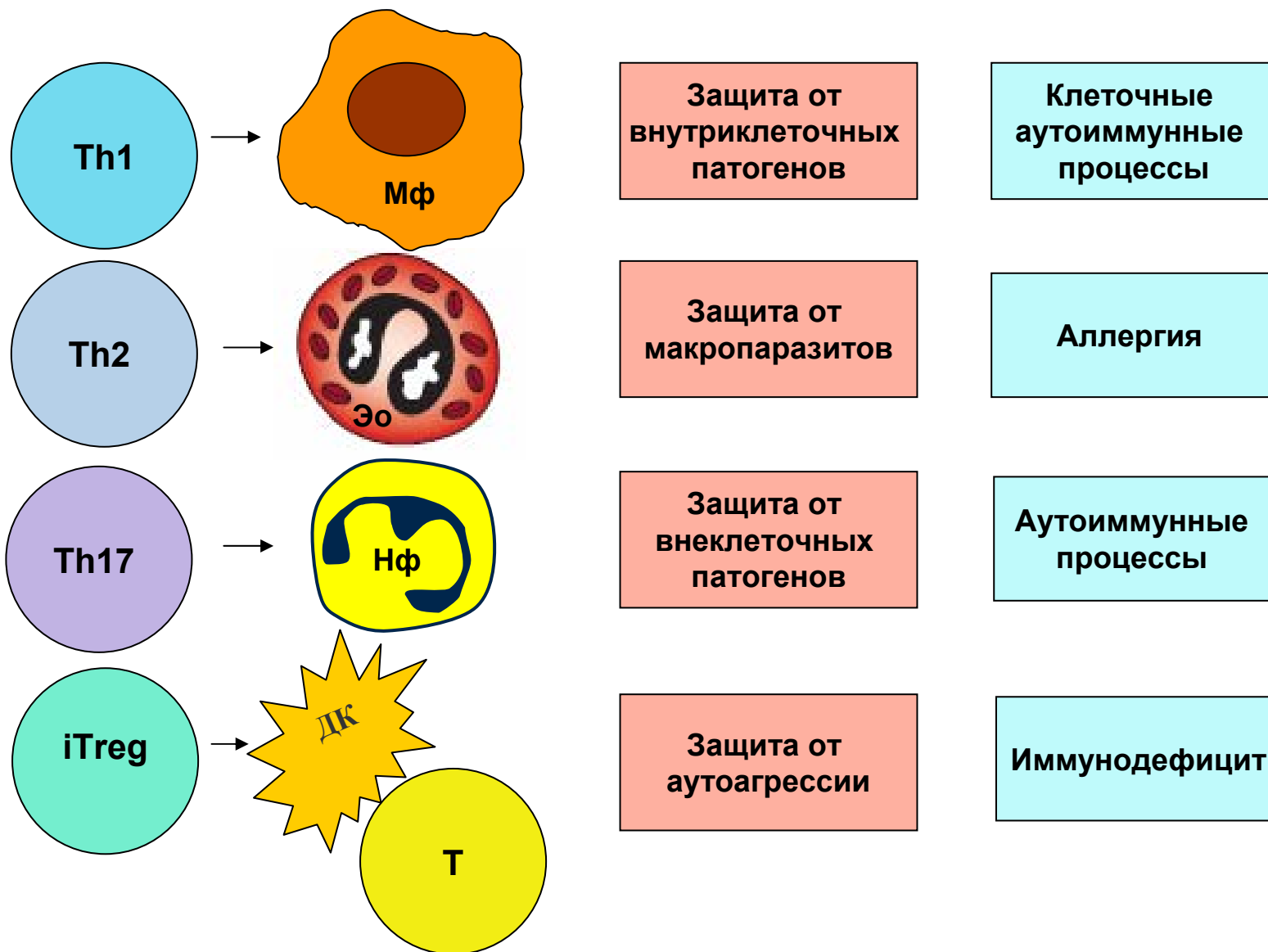


**ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ХЕЛПЕРОВ.
КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

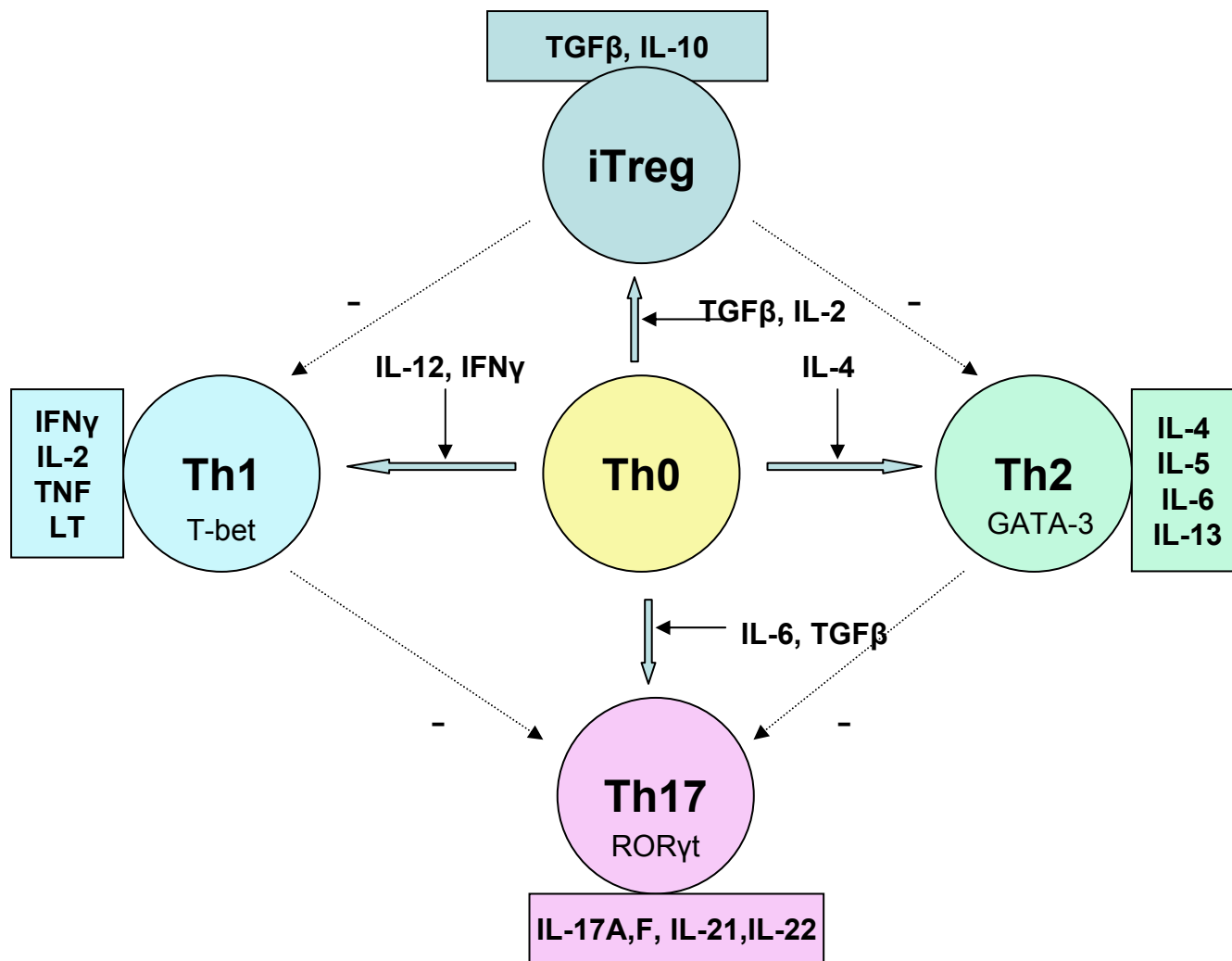
А.А.Ярилин

Институт иммунологии ФМБА РФ

АДАПТИВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ CD4+ Т-КЛЕТОК (клетки-партнеры, физиологические и патологические эффекты)



Разновидности адаптивных субпопуляций CD4+ Т-клеток

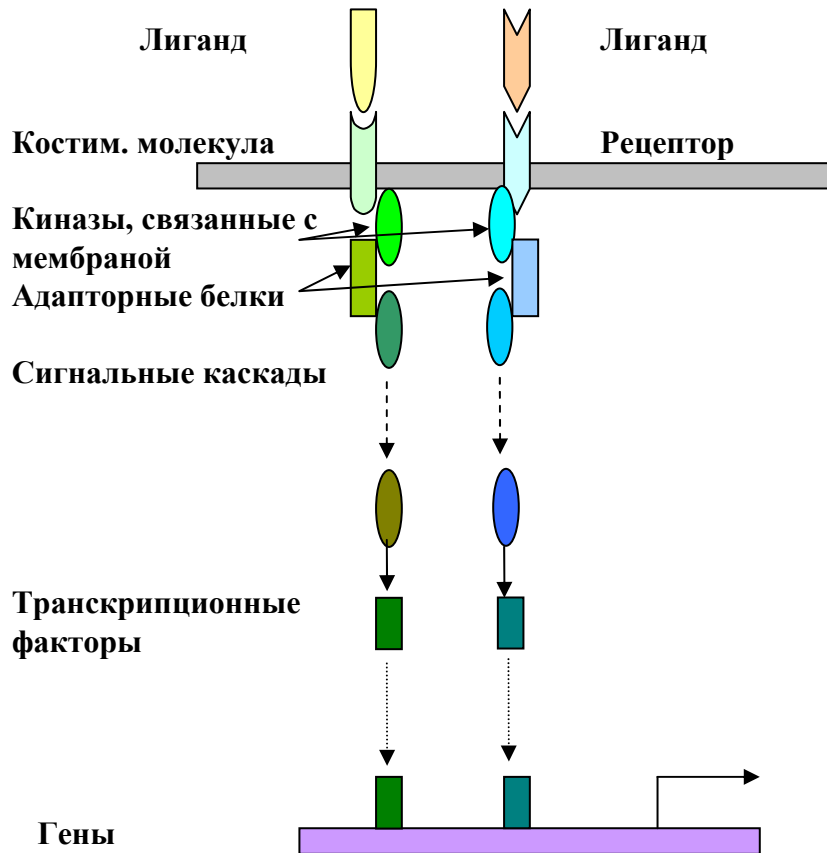


ОСНОВНЫЕ ПРИЗНАКИ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4+ Т-КЛЕТОК

Субпопуляция	Маркерные молекулы:			
	мембранные маркеры	цитокины	факторы STAT	транскрипционные регуляторы
Th1	CXCR3, CCR5	IFN γ	STAT4	T-bet
Th2	CCR2, CCR4, CCR8	IL-4	STAT6	GATA-3
Th17	CCR4, CCR6	IL-17	STAT3	RORC2
iTreg	CCR4	TGF β	STAT5	FOXP3

- **Транскрипционные факторы –это белки, обычно формирующиеся в процессе передачи активационных и других индукторных сигналов. Они вызывают экспрессию генов, взаимодействуя с ДНК в их промотерной области, а также действуя на эпигенетическом уровне.**
- **Транскрипционные регуляторы дифференцировки – это разновидность транскрипционных факторов, которые не только вызывают экспрессию определенных генов, но и стабилизируют паттерны экспрессированных и доступных для индукции генов, т.е. вызывают дифференцировку клеток.**

ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ СХЕМА ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ОТ МЕМБРАННОГО РЕЦЕПТОРА В ЯДРО



Взаимодействие лигандов с рецептором и костимулирующей молекулой.

Активация киназ, связанных с мембраной. Дальнейшая передача активационного сигнала с помощью адапторных белков на сигнальные каскады.

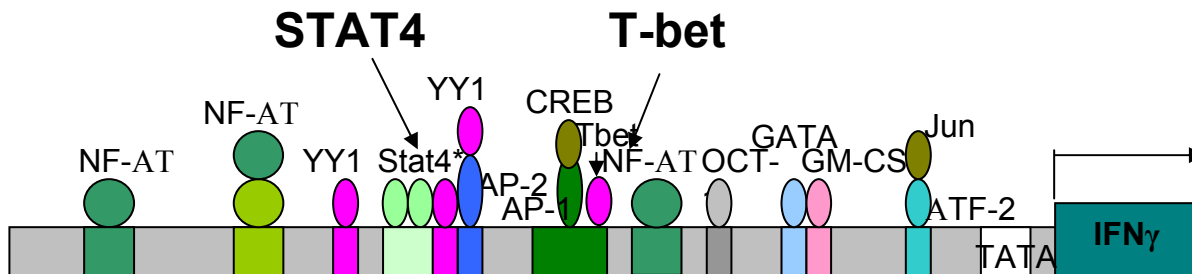
Реализация сигнальных каскадов.

