрическая интенсивности флуоресценции внутриклеточно меченого CCR9 в B220⁺CD11c⁺-пДК на 1 и 7-е сутки культивирования

Рис. 5. Фенотип B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК костного мозга (0-й день) и полученных культур (7-й день), нестимулированных или стимулированных липополисахаридом (ЛПС) или CpG ДНК, $n = 6$

Рис. 6. Генерация CD25^{high}FoxP3⁺-Treg (А) и пролиферация CD4⁺-лимфоцитов (Б) в смешанных культурах CD4⁺-лимфоцитов мышей BALB/c и дендритных клеток (ДК) мышей C57Bl/6, полученных с помощью Flt3-L

ЛПС – липополисахарид. Скобками указаны статистически значимые отличия (однофакторный дисперсионный анализ с множественными сравнениями Тьюки, $p \leq 0,05$), $n = 6$.

достигала максимальных из наблюдаемых во всем эксперименте значений (рис. 8А, Б). Примеры цитометрии внутриклеточно локализованного CCR9 приведены на рис. 8В–Д.

Добавление к свежeweделенным клеткам костного мозга CCL25 – лиганда CCR9 – в дозировках 20, 40, 80, 160 нг/мл значимо не влияло на относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих CCR9 поверхностно и внутриклеточно после 1-х суток культивирования, и на среднюю геометрическую интенсивности флуоресценции CCR9, меченого поверхностно и внутриклеточно (рис. 9).

Обсуждение

В настоящем исследовании был отработан протокол получения B220⁺CD11c⁺-пДК с помощью Flt3-L *in vitro*, а также проведена фенотипическая и функциональная характеристика полученных клеток для решения вопроса о возможности их использования при разработке клеточных технологий модуляции иммунного ответа.

Результаты показали, что культивирование клеток костного мозга мышей в присутствии Flt3-L в течение 7 сут приводит к почти двукратному увеличению абсолютного количества клеток в культурах (см. рис. 1А). При этом около 25 % из всех полученных клеток в культурах составляли B220⁺CD11c⁺-пДК (см. рис. 1Б), что больше, чем относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК, присутствующее в лимфоидных органах мышей, стимулированных Flt3-L-продуцирующей клеточной линией (15 %) [11] и больше, чем относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК, присутствующее в костном мозге мышей в физиологических условиях (см. рис. 2А).

В присутствии Flt3-L к 7-м суткам в культурах клеток костного мозга также генерировалось значимое количество (около 20 % от общего количества клеток в культурах, см. рис. 1Г) Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. Поскольку мДК в современных исследованиях генерируют в ос-

новном с помощью ГМ-КСФ [1–7] и, таким образом, свойства мДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L, также слабо изучены, полученные Sirpα⁺CD11c⁺-мДК были включены в дальнейший анализ.

Используемые в проведенном исследовании дозы Flt3-L в 100 и 200 нг/мл не отличались значимо в своей способности генерировать какой-либо вид ДК в культурах клеток костного мозга (см. рис. 1), что позволяет снизить предложенную в некоторых источниках литературы дозу Flt3-L в 200 нг/мл [15, 16] для генерации ДК из клеток костного мозга.

B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L, обладали различной морфологией. Так, B220⁺CD11c⁺-пДК имели круглую или неправильную округлую форму с единичными мелкими дендритными отростками, в то время как Sirpα⁺CD11c⁺-мДК являлись более крупным фибробластоподобными клетками (см. рис. 3).

Как показал анализ экспрессии МНС II (I-Ab), маркера зрелости CD83 и костимуляторной молекулы CD86, B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК увеличивали степень зрелости с возрастанием сроков культивирования (см. рис. 4А–В). При этом Sirpα⁺CD11c⁺-мДК обладали более зрелым фенотипом по сравнению с B220⁺CD11c⁺-пДК на всех сроках культивирования (см. рис. 4А–В). Использование 100 или 200 нг/мл Flt3-L значимо не влияло на фенотип B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в культурах. Экспрессия МНС II (I-Ab) на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК свежeweделенного костного мозга оказалась значимо меньше по сравнению с экспрессией данных молекул на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L к 7-м суткам (см. рис. 5), что может говорить о более зрелом фенотипе ДК, полученных в культурах. Однако при стимулировании культур ДК ЛПС или СрG ДНК B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК приобретали еще более зрелый фенотип путем увеличения доли клеток, несущих CD83 и CD86 (см. рис. 5).

