



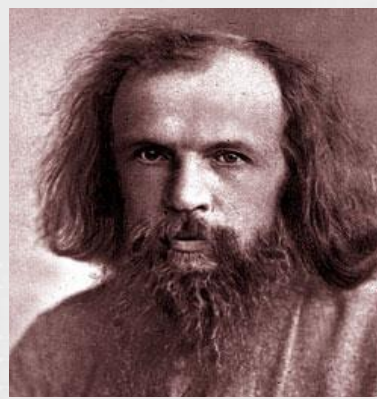
Цитокины семейства Фактора Некроза Опухолей

Лекция 2

С.А. Недоспасов

Институт Молекулярной Биологии РАН им. Энгельгардта,
Институт Физико-Химической Биологии им. Белозерского, МГУ

PERIODIC TABLE OF HUMAN CYTOKINES & CHEMOKINES



1 17.5, 26 157, 233 TNF-α Tumor Necrosis Factor Alpha TNF RI (TNFRI) TNF RII (TNFRII)	2 50 193 CD27L CD27 Ligand CD27	II/III	
4 171, 194 LT-α Lymphocyte Tumor Necrosis Factor Alpha TNF RI (TNFRI) TNF RII (TNFRII)	5 40 234 CD30L CD30 Ligand CD30	6 15-20 133 IL-2 Interleukin 2 IL2RA (CD25) IL2RB (CD132)	
13 33 244 LT-β Lymphocyte Tumor Necrosis Factor Beta LTβR	14 39 261 CD40L CD40 Ligand CD40	15 20-28 152 IL-7 Interleukin 7 IL7RA (CD127) IL7RB (CD132)	
22 26, 40 155, 281 FasL Fas Ligand Fas	23 40 250 APRIL A Proliferation Inducing Ligand TACE1 TACE2	24 30-40 126 IL-9 Interleukin 9 IL9RA (CD101)	
40 32 281 TRAIL TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand TRAIL-1 TRAIL-2	41 18, 32 152, 285 TALL-1 Tumor Associated Lipid Ligand 1 TALL-1	42 14-15 114 IL-15 Interleukin 15 IL15RA (CD129) IL15RB (CD128)	
58 177, 317 TRANCE Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand TRANCE	59 254 4-1BBL 4-1BB Ligand 4-1BBL	60 15-19 129 IL-4 Interleukin 4 IL4RA (CD124) IL4RB (CD132)	
76 29 240 LIGHT Lymphocyte Tumor Necrosis Factor-Induced Gene 1 LIGHT	77 32 183 OX40L OX40 Ligand OX40	78 9, 17 112 IL-13 Interleukin 13 IL13RA1 (CD122) IL13RA2 (CD129)	
79 18, 30, 35 157, 249 TWEAK Tumor Necrosis Factor-Induced 1 TWEAK	80 177 GITRL GITR Ligand GITR		

KEY

Note: Number in Circle indicates the number of amino acids in the mature protein.

1 17.5, 26 157, 233 TNF-α Tumor Necrosis Factor Alpha TNF RI (TNFRI) TNF RII (TNFRII)
--

Molecular Weight (kDa)

Amino Acids

Cytokine Abbreviation

Full Name

Receptors [R₁ (M1)]
[R₂ (M2)]
[R₃ (M3)]