Формирование транскрипционных факторов (ТФ). Миграция ТФ в ядро.

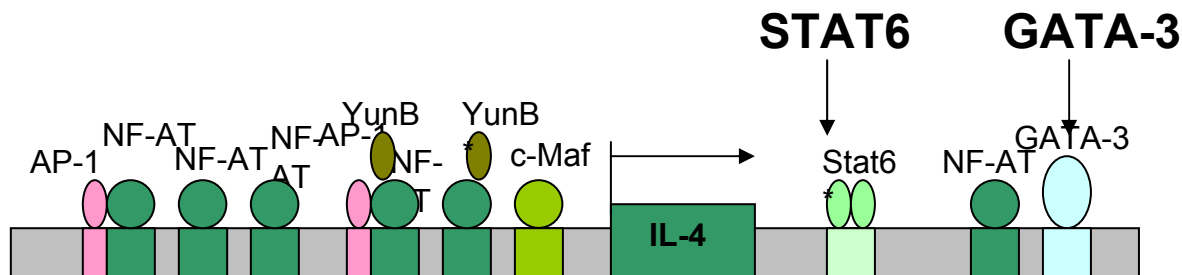
Взаимодействие ТФ с промоторами генов. Экспрессия генов

СХЕМА РАСПОЛОЖЕНИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ПРОМОТЕРАХ ГЕНОВ *IFNG* И *IL4*

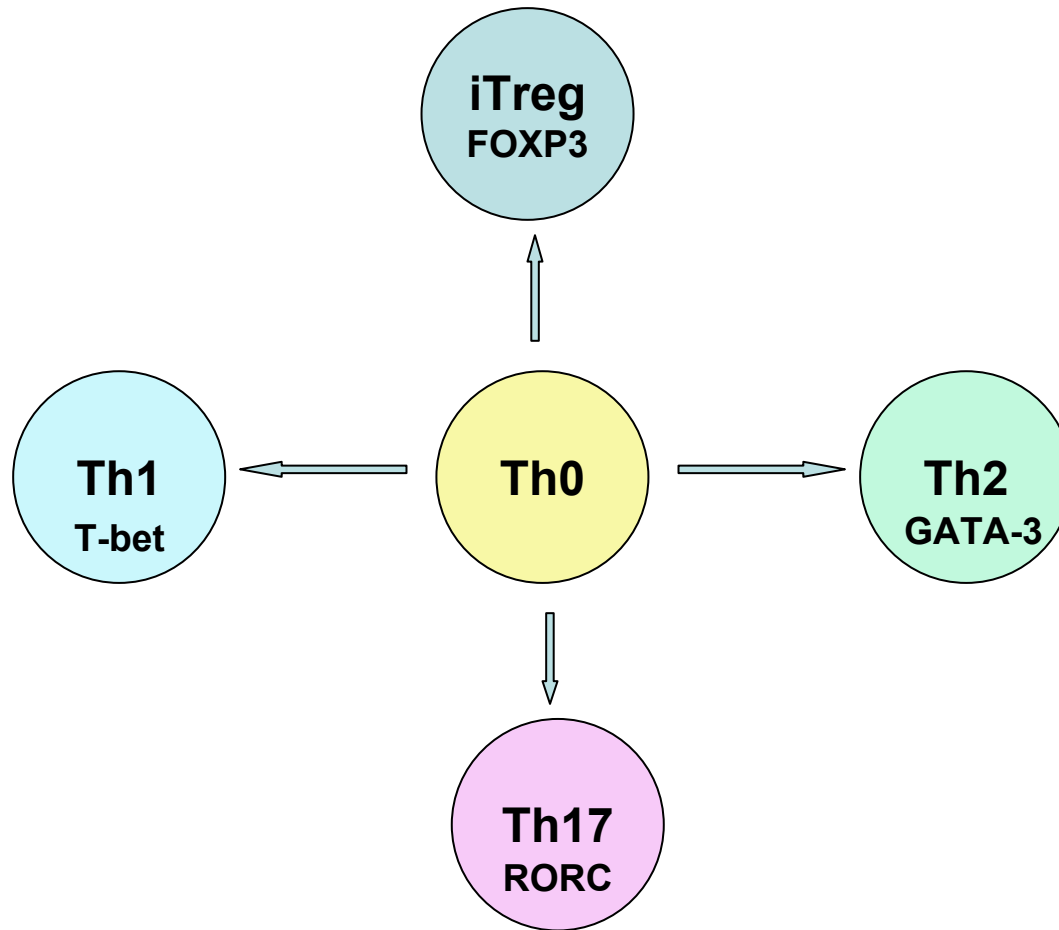
Промотор гена *IFNG*



Промотор гена *IL4*



Адаптивные субпопуляции CD4+ Т-клеток, и их транскрипционные регуляторы

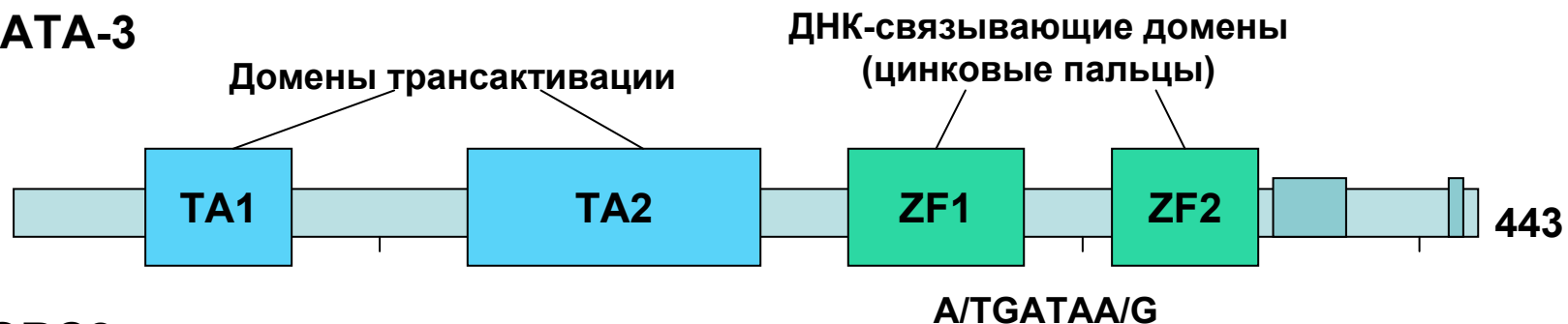


Номенклатура и некоторые свойства транскрипционных регуляторов дифференцировки Т-хелперов и их генов

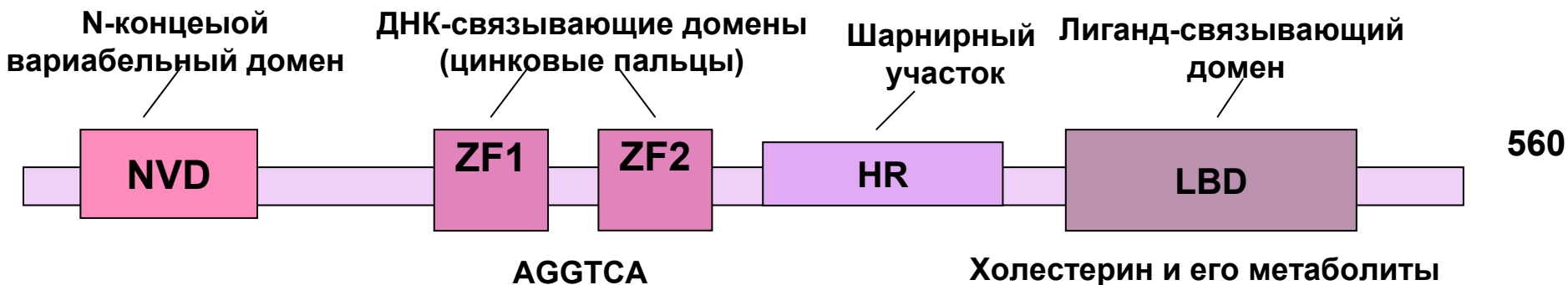
Субпопуляция	Ген	Хромосома	Число экзонов	Транскрипционный фактор	Число остатков
Th1	<i>TBX21</i>	17q21	6	T-bet (T-box expressed in T cells)	535
Th2	<i>GATA3</i>	10p15	5	GATA-3 (GATA-binding protein 3)	443
Th17	<i>RORC</i>	1q21	11	ROR γ t/RORC2 (Retinoid-like orphan receptor γ t/C2)	560
Treg	<i>FOXP3</i>	Xp11	11	FOXP3 (Forkhead box protein 3)	454