Рис. 7. Относительное количество B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущих поверхностный CCR9 (А) и средняя геометрическая интенсивности флуоресценции поверхностно меченого CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК (Б)

Скобками указаны статистически значимые отличия (сравнения между видами ДК выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Сидака, сравнения между сутками культивирования выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Тьюки; $p \leq 0,05$); В–Д – примеры цитометрии CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на 0, 1, 7-е сутки, соответственно; $n = 6$.

Согласно данным литературы, пДК специализируются на противовирусном иммунном ответе, в большом количестве несут TLR7 и TLR9 и отвечают созревaniem на агонист данных рецепторов – CpG ДНК [18], а мДК, несущие преимущественно TLR2 и TLR4, отвечают созреванием на их агонист – ЛПС [19]. Однако в нашем исследовании B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L, созревали под действием как CpG ДНК, так и ЛПС. Но аналогичный ответ на стимуляцию CpG ДНК или ЛПС демонстрировали и B220⁺CD11c⁺-пДК, и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК свежевыделенного костного мозга (см. рис. 5).

Несмотря на более зрелый фенотип по сравнению с ДК костного мозга, ДК, полученные *in vitro* с помощью Flt3-L, вызвали повышенную индукцию CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и сниженную пролиферацию

CD4⁺-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов по сравнению с ДК, стимулированными CpG ДНК (см. рис. 6), что говорило о выполнении полученными ДК функций незрелых ДК [3, 19] и их созревании и приобретении ими иммуногенной функции при стимуляции CpG ДНК.

Интересно, что культуры ДК, стимулированные ЛПС, значимо не отличались в своей способности индуцировать CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺-Трег и пролиферацию CD4⁺ лимфоцитов от нестимулированных ДК (см. рис. 6), что может говорить о преобладании функциональных свойств пДК в культурах ДК, полученных *in vitro* с помощью Flt3-L, несмотря на фенотипические признаки созревания ДК в культурах под действием ЛПС. Также о преобладании плазматоидного фенотипа ДК в культурах, полученных с помощью Flt3-L, говорило то, что большое количество Sirpα⁺CD11c⁺-мДК в таких культурах несли PDCA-1

(см. рис. 4) – специфичный маркер пДК, основной функцией которого является участие в противовирусном иммунном ответе [15, 16]. При этом значимо меньшее количество $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК свежевыделенного костного мозга имели PDCA-1 на своей поверхности по сравнению с $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, полученных с помощью Flt3-L, и по сравнению с $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК свежевыделенного костного мозга (см. рис. 5).

Относительно небольшое количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК свежевыделенного костного мозга и культур, полученных за 7 сут с помощью Flt3-L, имело на своей поверхности относительно невысокий уровень CCR9 (см. рис. 7А–В, Д). Однако было отмечено, что через сутки после экстракции костного мозга в культурах значимо увеличивалось количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, несущих на

своей поверхности CCR9 (см. рис. 7А, Г). В литературе также было показано, что количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК, несущих поверхностный CCR9, увеличивается на 2-е и 3-и сутки в культуре [12]. Возможным объяснением данному явлению служит то, что, являясь рецептором гомеостатического хемокина CCL25, т. е. рецептором, находящимся под постоянным воздействием своего лиганда в организме [21], а также принадлежащим к семейству рецепторов, связанных с G-белками, одним из механизмов регуляции которых является интернализация в клетку после связывания с лигандом [22], CCR9 в клетках организма локализуется преимущественно внутриклеточно [23]. При выделении клеток из организма и потере CCL25-сигналинга CCR9 может выводиться на поверхность клетки. В нашем исследовании также подтвердилась пре-