Cytokine Family

IL-1

IL-2

IL-3

IL-4

IL-5

IL-6

IL-7

IL-8

IL-9

IL-10

IL-11

IL-12

IL-13

IL-14

IL-15

IL-16

IL-17

IL-18

IL-19

IL-20

IL-21

IL-22

IL-23

IL-24

IL-25

IL-26

IL-27

IL-28

IL-29

IL-30

IL-31

IL-32

IL-33

IL-34

IL-35

IL-36

IL-37

IL-38

IL-39

IL-40

IL-41

IL-42

IL-43

IL-44

IL-45

IL-46

IL-47

IL-48

IL-49

IL-50

IL-51

IL-52

IL-53

IL-54

IL-55

IL-56

IL-57

IL-58

IL-59

IL-60

IL-61

IL-62

IL-63

IL-64

IL-65

IL-66

IL-67

IL-68

IL-69

IL-70

IL-71

IL-72

IL-73

IL-74

IL-75

IL-76

IL-77

IL-78

IL-79

IL-80

IL-81

IL-82

IL-83

IL-84

IL-85

IL-86

IL-87

IL-88

IL-89

IL-90

IL-91

IL-92

IL-93

IL-94

IL-95

IL-96

IL-97

IL-98

IL-99

IL-100

IL-101

IL-102

IL-103

IL-104

IL-105

IL-106

IL-107

IL-108

IL-109

IL-110

IL-111

IL-112

IL-113

IL-114

IL-115

IL-116

IL-117

IL-118

IL-119

IL-120

IL-121

IL-122

IL-123

IL-124

IL-125

IL-126

IL-127

IL-128

IL-129

IL-130

IL-131

IL-132

IL-133

IL-134

IL-135

IL-136

IL-137

IL-138

IL-139

IL-140

IL-141

IL-142

IL-143

IL-144

IL-145

IL-146

IL-147

IL-148

IL-149

IL-150

IL-151

IL-152

IL-153

IL-154

IL-155

IL-156

IL-157

IL-158

IL-159

IL-160

IL-161

IL-162

IL-163

IL-164

IL-165

IL-166

IL-167

IL-168

IL-169

IL-170

IL-171

IL-172

IL-173

IL-174

IL-175

IL-176

IL-177

IL-178

IL-179

IL-180

IL-181

IL-182

IL-183

IL-184

IL-185

IL-186

IL-187

IL-188

IL-189

IL-190

IL-191

IL-192

IL-193

IL-194

IL-195

IL-196

IL-197

IL-198

IL-199

IL-200

IL-201

IL-202

IL-203

IL-204

IL-205

IL-206

IL-207

IL-208

IL-209

IL-210

IL-211

IL-212

IL-213

IL-214

IL-215

IL-216

IL-217

IL-218

IL-219

IL-220

IL-221

IL-222

IL-223

IL-224

IL-225

IL-226

IL-227

IL-228

IL-229

IL-230

IL-231

IL-232

IL-233

IL-234

IL-235

IL-236

IL-237

IL-238

IL-239

IL-240

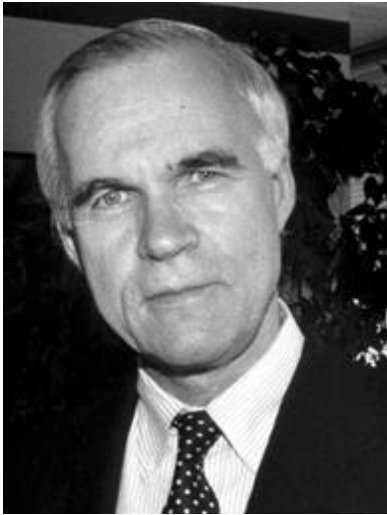
IL-241

IL-242

Фактор некроза опухолей (ФНО, $TNF\alpha$)

- Многофункциональный цитокин (мономер-17кД).
- Передает сигналы как клеточной смерти, так и активации экспрессии генов.
- Используется в некоторых протоколах противоопухолевой терапии.
- Связан с развитием септического шока.
- Играет важную роль в развитии иммунного ответа и воспаления, и в поддержании архитектуры вторичных лимфоидных органов
- Связан с развитием аутоиммунных заболеваний.