СХЕМА СТРОЕНИЯ БЕЛКОВ GATA-3, RORC И FOXP3

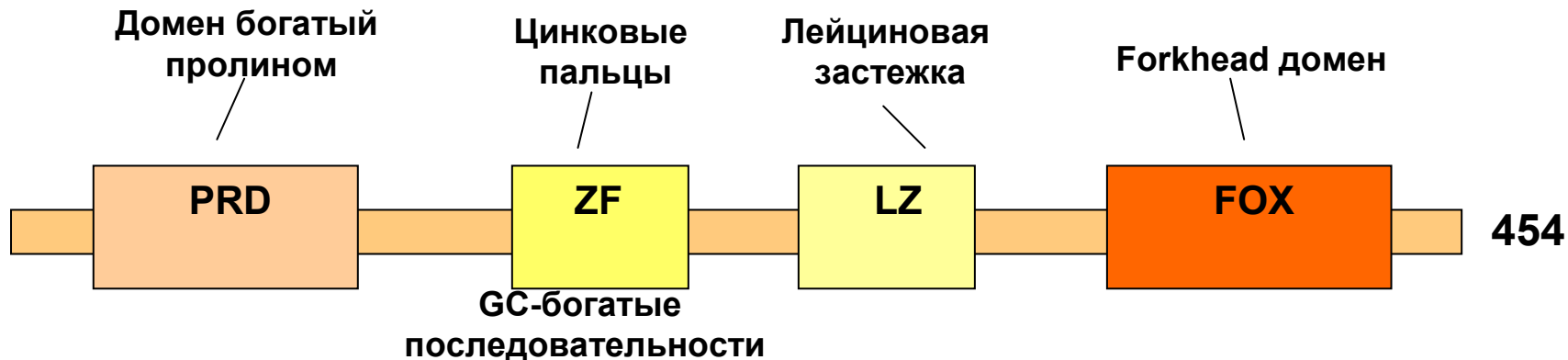
GATA-3



RORC2



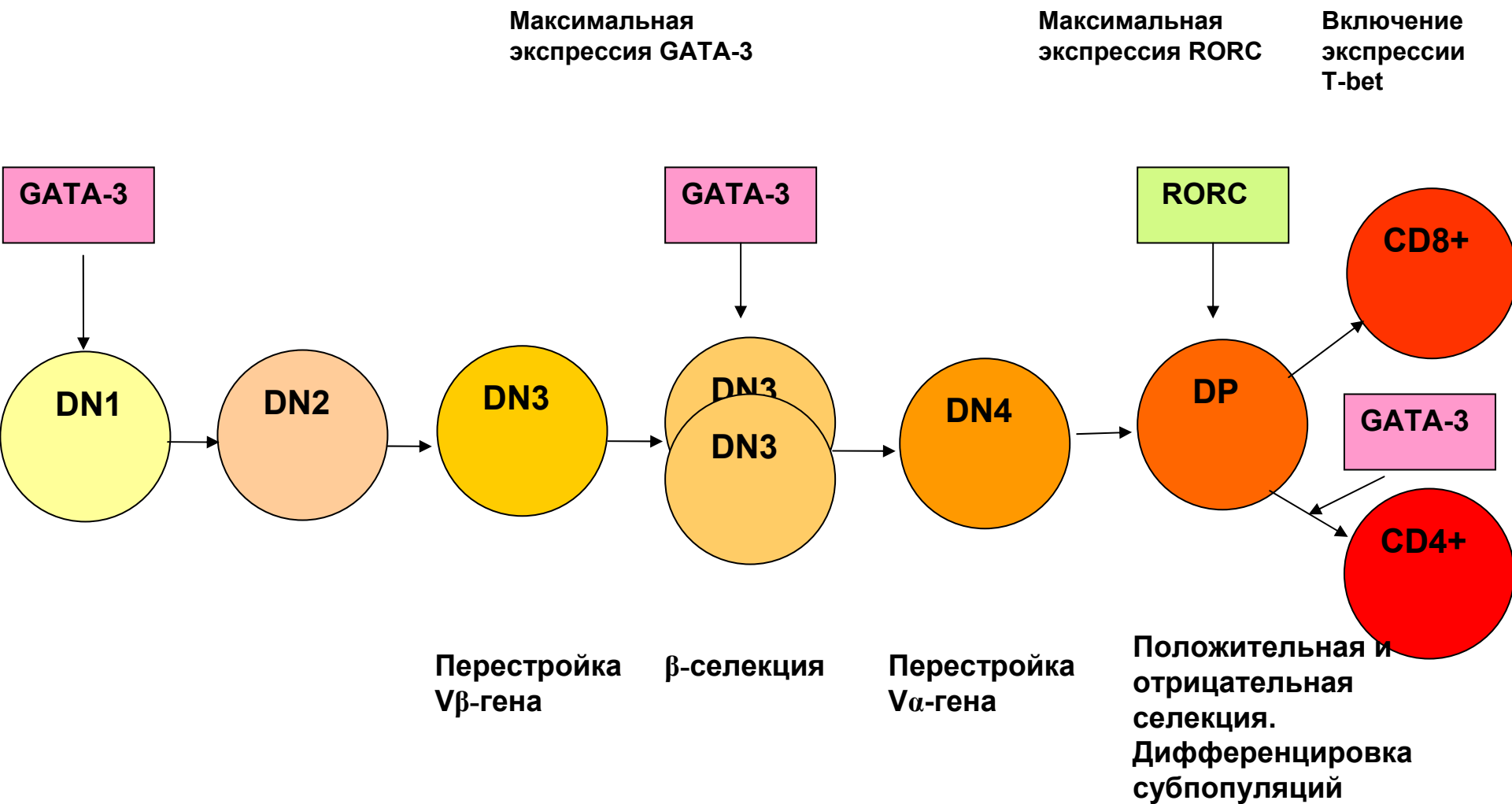
FOXP3



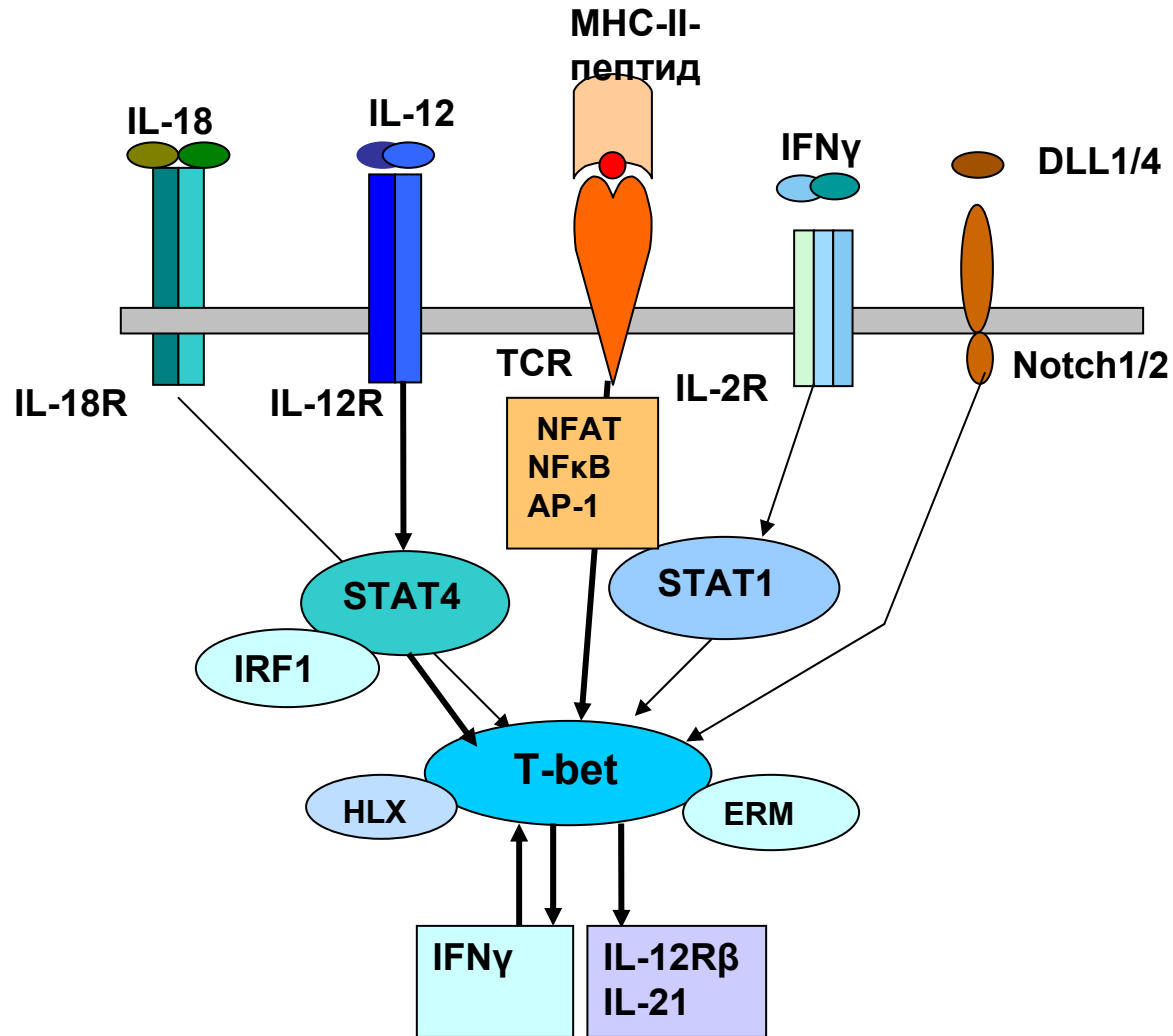
ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ Т-ХЕЛПЕРОВ В ОРГАНАХ И КЛЕТКАХ

	Органы	Клетки иммунной системы
T-bet	Вторичные лимфоидные органы, печень, почки, поджелудочная железа, простата, яички. У эмбрионов – глазное яблоко	Th1-клетки, iNKT, NK-клетки. Может быть индуцирован в дендритных клетках, В-лимфоцитах, Th17-клетках
GATA-3	Тимус, вторичные лимфоидные органы, кожа, почки, протоки желез, легкие, плацента. У эмбрионов – нервная система, внутреннее ухо	Тимоциты, все Т-клетки, особенно Th2, а также iNKT, NK-клетки.
RORC2	Тимус, вторичные лимфоидные органы, кишечник, кожа, легкие, мышцы, нервные ганглии.	CD4+CD8+ тимоциты, Th17- и Tc17-клетки, кишечные Т-клетки, NKT, $\gamma\delta$ T-клетки. У эмбрионов – LTi-клетки. Может быть индуцирован в Treg-клетках
FOXP3	Тимус, вторичные лимфоидные органы.	Регуляторные Т-клетки (Treg), часть CD4+ тимоцитов

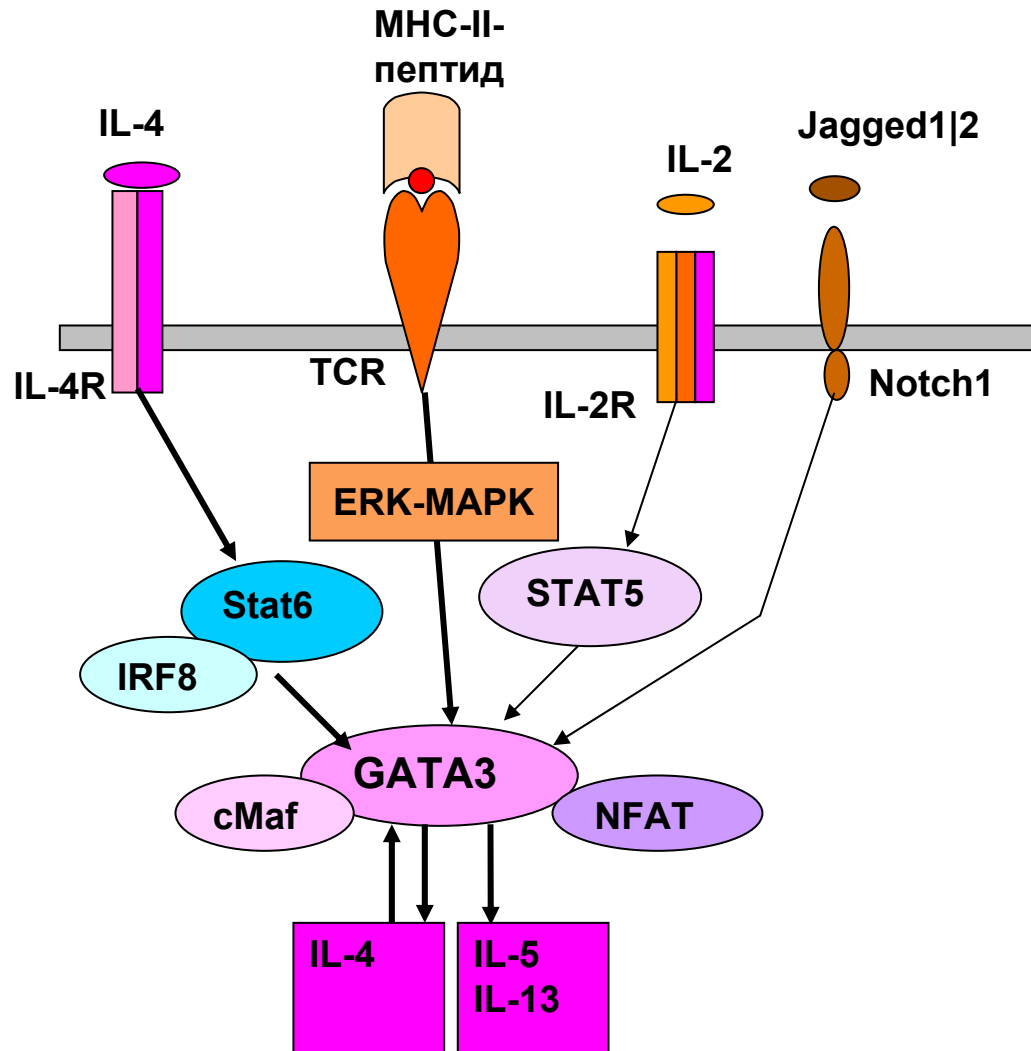
ЭКСПРЕССИЯ И ПРОЯВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ Т-КЛЕТОК В ТИМУСЕ



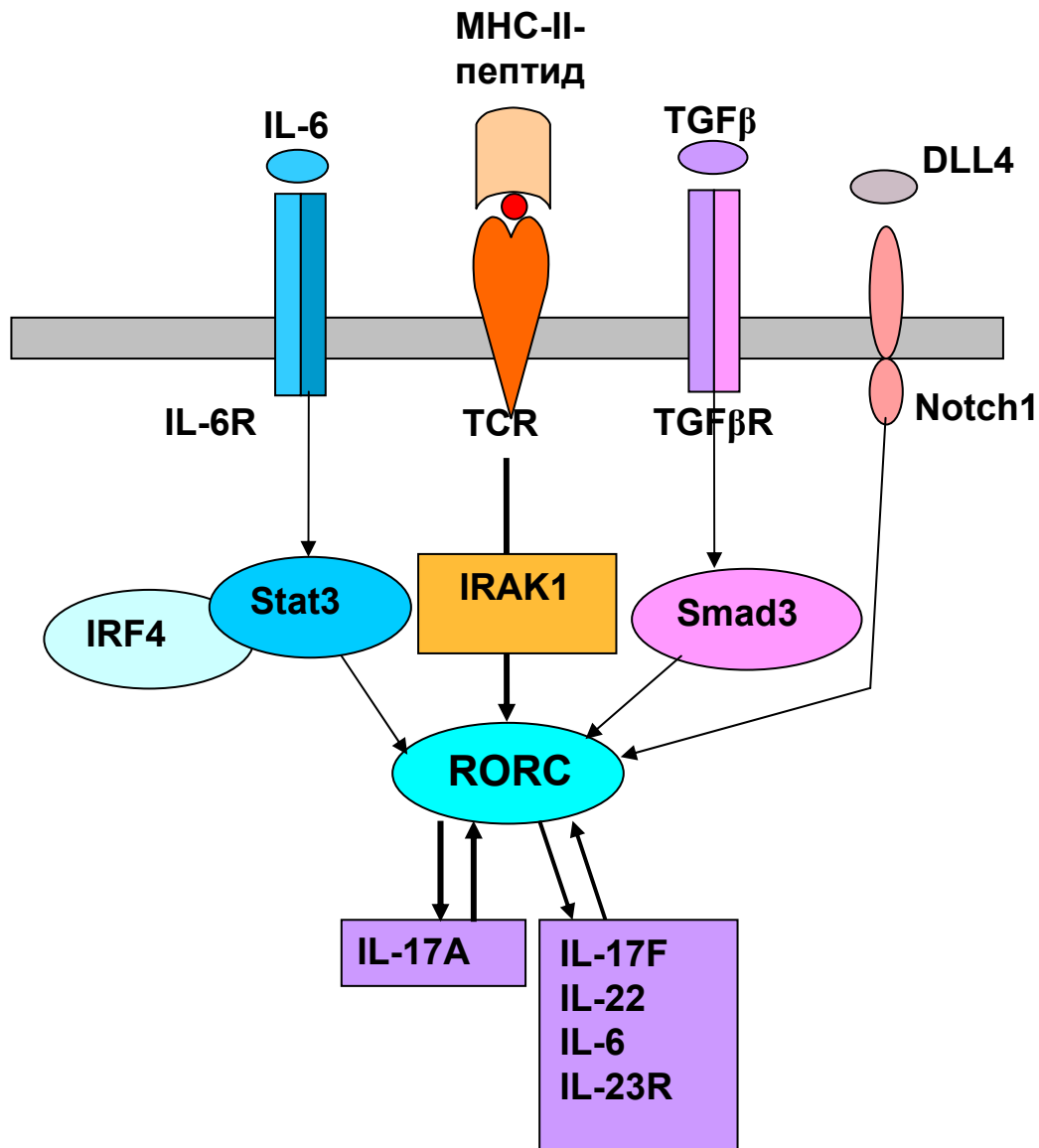
ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ Th1-КЛЕТОК