Рис. 8. Относительное количество $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК, несущих внутриклеточный CCR9 (А) и геометрическая средняя интенсивности флуоресценции внутриклеточно меченого CCR9 на $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК (Б)

Скобками указаны статистически значимые отличия (сравнения между видами ДК выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Сидака, сравнения между сутками культивирования выполнены двухфакторным дисперсионным анализом с множественными сравнениями Тьюки, $p \leq 0,05$). В–Д – примеры цитометрии CCR9 на $\text{B220}^+\text{CD11c}^+$ -пДК и $\text{Sirp}\alpha^+\text{CD11c}^+$ -мДК на 0, 1, 7-е сутки, соответственно; $n = 6$.

Рис. 9. Примеры цитометрических данных поверхностного (А) и внутриклеточного (Б) окрашивания CCR9 на B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на 1-е сутки культивирования с добавлением или без добавления CCL25

имущественная внутриклеточная локализация CCR9 в B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК на всех сроках культивирования (см. рис. 8). Однако добавление к свежеевыделенным клеткам костного мозга различных доз CCL25 значимо не влияло на поверхностное и внутриклеточное содержание CCR9 в B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК после первых суток культивирования (см. рис. 9). Также B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, полученные с помощью Flt3-L в течение 7 сут без воздействия CCL25, несли CCR9 преимущественно внутриклеточно, а не поверхностно, что может говорить о более сложной регуляции локализации CCR9 в клетке, требующей дальнейшего изучения.

Поскольку интенсивность миграции клеток к источнику CCL25 не коррелирует с количеством клеток, несущих CCR9 на поверхности [17], и не все клетки, мигрировавшие под действием CCL25, несут CCR9 на своей поверхности [23], но в подавляющем большинстве клеток, способных к миграции, обнаруживался высокий уровень внутриклеточного CCR9 [23], то полученные в данном исследовании с помощью Flt3-L B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК, несущие CCR9 преимущественно внутриклеточно, могут быть предложены для изучения их способности к миграции в тимус и индукции центральной иммунной толерантности.

■ Литература

1. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., Silkov A., Maksyutov A., Sennikov S. cytotoxic activity and memory t cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1017. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.
2. Kulikova E., Kurilin V., Shevchenko J., Obelukhova I., Khrapov E., Boyarskikh U. et al. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumour-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumour cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82 (2): 110–7. DOI: 10.1111/sji.12311.
3. Mansilla M., Sellès-Moreno C., Fàbregas-Puig S., Amoedo J., Navarro-Barriuso J., Teniente-Serra A. et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed

Заключение

Таким образом, с помощью Flt3-L из клеток костного мозга мышей возможно получение относительно больших количеств B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК. При этом получаемые B220⁺CD11c⁺-пДК и Sirpα⁺CD11c⁺-мДК обладают функциональными свойствами незрелых ДК и высоким внутриклеточным содержанием CCR9, что делает целесообразным дальнейшее изучение их способности к индукции иммунологической толерантности и подавлению нежелательного иммунного ответа. Также при стимуляции ДК, полученных с помощью Flt3-L *in vitro*, CpG ДНК, возможно изменение их функций с толерогенной на иммуногенную для использования данных клеток с целью индукции желаемого адаптивного иммунного ответа.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования: Сенников С.В., Терещенко В.П. **Сбор и обработка материала:** Терещенко В.П., Булыгин А.С., Заводский Р.Ю., Куликова Е.В. **Статистическая обработка:** Терещенко В.П. **Написание текста:** Терещенко В.П. **Редактирование:** Сенников С.В.

with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* 2015; 21 (3): 222–30. DOI: 10.1111/cns.12342.

4. Ning B., Wei J., Zhang A., Gong W., Fu J., Jia T. et al. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis. *PLoS One.* 2015; 10 (6): e0131152. DOI: 10.1371/journal.pone.0131152.