Доска Почета по отделу ФНО



Lloyd Old



Bharat Aggarwal



David Goeddel



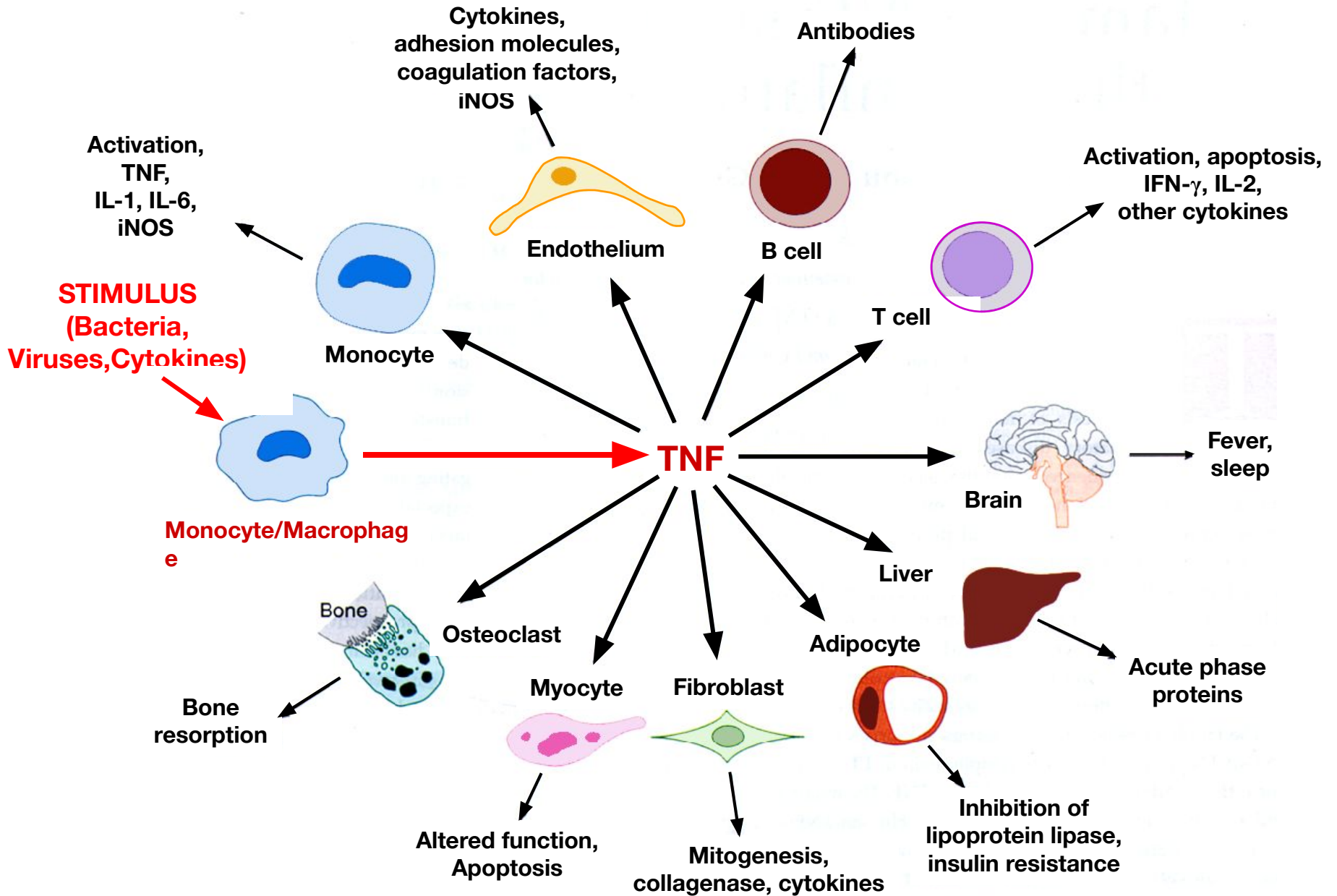
Bruce Beutler