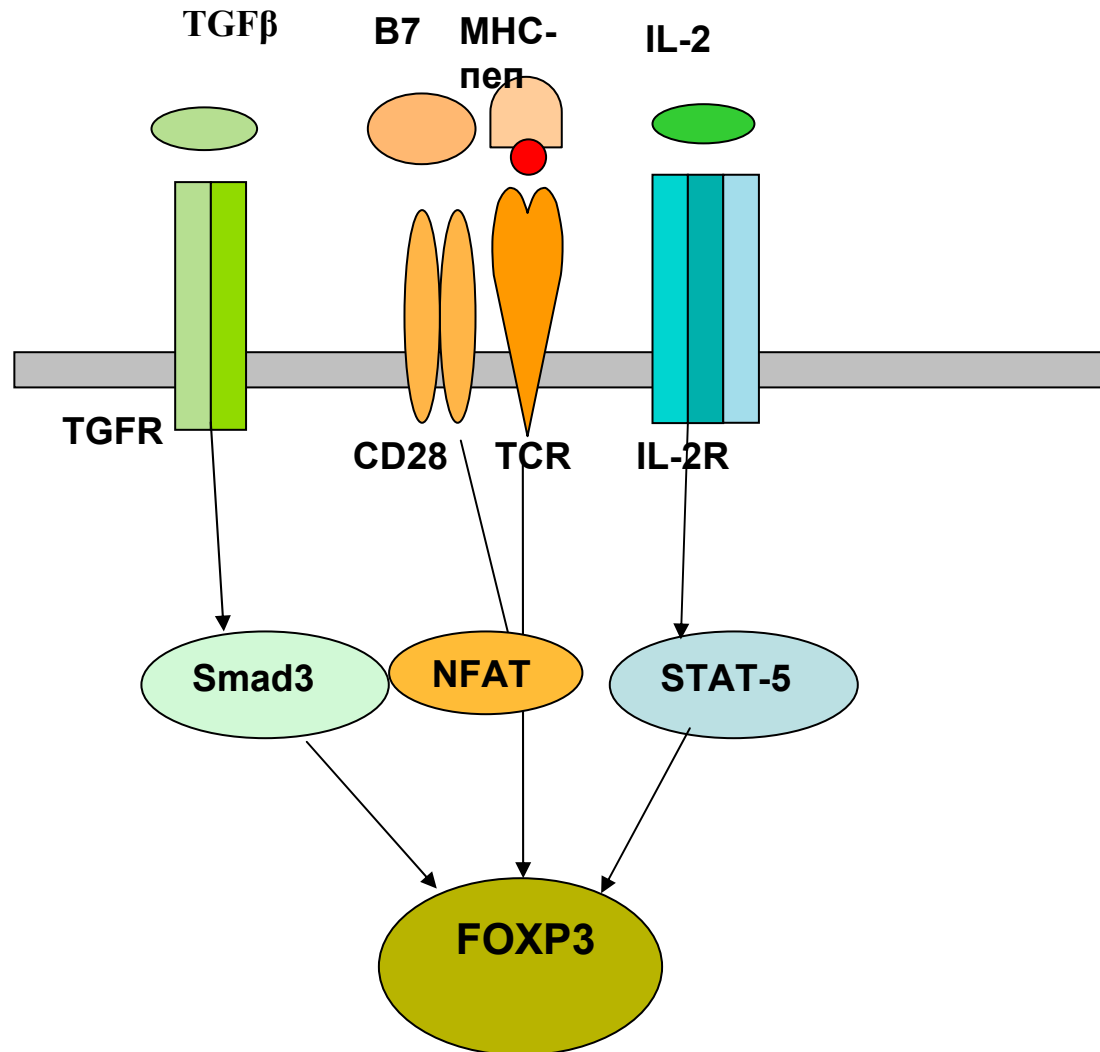
ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ Th2-КЛЕТОК



ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ Th17-КЛЕТОК

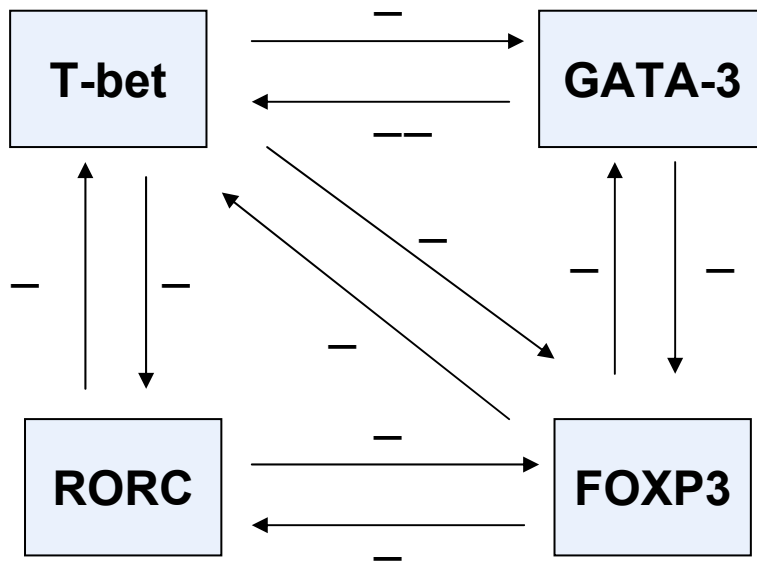


ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ Treg-КЛЕТОК



ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ХЕЛПЕРОВ

Антагонизм



Взаимное подавление транскрипционных регуляторов Т-хелперов реализуется на двух уровнях: путем подавления экспрессии генов (через действие на регуляторные участки гена) и путем инактивации в результате межбелковых взаимодействий.

Сосуществование

Взаимный антагонизм транскрипционных регуляторов В-хелперов не исключает их одновременной экспрессии в Т-клетках. Известно два примера такого рода:

ROR γ t+Foxp3+ определяются у мышей в *I.propri*a кишечника; такие клетки слабо продуцируют IL-17 и функционируют преимущественно как Treg.

Значительная часть Th17-клеток человека коэкспрессируют RORC2 и T-bet и продуцируют одновременно IL-17 и IFN γ .

ПОСЛЕДСТВИЯ НОКАУТА ГЕНА *TBX21* И ЕГО НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ДЕФЕКТЫ У ЧЕЛОВЕКА

Последствия нокаута: ослабление выработки IFN γ и дифференцировки Th1-клеток, усиление экспрессии IL-13 и IL-5, спонтанная дифференцировка Th2-клеток, развитие астматического синдрома, ослабление устойчивости к вирусам и другим внутриклеточным патогенам, устойчивость к развитию аутоиммунного энцефаломиелита и сахарного диабета 1-го типа, усиление метастазирования опухолей.

Наследственные синдромы, обусловленные дефектами гена *TBX21* не описаны.

SNP гена *TBX21* иногда ассоциирован с формированием гиперреактивности бронхов и развитием бронхиальной астмы, в частности ее аспири-индуцированной формы, с чувствительностью к инфицированию вирусом гепатита В, а также с повышением риска развития сахарного диабета и ревматоидного артрита.

ПОСЛЕДСТВИЯ НОКАУТА ГЕНА *GATA3* И ЕГО НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ДЕФЕКТЫ У ЧЕЛОВЕКА

Последствия нокаута: гибель эмбрионов на стадии E11,5 (кровоизлияния, дефекты развития, подавление гемопоэза). При кондиционированном нокауте – усиление развития Th1- и синтеза IFN γ , подавление развития Th2-клеток, перепрограммирование их в Th1-клеток, снижение уровня Th2-цитокинов и IgE, снижение содержания слизи и эозинофилов в воздухоносных путях, ослабление антипаразитарной защиты.

Мутации в гомозиготном состоянии летальны. У гетерозигот по мутантному гену *GATA3* развивается HDR-синдром (hypoparathyroidism, deafness, renal dysplasia), или синдром Бараката, который проявляется снижением эндокринной функции паращитовидных желез, сенсорно-невральной глухотой и дисплазией почек, а также низким уровнем Th2-цитокинов и IgE.

Установлена связь SNP гена *GATA3* с развитием бронхиальной астмы, аллергического ринита, атопического дерматита.

ПОСЛЕДСТВИЯ НОКАУТА ГЕНА *RORC* И ЕГО НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ДЕФЕКТЫ У ЧЕЛОВЕКА

Последствия нокаута: атрофия тимуса, нарушение развития лимфатических узлов и лимфоидной ткани кишечника, ослабление дифференцировки Th17-клеток и синтеза IL-17, нарушение липидного обмена и биопериодизма.

Наследственная патология, обусловленная дефектами гена *RORC*, не описана.

Не обнаружены ассоциации SNP гена *RORC* с патологией человека. У телят установлена связь SNP гена *RORC* с отложением жира в мышцах («мраморная говядина»).

ПОСЛЕДСТВИЯ НОКАУТА ГЕНА *FOXP3* И ЕГО НАСЛЕДСТВЕННЫЕ ДЕФЕКТЫ У ЧЕЛОВЕКА

Нокаут гена *Foxp3* и мутации типа *sf* проявляются низкорослостью, экземой, тяжелой диареей, анемией, аутоиммунным лимфопролиферативным синдромом, активацией CD4+ клеток, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, ранней гибелью.

Дефицит гена *FOXP3* фенотипически выражается в IPEX-синдроме. Его проявления: полиорганное аутоиммунное поражение эндокринных органов (сахарный диабет I типа, тиреоидит) с высоким уровнем аутоантител, тяжелая энтеропатия, кахексия, низкорослость, аллергия (экзема, пищевая аллергия, эозинофилия, увеличение уровня IgE), а также гематологическими изменениями (гемолитическая анемия, тромбоцитопения). Больные дети (мальчики) гибнут в течение 1-го года жизни от повторных тяжелых инфекций.

Анализ связи SNP гена *FOXP3* выявил значимую ассоциацию лишь с развитием билиарного цирроза.

Заболевания, патогенетически связанные с изменением экспрессии T-bet и развития Th1-клеток.

Изменения T-bet/Th1	Заболевания
Отсутствие	Нет сведений
Снижение содержания, гипофункция	Гиперреактивность бронхов, склонность к развитию астмы.
Повышение содержания, гиперфункция	Связь с развитием сахарного диабета, ревматоидного артрита

Ген *TBX21* и его продукт рассматриваются как мишени терапевтических воздействий при аутоиммунной патологии.

isRNA, специфичная для *TBX21*, апробирована при экспериментальной терапии очагового облысения.

Заболевания, патогенетически связанные с изменением экспрессии GATA-3 и развития Th2-клеток.