5. Сенников С., Облехова И. Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека. *Иммунология.* 2016; 37 (5): 291–6. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-291-296

6. Lutz M., Suri R., Niimi M., Ogilvie A., Kukutsch N., Röbner S. et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur. J. Immunol.*

2000; 30 (7): 1813–22. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813::aid-immu1813>3.0.co;2-8.

7. Fujita S., Sato Y., Sato K., Eizumi K., Fukaya T., Kubo M. et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood*. 2007; 110 (10): 3793–803. DOI: 10.1182/blood-2007-04-086470.

8. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R. et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*. 2012; 36 (3): 438–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.017.

9. Hadeiba H., Sato T., Habtezion A., Oderup C., Pan J., Butcher E. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2008; 9 (11): 1253–60. DOI: 10.1038/ni.1658.

10. Mach N., Gillessen S., Wilson S., Sheehan C., Mihm M., Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 2000; 60: 3239–46.

11. Wendland M., Czeloth N., Mach N., Malissen B., Kremmer E., Pabst O. et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (15): 6347–52. DOI: 10.1073/pnas.0609180104.

12. Zeng R., Oderup C., Yuan R., Lee M., Habtezion A., Hadeiba H. et al. Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (4): 847–56. DOI: 10.1038/mi.2012.123.

13. Chen Y., Chang S., Chen T., Lee C. Efficient generation of plasmacytoid dendritic cell from common lymphoid progenitors by Flt3 ligand. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0135217. DOI: 10.1371/journal.pone.0135217.

14. Liu H., Ramachandran I., Gabrilovich D.I. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92 (2): 200–3. DOI: 10.1038/icb.2013.65.

■ References

1. Kuznetsova M., Lopatnikova J., Shevchenko J., Silkov A., Maksyutov A., Sennikov S. cytotoxic activity and memory t cell subset distribution of in vitro-stimulated CD8⁺ T cells specific for HER2/neu epitopes. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1017. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01017.

2. Kulikova E., Kurilin V., Shevchenko J., Obelkhova I., Khrapov E., Boyarskikh U., et al. Dendritic cells transfected with a DNA construct encoding tumour-associated antigen epitopes induce a cytotoxic immune response against autologous tumour cells in a culture of mononuclear cells from colorectal cancer patients. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82 (2): 110–7. DOI: 10.1111/sji.12311.

3. Mansilla M., Sellès-Moreno C., Fàbregas-Puig S., Amoedo J., Navarro-Barriuso J., Teniente-Serra A., et al. Beneficial effect of tolerogenic dendritic cells pulsed with MOG autoantigen in experimental autoimmune encephalomyelitis. *CNS Neurosci. Ther.* 2015; 21 (3): 222–30. DOI: 10.1111/cns.12342.

4. Ning B., Wei J., Zhang A., Gong W., Fu J., Jia T., et al. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0131152. DOI: 10.1371/journal.pone.0131152.

5. Sennikov S., Obelkhova I. Methods of induction of tolerant dendritic cells in animals and humans. *Immunologiya*. 2016; 37 (5): 291–6. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-291-296. (in Russian)

6. Lutz M., Suri R., Niimi M., Ogilvie A., Kukutsch N., Röbner S., et al. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30 (7): 1813–22. DOI: 10.1002/1521-4141(200007)30:7<1813::aid-immu1813>3.0.co;2-8.

7. Fujita S., Sato Y., Sato K., Eizumi K., Fukaya T., Kubo M., et al. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood*. 2007; 110 (10): 3793–803. DOI: 10.1182/blood-2007-04-086470.

8. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R., et al. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*. 2012; 36 (3): 438–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.01.017.

9. Hadeiba H., Sato T., Habtezion A., Oderup C., Pan J., Butcher E. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* 2008; 9 (11): 1253–60. DOI: 10.1038/ni.1658.

10. Mach N., Gillessen S., Wilson S., Sheehan C., Mihm M., Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 2000; 60: 3239–46.

11. Wendland M., Czeloth N., Mach N., Malissen B., Kremmer E., Pabst O., et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (15): 6347–52. DOI: 10.1073/pnas.0609180104.