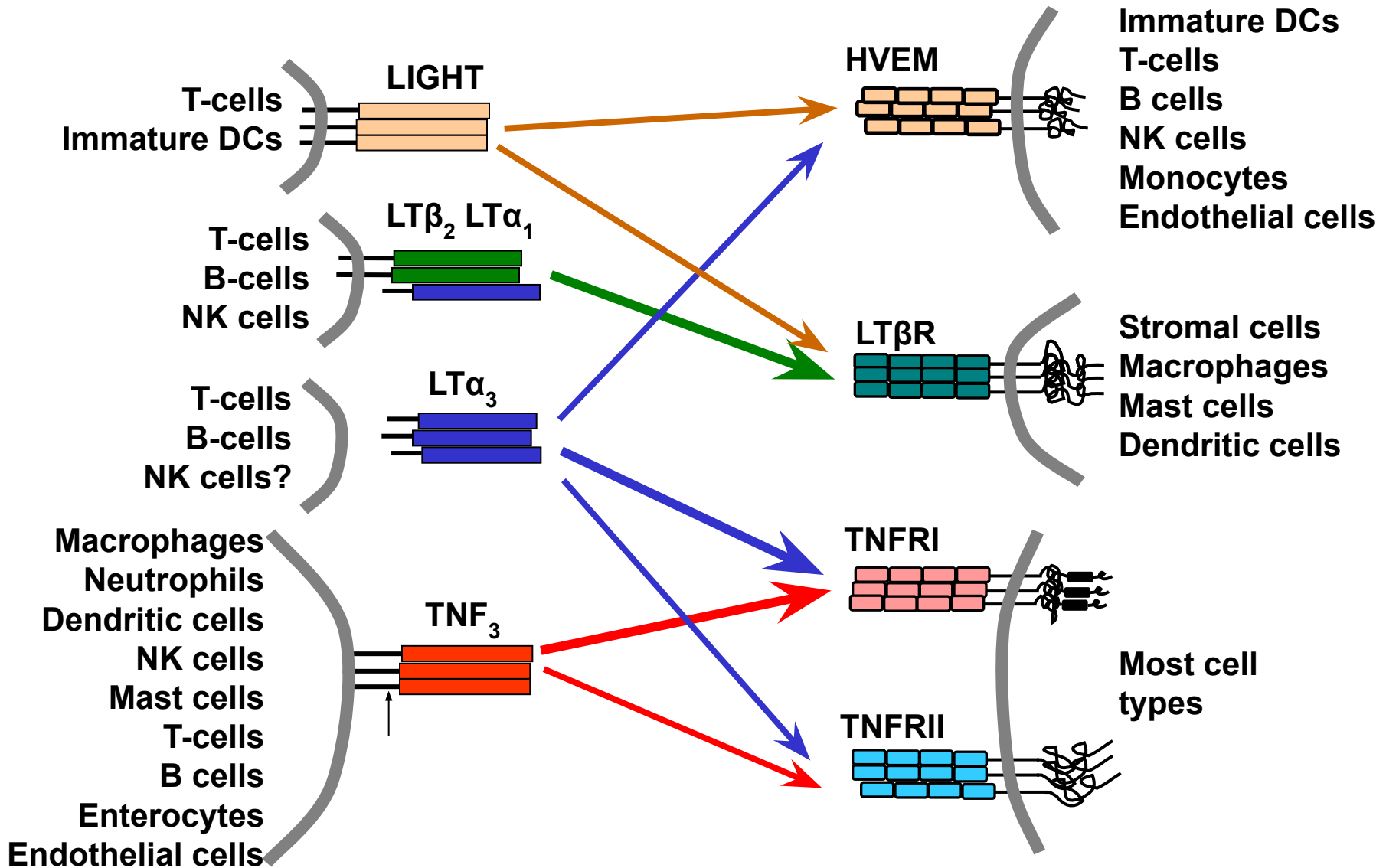
George Kollias

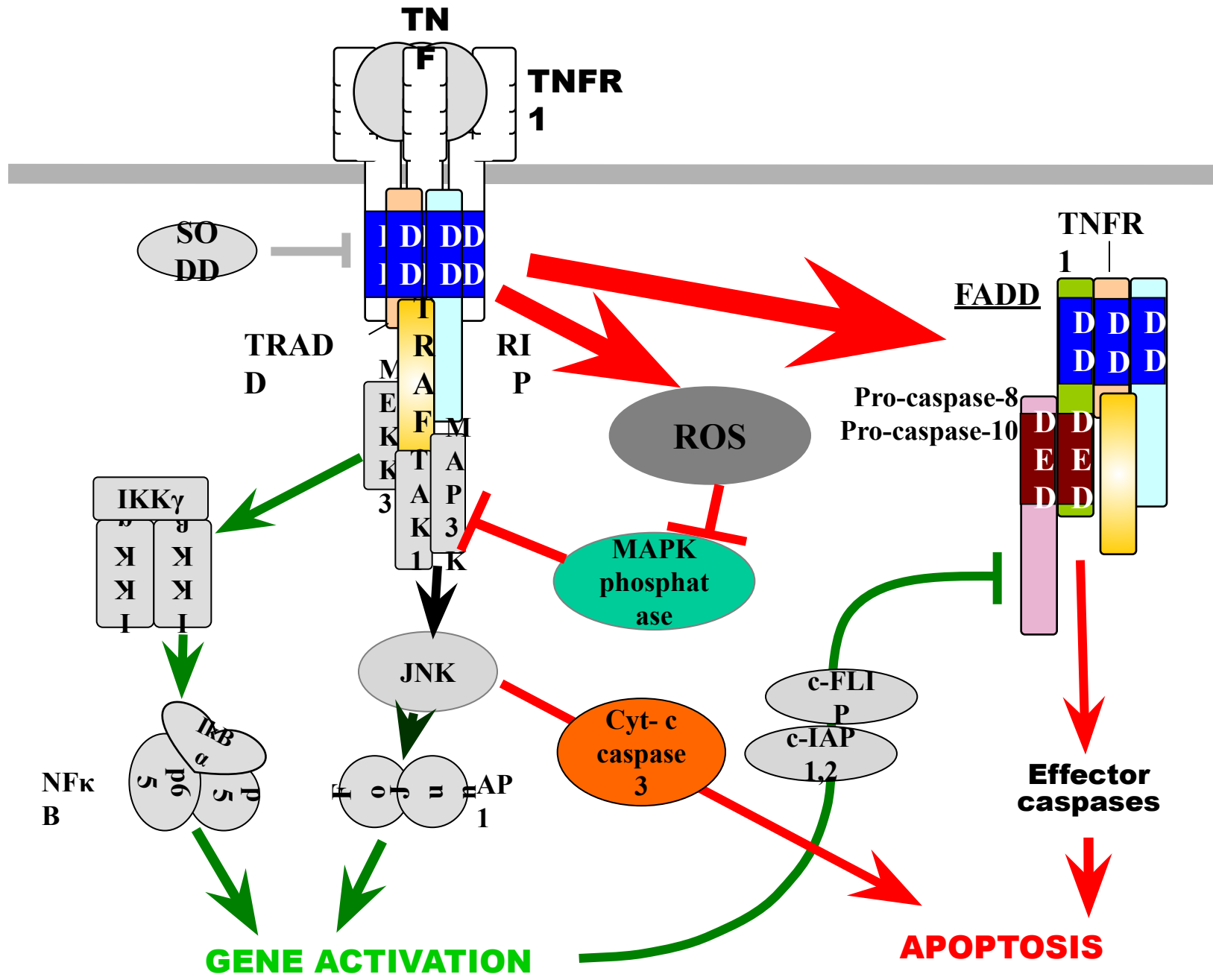
**Благодарность за помощь
в подготовке лекций**