Изменения GATA-3/Th2	Заболевания
GATA-3 -/+	HDR-синдром
Снижение содержания, гипофункция	Способствует развитию системной красной волчанки и, возможно, других аутоиммунных заболеваний
Повышение содержания, гиперфункция	Благоприятствует развитию аллергических заболеваний Экспрессия в клетках рака молочной железы – благоприятный прогностический признак

Заболевания, патогенетически связанные с изменением экспрессии RORC и развития Th17-клеток.

Изменения RORC/Th17	Заболевания
Отсутствие	Нет сведений
Снижение содержания, гипофункция	Нет сведений
Повышение содержания, гиперфункция	Повышение экспрессии способствует развитию болезни Крона, рассеянного склероза; Экспрессия повышена при бронхиальной астме, контактном и атопическом дерматитах

Ген *RORC* и его продукт рассматриваются как мишени терапевтических воздействий при аутоиммунной патологии

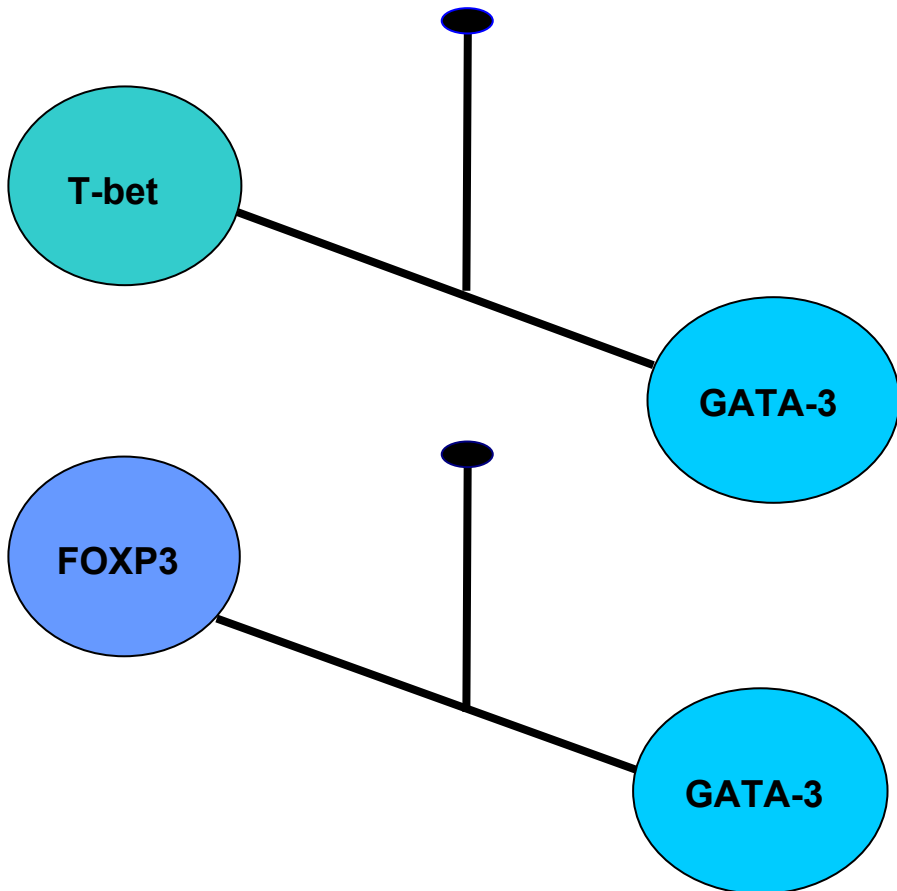
Заболевания, патогенетически связанные с изменением экспрессии FOXP3 и развития Treg.

Изменения FOXP3/Treg	Заболевания
Отсутствие	IPEX-синдром
Снижение содержания, гипофункция	Аутоиммунные заболевания Аллергические заболевания Привычное невынашивание беременности Болезнь трансплантат-против-хозяина
Повышение содержания, гиперфункция	Злокач. новообразования Инфекционные заболевания СПИД

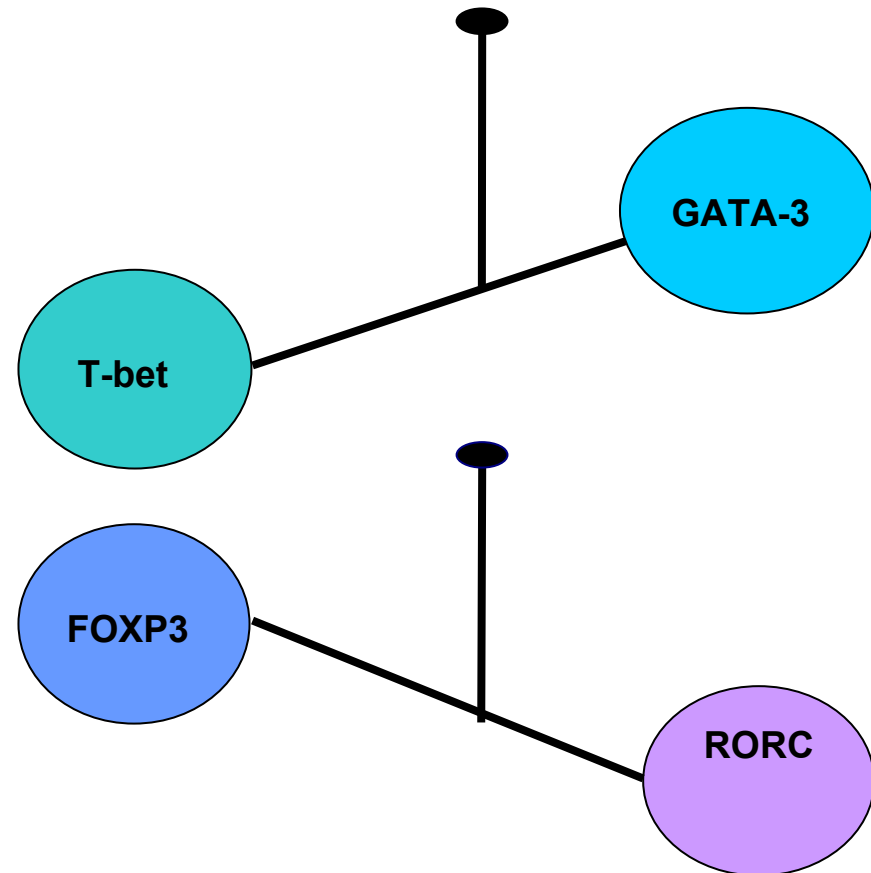
Ген *FOXP3* и его продукт рассматриваются как мишень терапевтических воздействий при аутоиммунной и аллергической патологии

Дисбаланс Т-хелперов при аллергии и аутоиммунных заболеваниях

Аллергия



Аутоиммунные заболевания

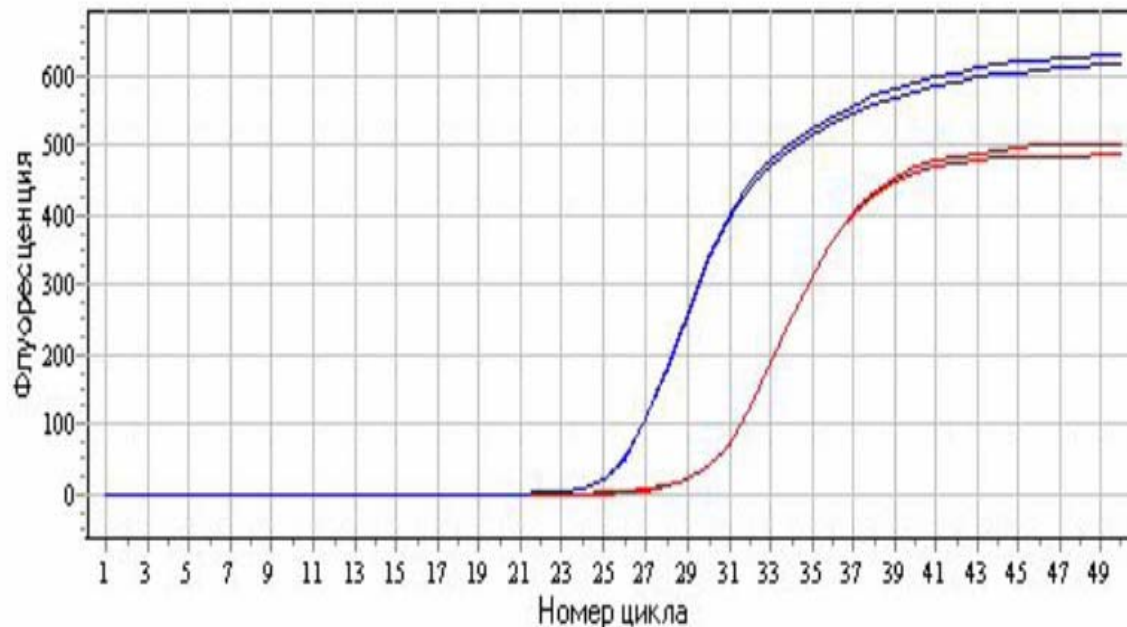


МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

- Экспрессию генов транскрипционных факторов определяли в полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (RT-PCR in real time).
 - Для этого использовали набор TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit («Applied Biosystems»).
 - Оценивали не абсолютный, а относительный уровень экспрессии генов - относительно экспрессии housekeeping гена *B2M* (β_2 -микроглобулина).
 - Относительную экспрессию выражали величиной $2^{-\Delta\Delta Ct}$.
- $$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{контроль}B2M} - Ct_{B2M}) - (Ct_{\text{контроль ген}} - Ct_{\text{ген}}).$$
- Показатели представлены в виде Me (L-H), где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для статистической обработки использован U-критерий Манна-Уитни.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК FOXP3 В ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

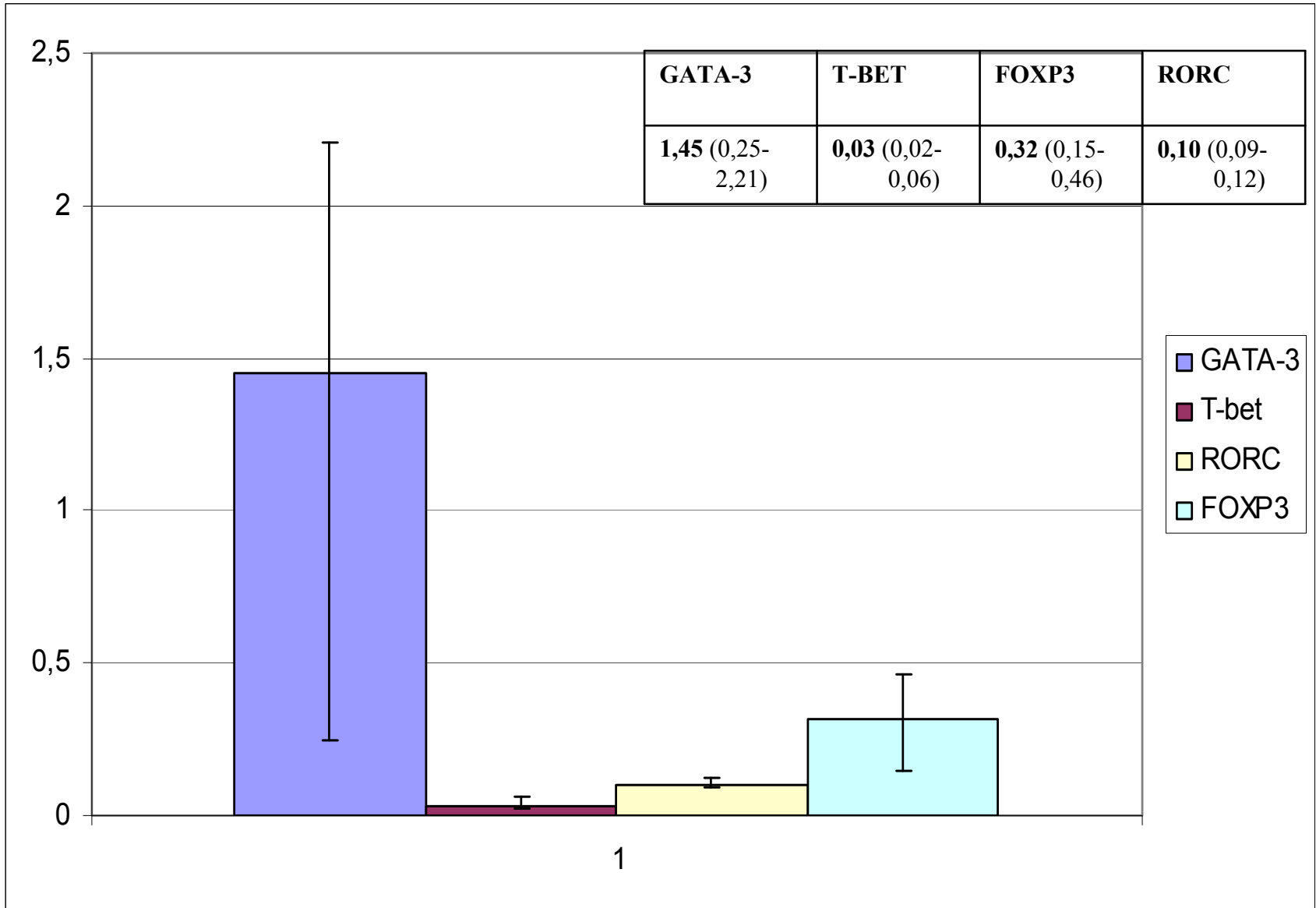
Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла



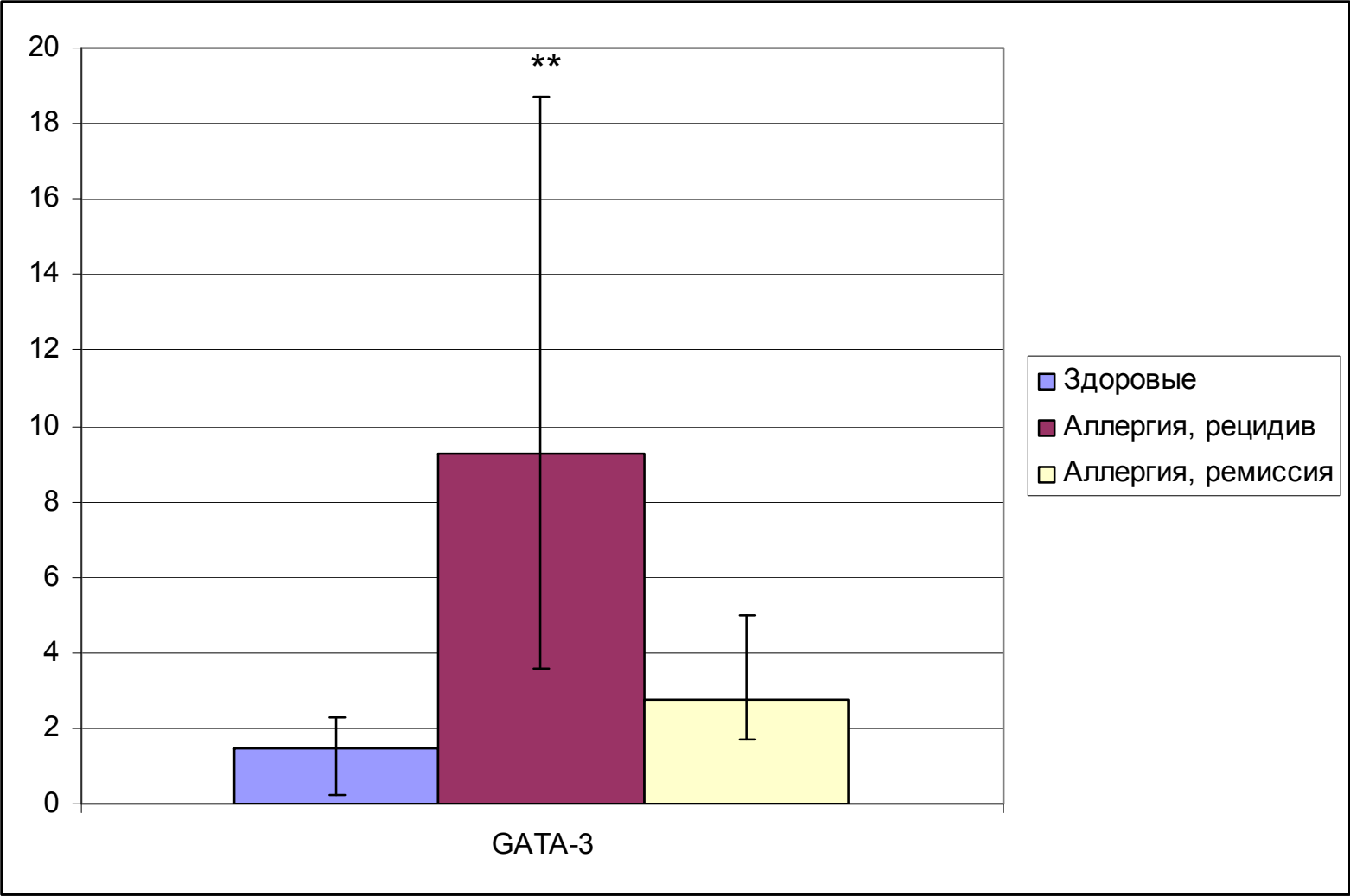
Представлены кривые накопления продуктов амплификации FOXP3 и нормировочного гена HPRT1. Уровень экспрессии FOXP3 ниже, чем HPRT1, примерно в 90-100 раз.

- – кривые накопления HPRT1,
- – кривые накопления FOXP3.

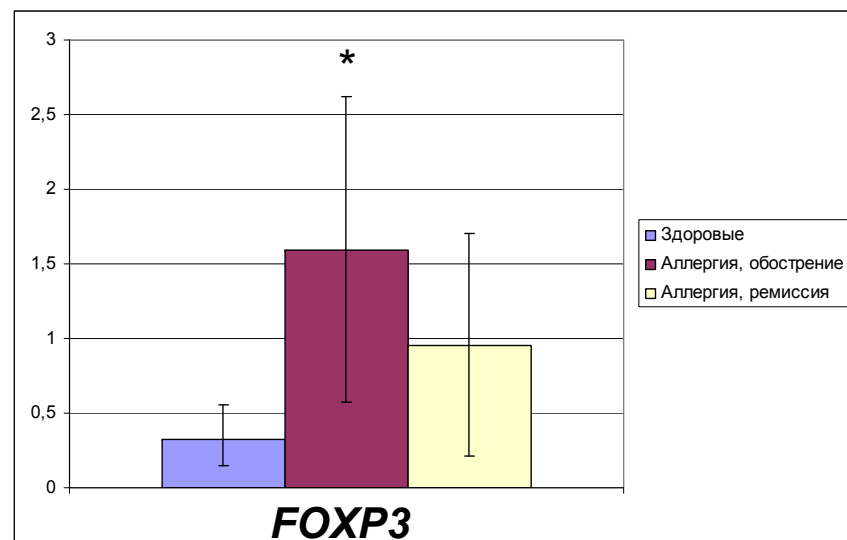
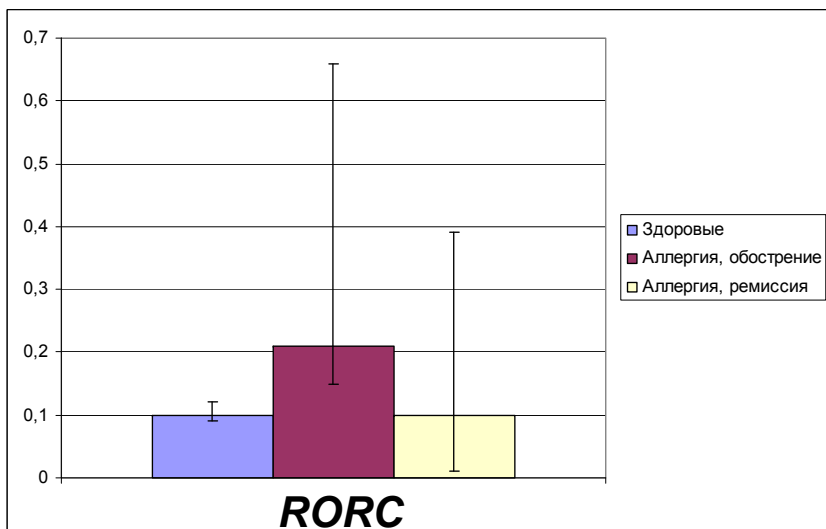
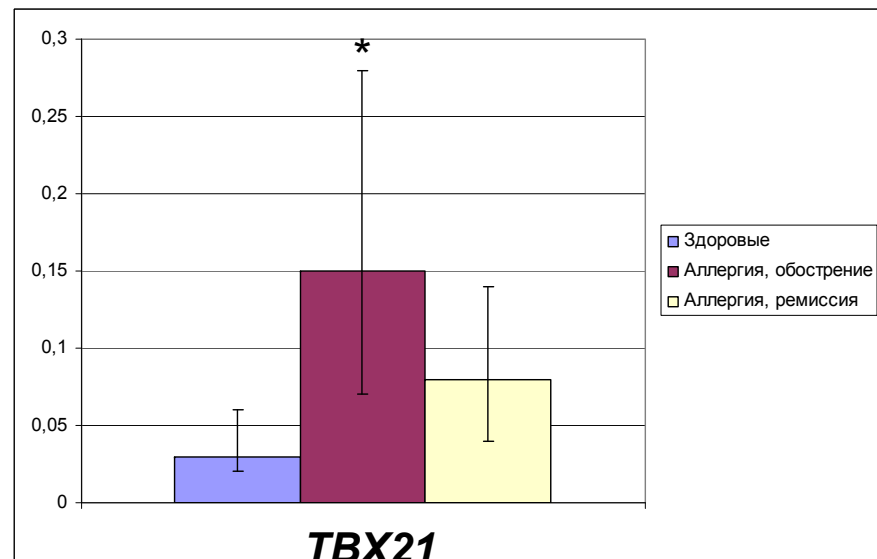
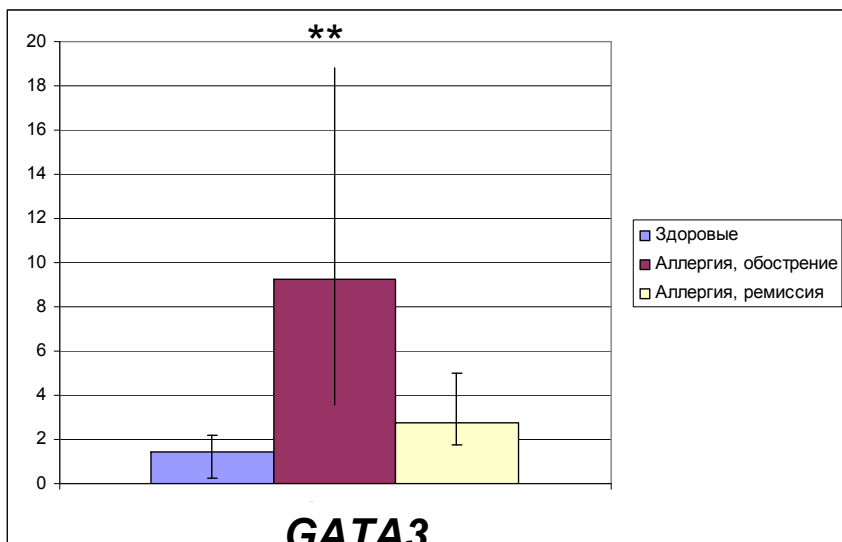
НОРМАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ Т-ХЕЛПЕРОВ