15. Brawand P., Fitzpatrick D. R., Greenfield B., Brasel K., Maliszewski C., De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 2002; 169 (12): 6711–9.

16. Angelov G. S., Tomkowiak M., Marçais A., Leverrier Y., Marvel J. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J. Immunol.* 2005; 175 (1): 189–95.

17. Feng T., Cong Y., Qin H., Benveniste E., Elson C. Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J. Immunol.* 2010; 185 (10): 5915–25. DOI: 10.4049/jimmunol.1001233.

18. Kärrić J., Jachimowski L., Uittenbogaart C., Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J. Immunol.* 2014; 193 (12): 5772–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1401541.

19. Funderburg N., Lederman M., Feng Z., Drage M., Jadlowsky J., Harding C. et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (47): 18 631–5.

20. Bhattacharya P., Gopisetty A., Ganesh B., Sheng J., Prabhakar B. GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 89: 235–49.

21. Muller G., Hopken U., Stein H., Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72 (1): 1–8.

22. Syrovatkin V., Alegre K., Dey R., Huang X. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J. Mol. Biol.* 2016; 428 (19): 3850–68. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.002.

23. Lee H., Kim H., Lee E., Jang M., Kim S., Park J. et al. Characterization of CCR9 expression and thymus-expressed chemokine responsiveness of the murine thymus, spleen and mesenteric lymph node. *Immunobiology*. 2012; 217 (4): 402–11. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.10.014.

12. Zeng R., Oderup C., Yuan R., Lee M., Habtezion A., Hadeiba H., et al. Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells. *Mucosal Immunol.* 2013; 6 (4): 847–56. DOI: 10.1038/mi.2012.123.

13. Chen Y., Chang S., Chen T., Lee C. Efficient generation of plasmacytoid dendritic cell from common lymphoid progenitors by Flt3 ligand. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0135217. DOI: 10.1371/journal.pone.0135217.

14. Liu H., Ramachandran I., Gabrilovich D.I. Regulation of plasmacytoid dendritic cell development in mice by aryl hydrocarbon receptor. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92 (2): 200–3. DOI: 10.1038/icb.2013.65.

15. Brawand P., Fitzpatrick D. R., Greenfield B., Brasel K., Maliszewski C., De Smedt T. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 2002; 169 (12): 6711–9.

16. Angelov G. S., Tomkowiak M., Marçais A., Leverrier Y., Marvel J. Flt3 ligand-generated murine plasmacytoid and conventional dendritic cells differ in their capacity to prime naive CD8 T cells and to generate memory cells in vivo. *J. Immunol.* 2005; 175 (1): 189–95.

17. Feng T., Cong Y., Qin H., Benveniste E., Elson C. Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid. *J. Immunol.* 2010; 185 (10): 5915–25. DOI: 10.4049/jimmunol.1001233.

18. Kärrić J., Jachimowski L., Uittenbogaart C., Blom B. The plasmacytoid dendritic cell as the Swiss army knife of the immune system: molecular regulation of its multifaceted functions. *J. Immunol.* 2014; 193 (12): 5772–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1401541.

19. Funderburg N., Lederman M., Feng Z., Drage M., Jadlowsky J., Harding C., et al. Human-defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (47): 18 631–5.

20. Bhattacharya P., Gopisetty A., Ganesh B., Sheng J., Prabhakar B. GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 89: 235–49.

21. Muller G., Hopken U., Stein H., Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 72 (1): 1–8.

22. Syrovatkin V., Alegre K., Dey R., Huang X. Regulation, signaling, and physiological functions of G-proteins. *J. Mol. Biol.* 2016; 428 (19): 3850–68. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.08.002.

23. Lee H., Kim H., Lee E., Jang M., Kim S., Park J., et al. Characterization of CCR9 expression and thymus-expressed chemokine responsiveness of the murine thymus, spleen and mesenteric lymph node. *Immunobiology*. 2012; 217 (4): 402–11. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.10.014.