**Дмитрий Купраш
Сергей Гривенников
Ян Вилчек**

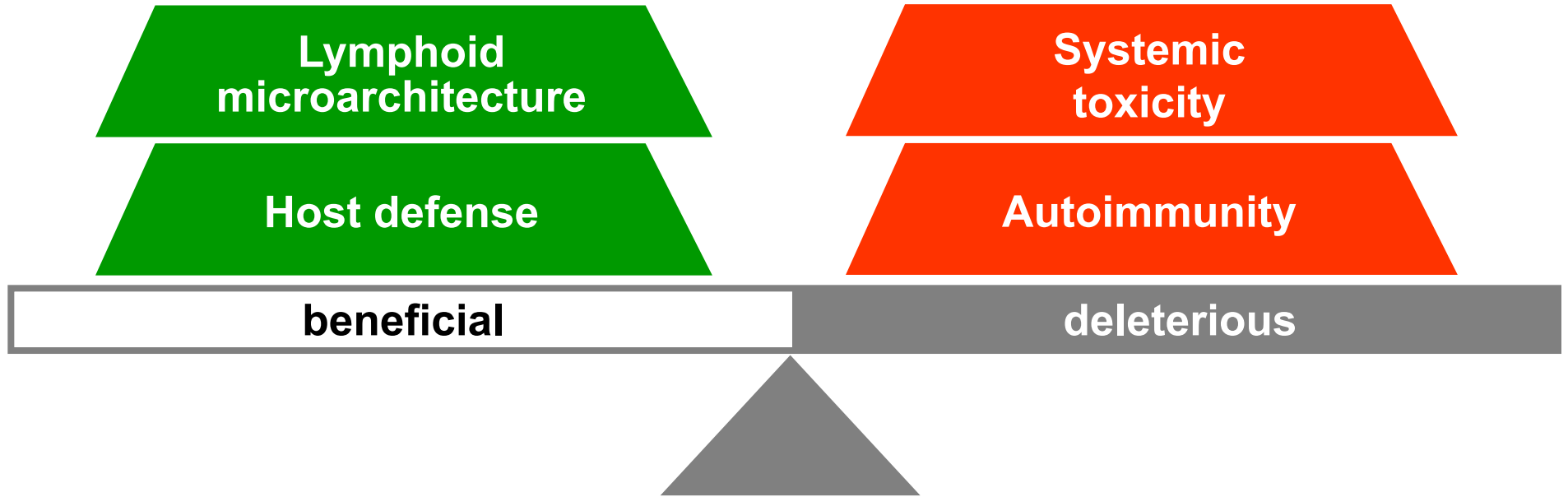


Ligands and Receptors of the LT-TNF Subfamily

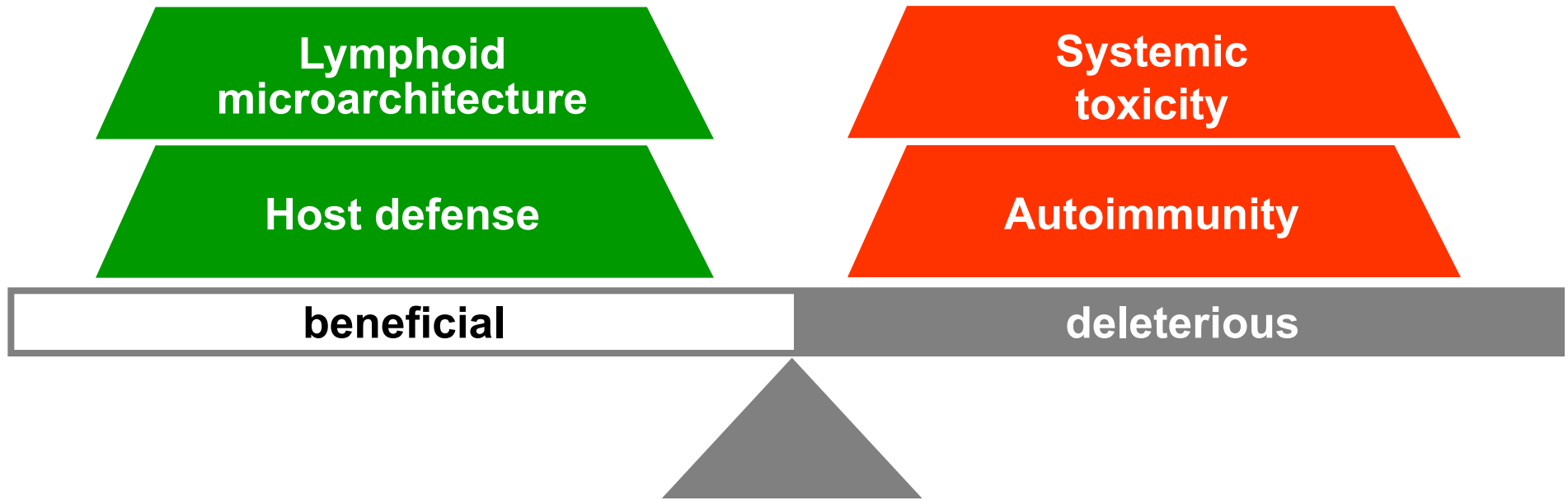




«Плохой» и «хороший» TNF *in vivo*.

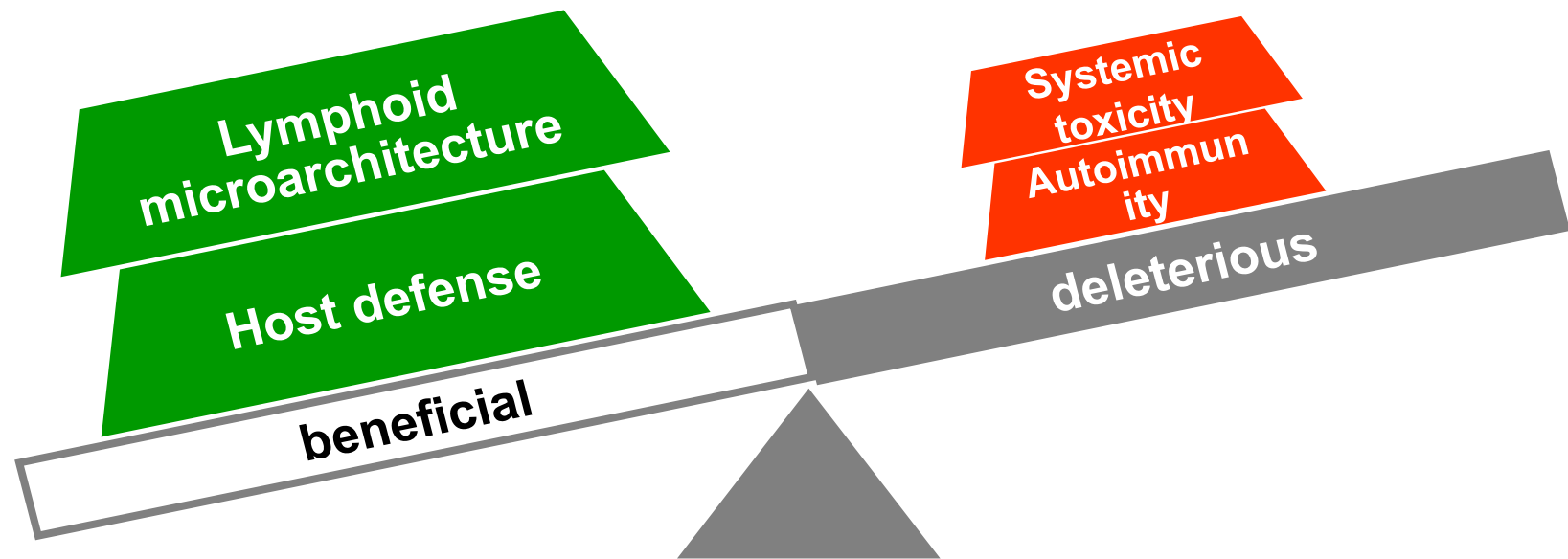


«Плохой» и «хороший» ФНО *in vivo*.



Как ФНО, продуцируемый индивидуальными типами клеток, вносит вклад в баланс между «плохим» и «хорошим»?