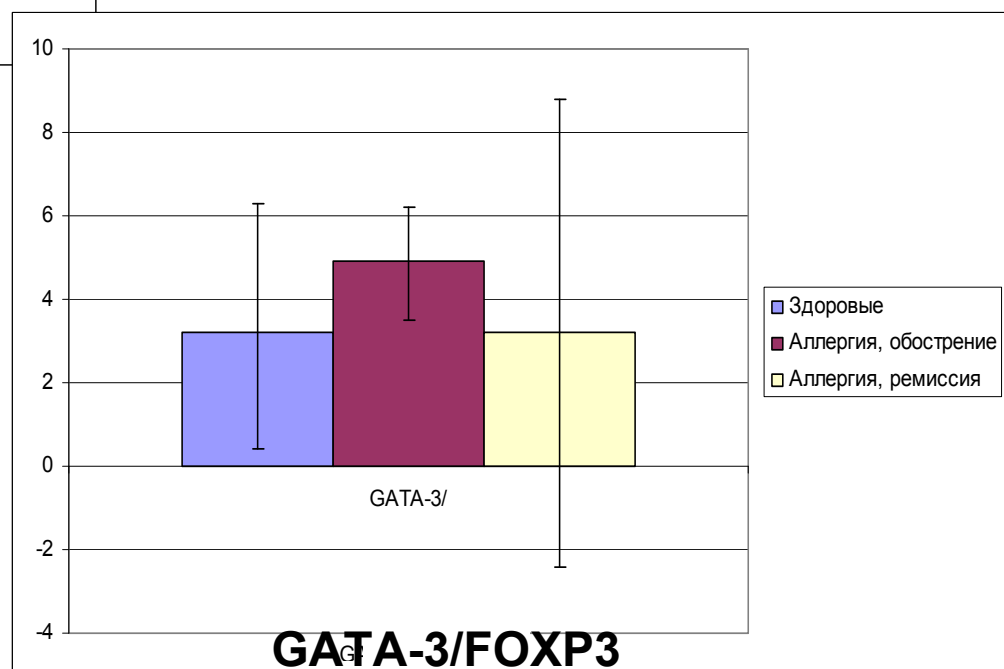
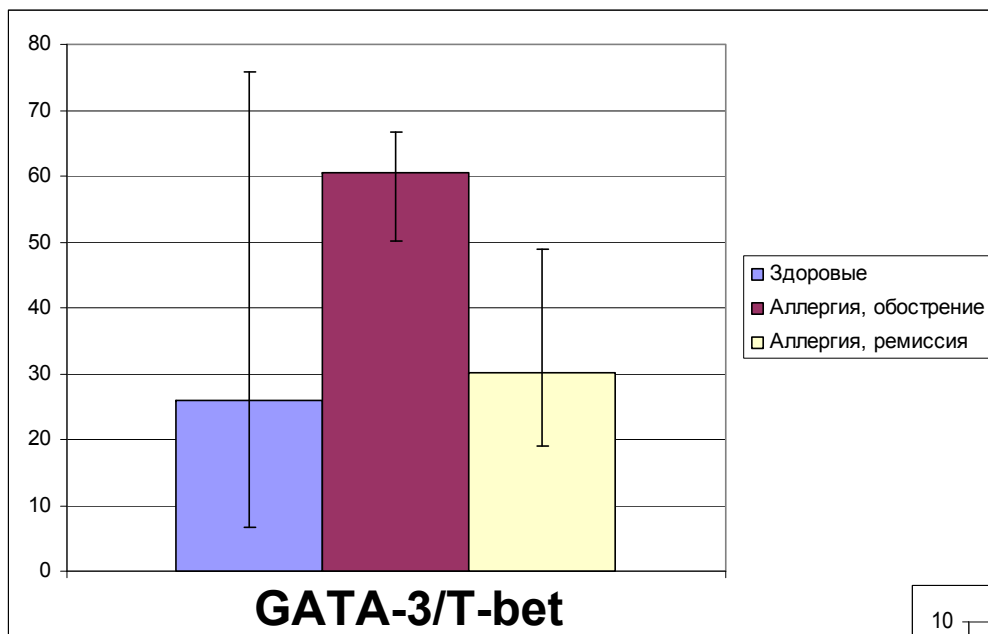
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ GATA-3 ПРИ АЛЛЕРГИИ



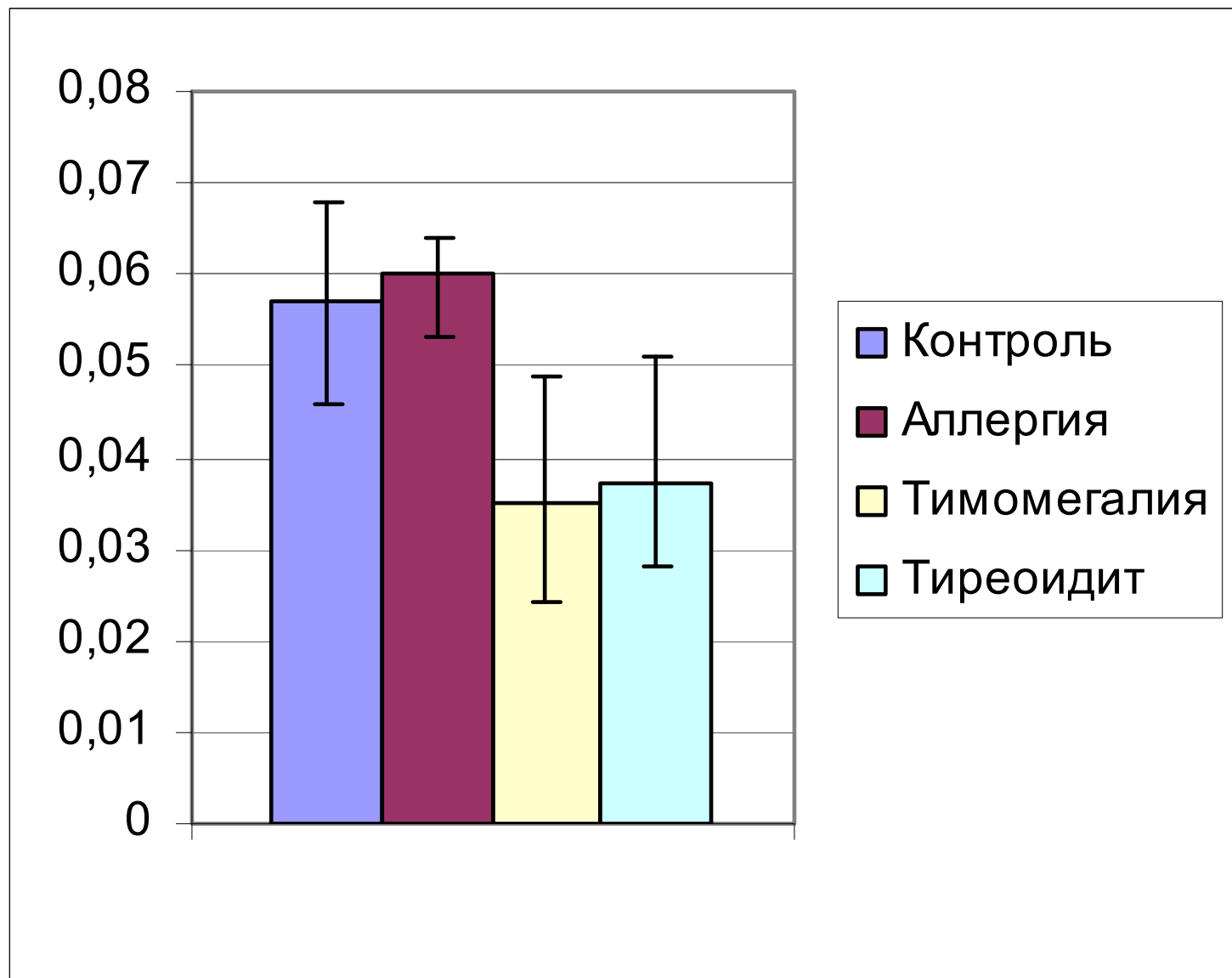
ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ Т-ХЕЛПЕРОВ ПРИ АЛЛЕРГИИ



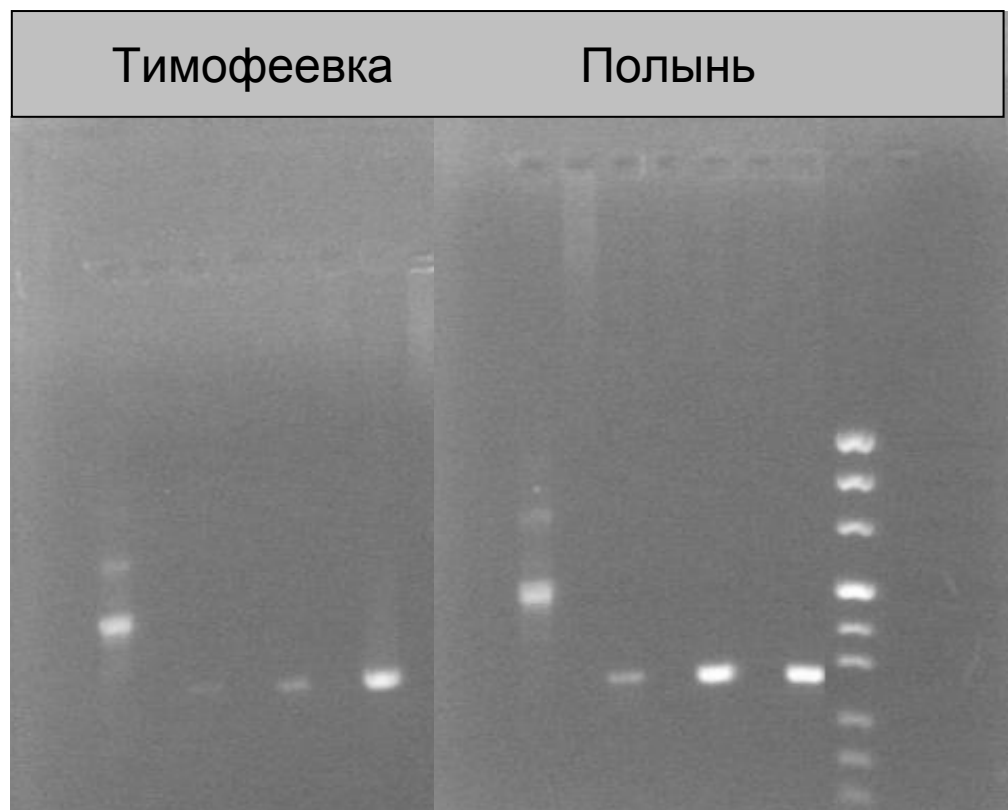
СООТНОШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ Т-ХЕЛПЕРОВ ПРИ АЛЛЕРГИИ



ЭКСПРЕССИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОГО ФАКТОРА FOXP3 ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ



УСИЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ GATA-3 В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ АЛЛЕРГЕНОВ

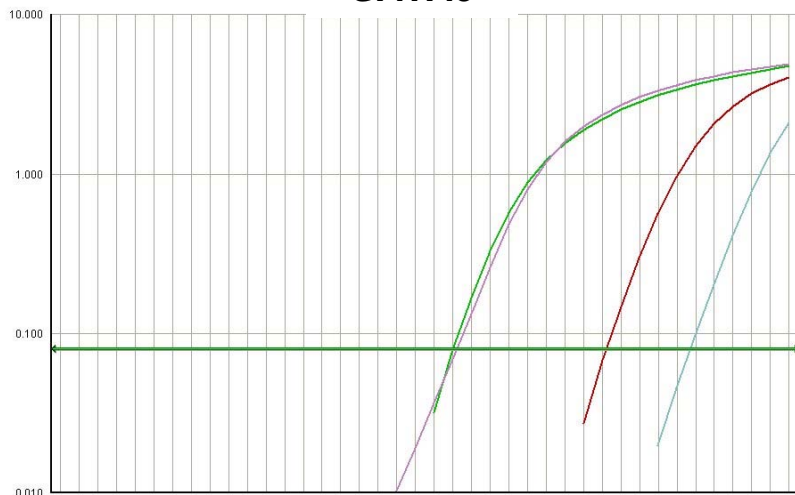


1 2 3 4 1 2 3 4 5

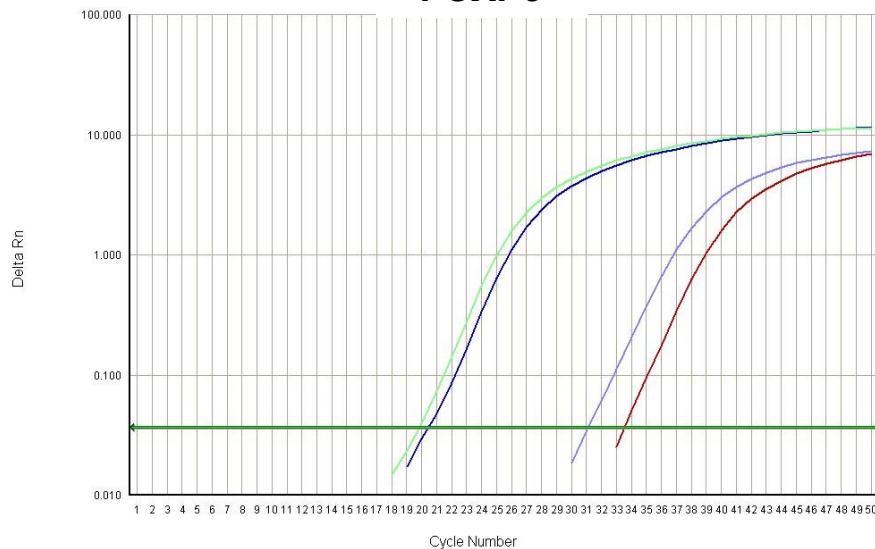
1 – контроль выделения РНК; 2 – контроль (без аллергена);
3 – аллерген, 10 нг/мл; 4 – аллерген, 1 мкг/мл; 5 – маркерная ДНК