Баланс «полезных» и «вредных» свойств ФНО

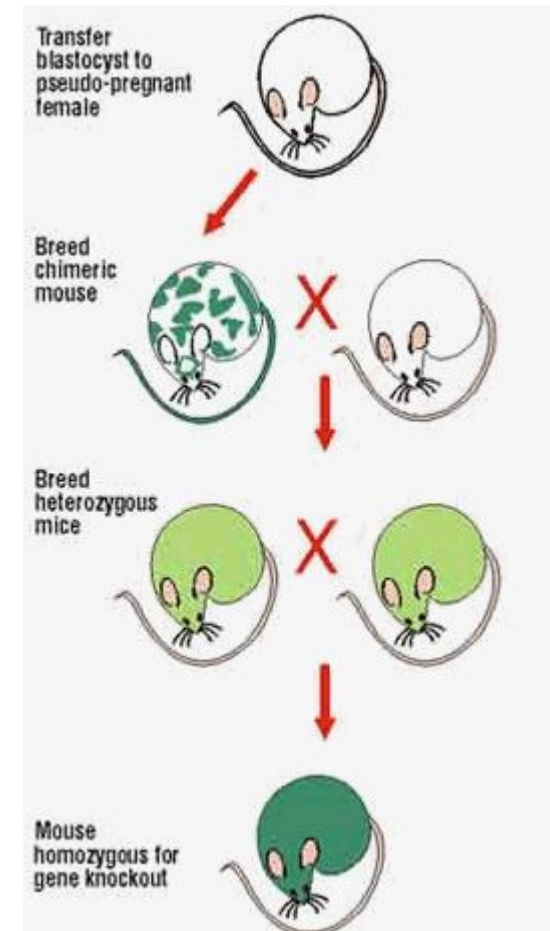
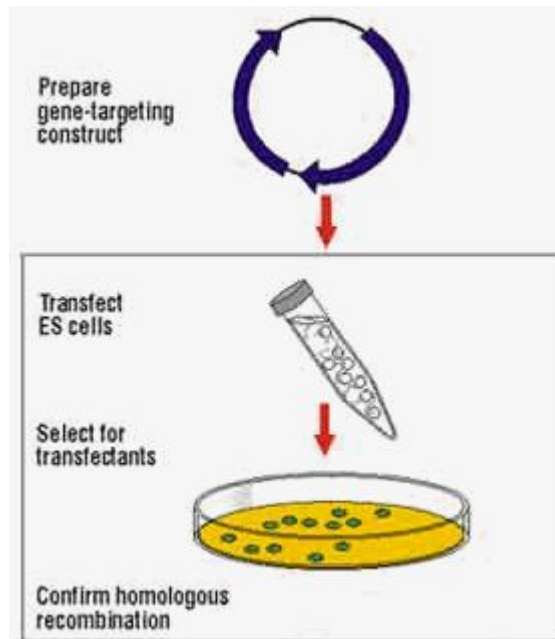


Что произойдет при системном блокировании ФНО у больных (препараты Infliximab, Etanercept)?
- Инфекции (ТБ), лимфомы?

Краткое введение в нокауты: «обратная» генетика

1. **Генетический нокаут: изучение физиологических последствий инактивации одного единственного гена.**
2. ***Проблема №1:* из-за вырожденности функций близкородственных генов генетический нокаут может не «вскрыть» всех физиологических функций продукта гена.**
3. ***Проблема №2:* практически при любой технологии генетического нокаута нельзя полностью исключить нарушения регуляции соседних генов.**
4. ***Проблема №3:* точечная мутация может давать другой фенотип, чем нокаут. (Технология «нок-ин» позволяет воссоздать организм с выбранной точечной мутацией).**

Стадии генетического нокаута

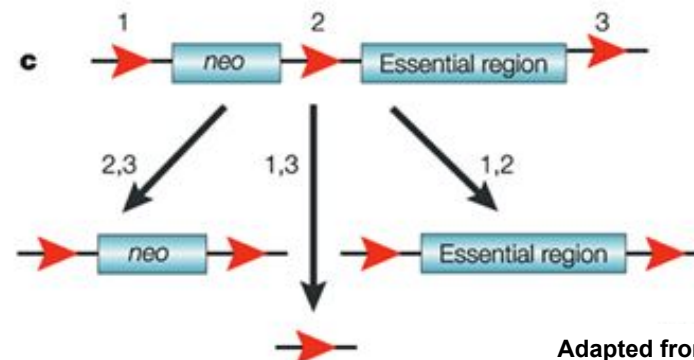
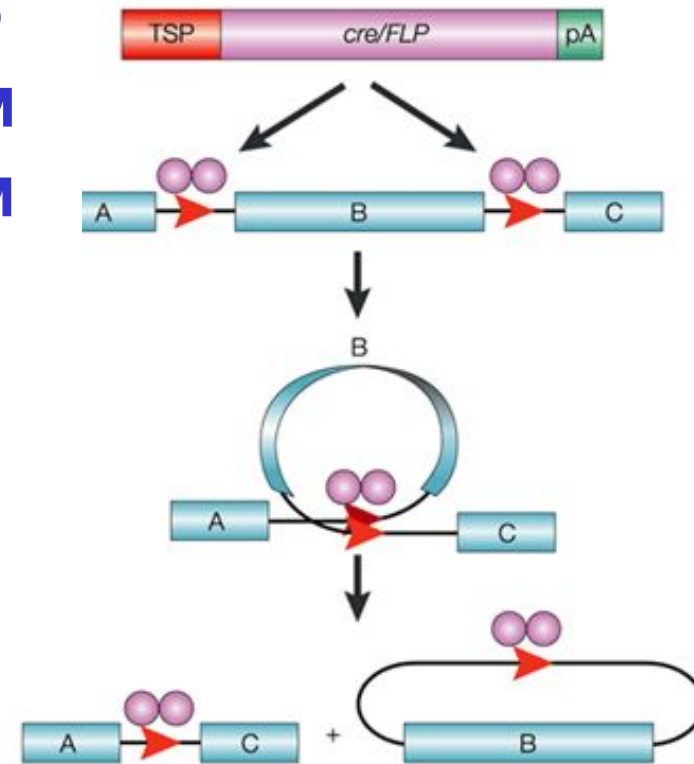


Технология генетического нокаута с использованием Cre/loxP или Flp/Frt систем (precision targeting)

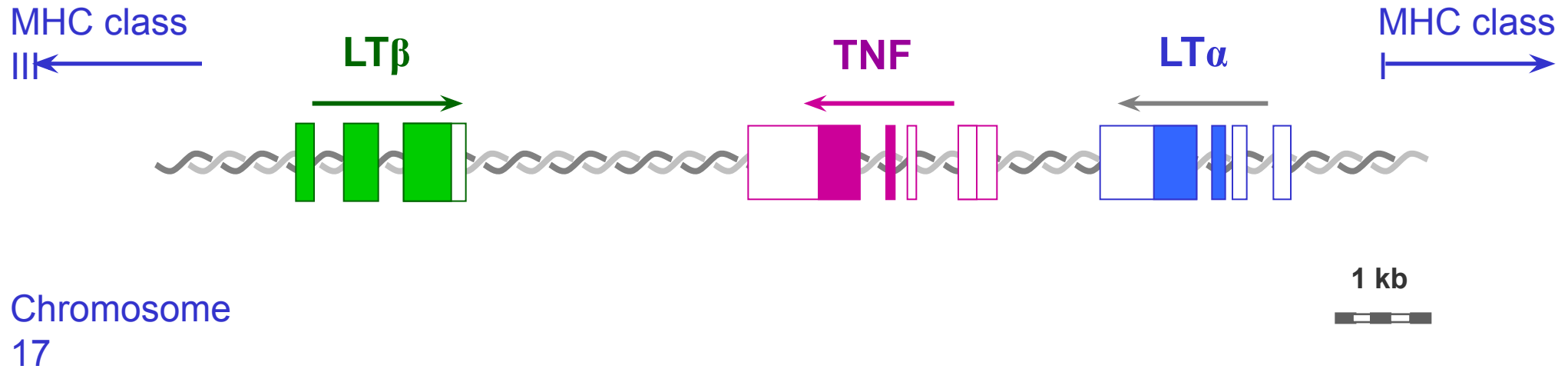
a

loxP
ATAACTTCGTATAATGATGCTATACGAAGTTAT

FRT
CTTCAAGGATAAGAGATCTTTGTATAGGAAGTTC



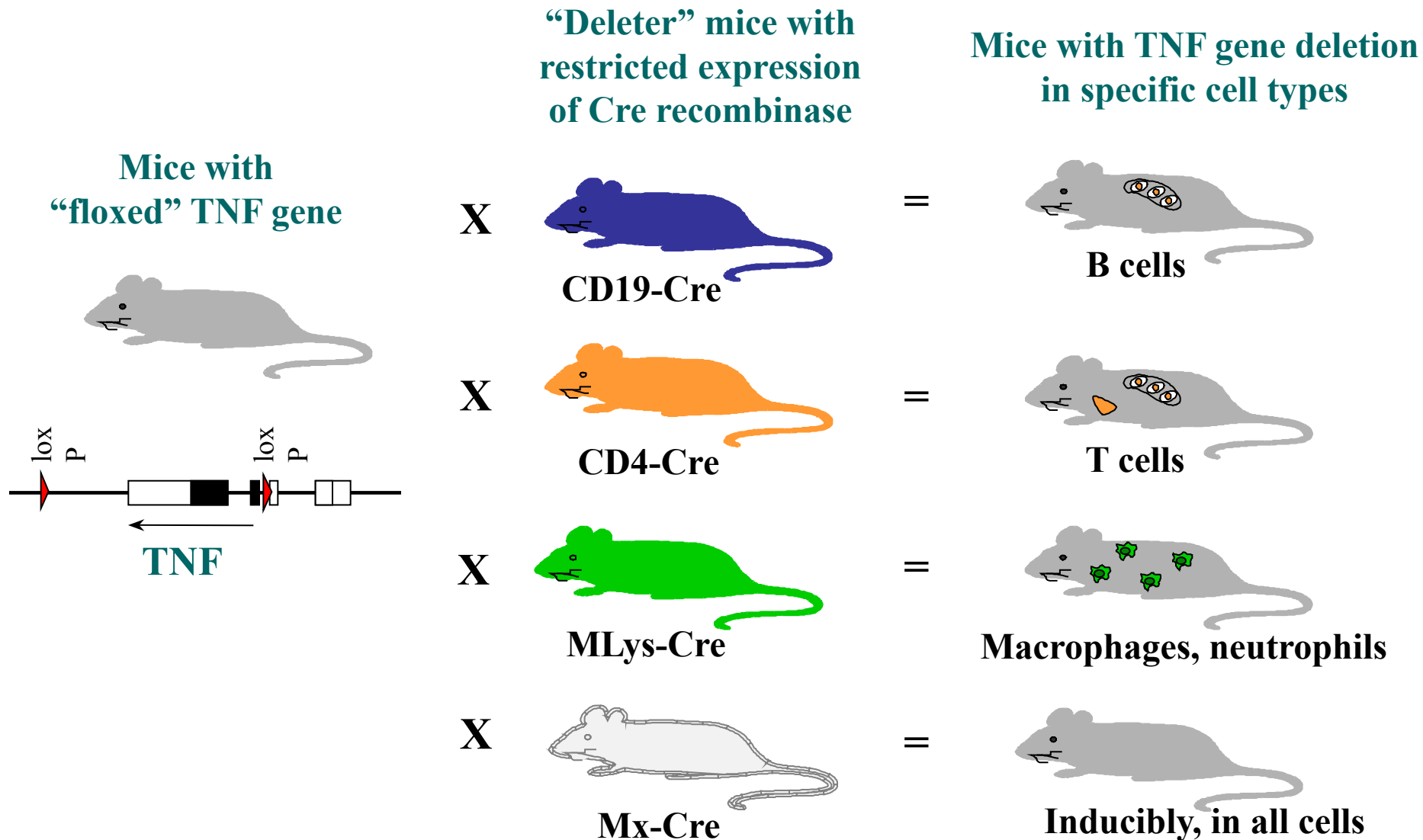
Мишень для генетических манипуляций: локус ФНО-ЛТ мыши