Типичные результаты опытов по оценке влияния аллергенов на экспрессию в лимфоцитах генов *GATA3*, *TBX21* и *FOXP3*

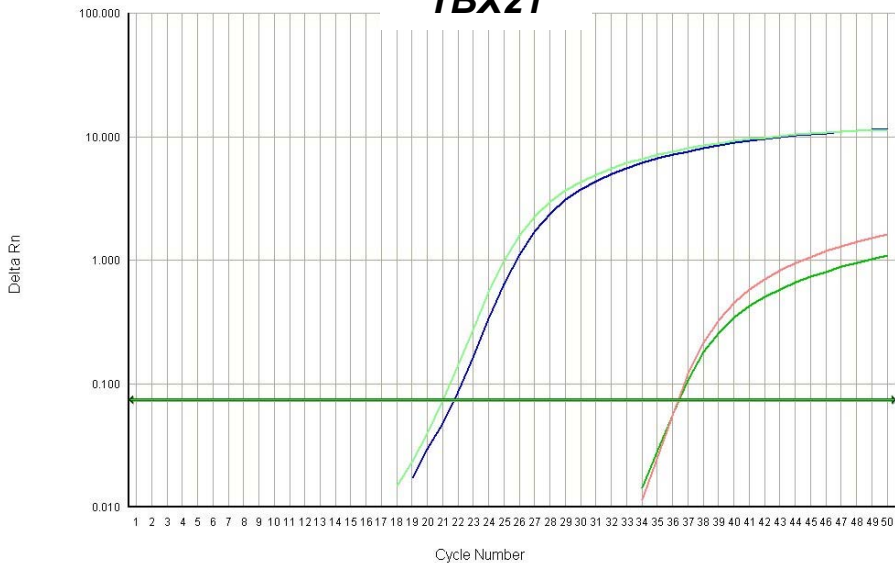
GATA3



FOXP3

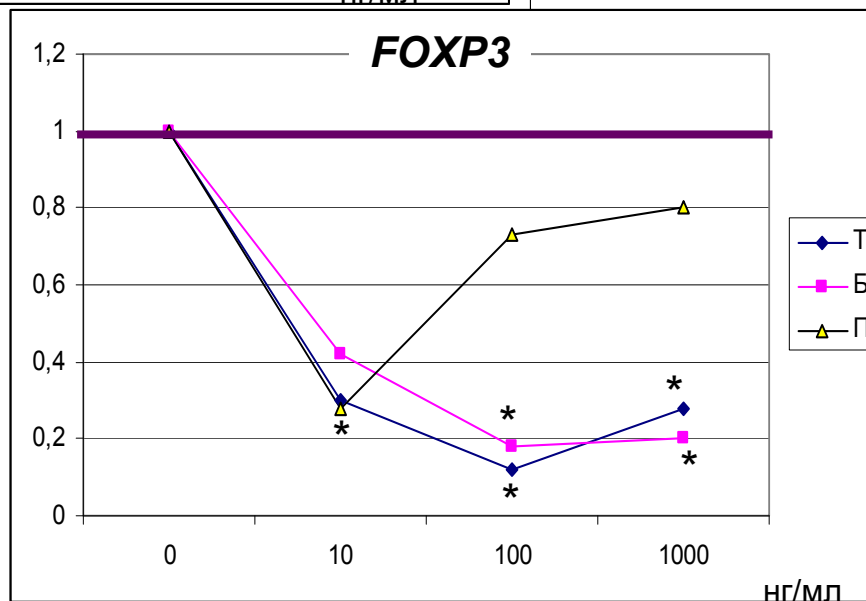
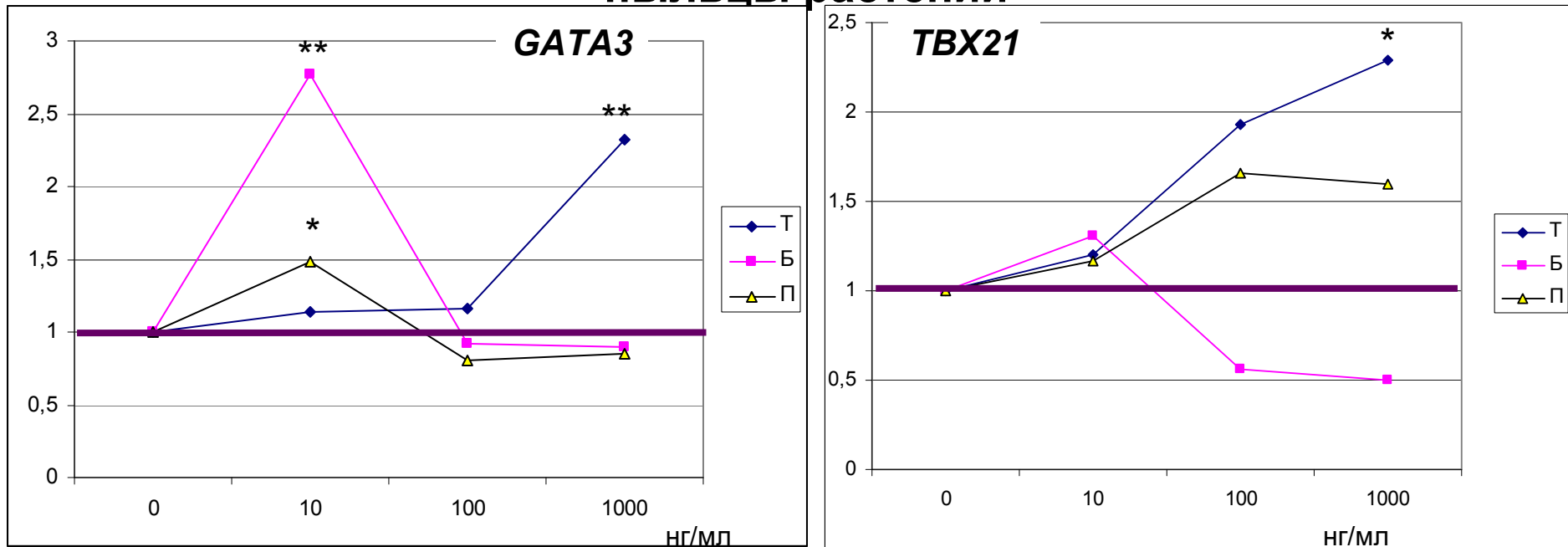


TBX21



Красная кривая – Фактор в пробе с с аллергеном
Зеленая кривая – β 2-микроглобулин в пробе с аллергеном
Голубая кривая – Фактор в пробе без аллергена (К2)
Коричневая кривая - β 2-микроглобулин в пробе без аллергена (К1)

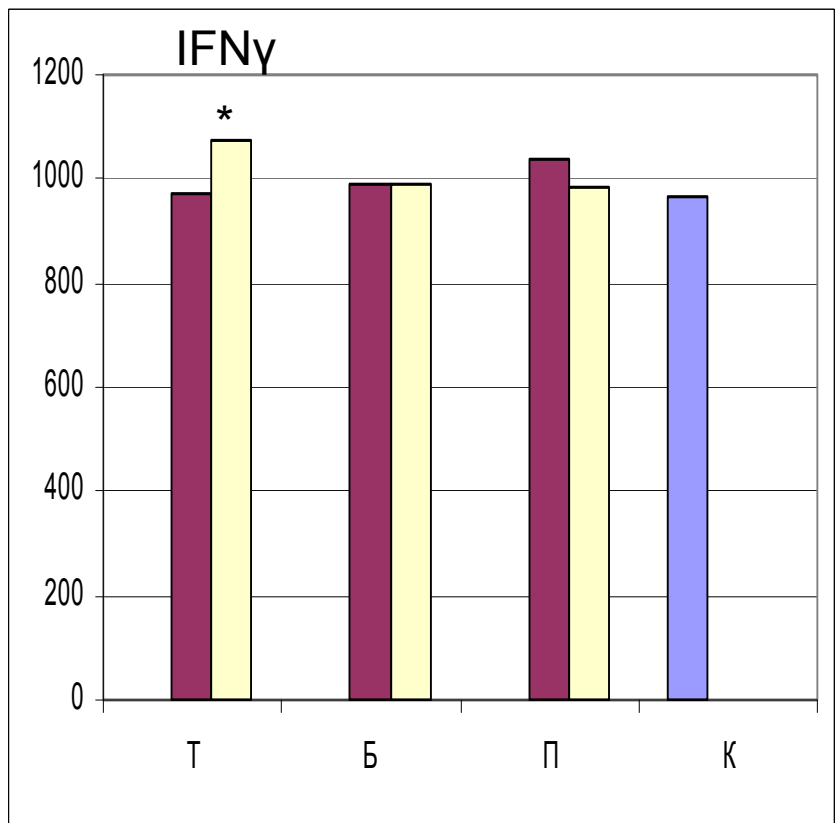
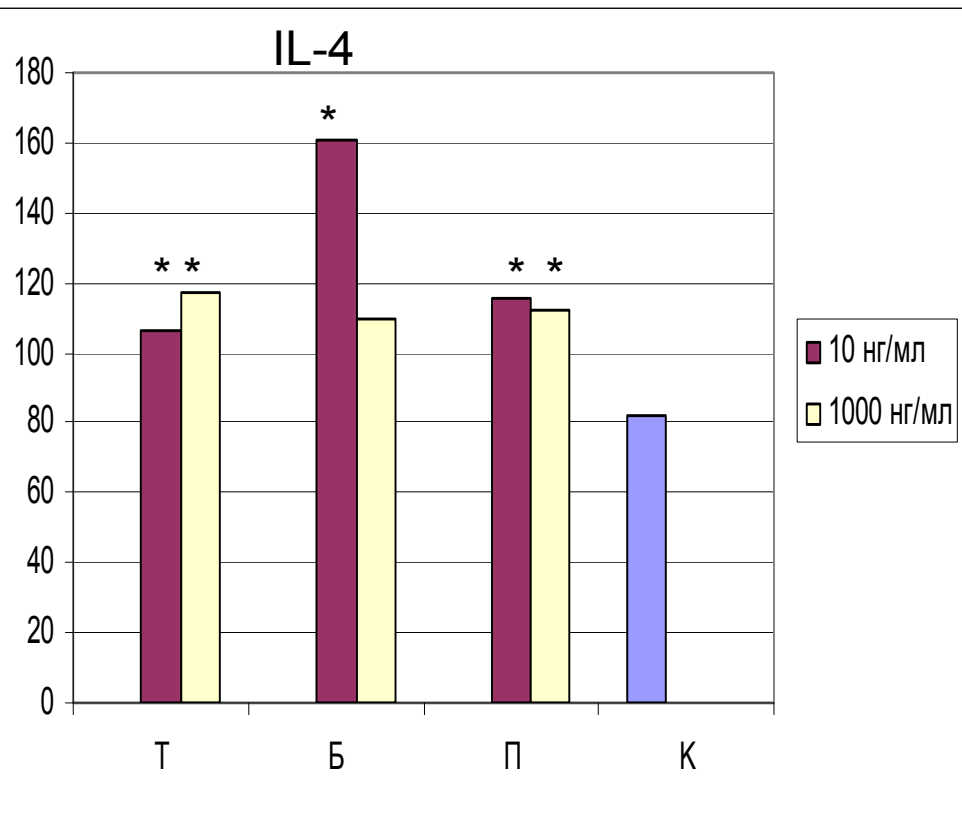
Изменение экспрессии генов *GATA3*, *TBX21* и *FOXP3* при инкубации лимфоцитов с аллергенами пыльцы растений



Источники аллергенов:
Т – тимофеевка
Б - береза
П – полынь

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Изменение уровней секреции IL-4 и IFN γ 3 при инкубации лимфоцитов с аллергенами пыльцы растений



Источники аллергенов:

Т – тимофеевка

Б - береза

П – полынь

* $p < 0,05$ относительно контроля

**Сотрудники Института иммунологии ФМБА РФ,
принимавшие участие в получении результатов,
отраженных в докладе**

- **Лаб. дифференцировки лимфоцитов:**
- **А.М.Донецкова**
- **Н.И.Шарова**
- **М.Ф.Никонова**
- **А.А.Ярилин**
- **Лаб.клинической иммунологии:**
- **М.В.Пащенко**
- **Б.В.Пинегин**
- **Лаб. моделирования иммунологических процессов:**
- **И.В.Андреев**
- **М.Н.Санков**
- **А.И.Мартынов**