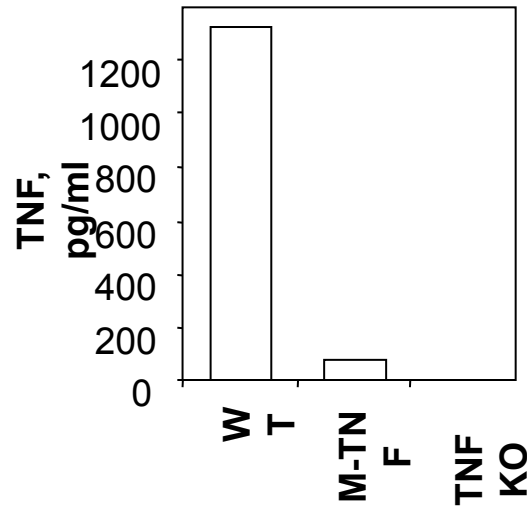
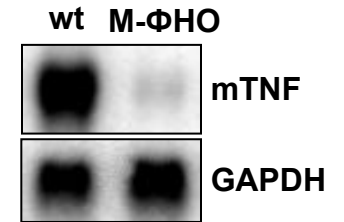
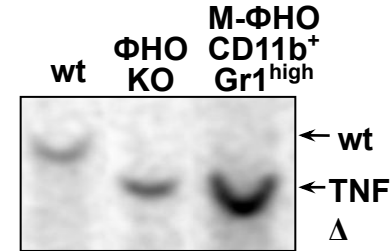
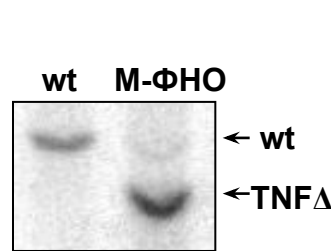
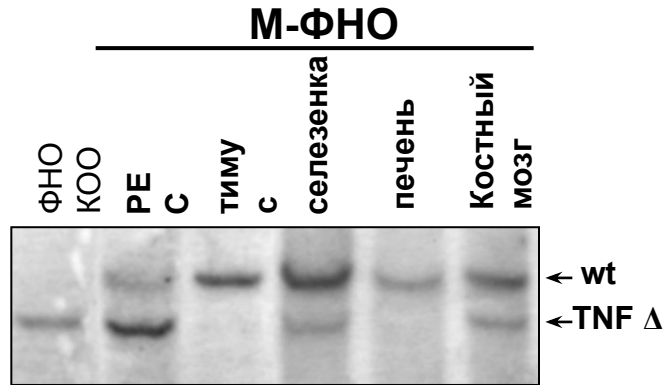
Receptors:

TNFR1	Mouse chromosome 6
LTβR	Mouse chromosome 6
TNFR2	Mouse chromosome 4

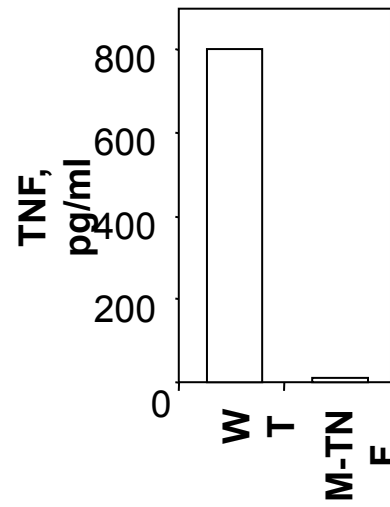
Панель мышей с *кондиционной* инактивацией гена ФНО



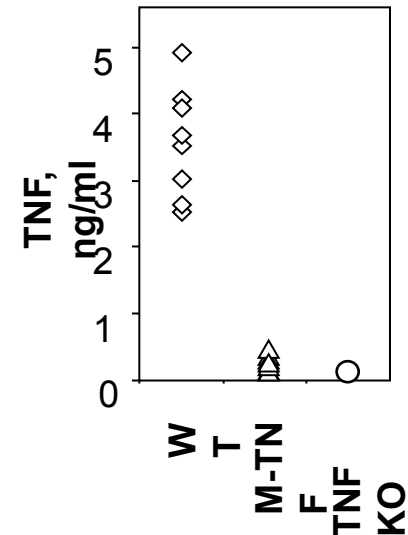
Эффективность и специфичность делеции гена ФНО в М-ФНО мышах



клетки брюшной полости

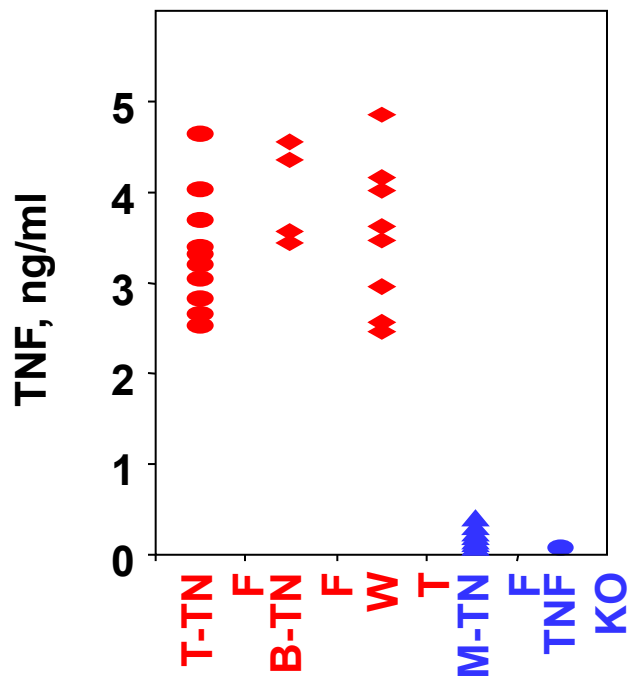


нейтрофилы

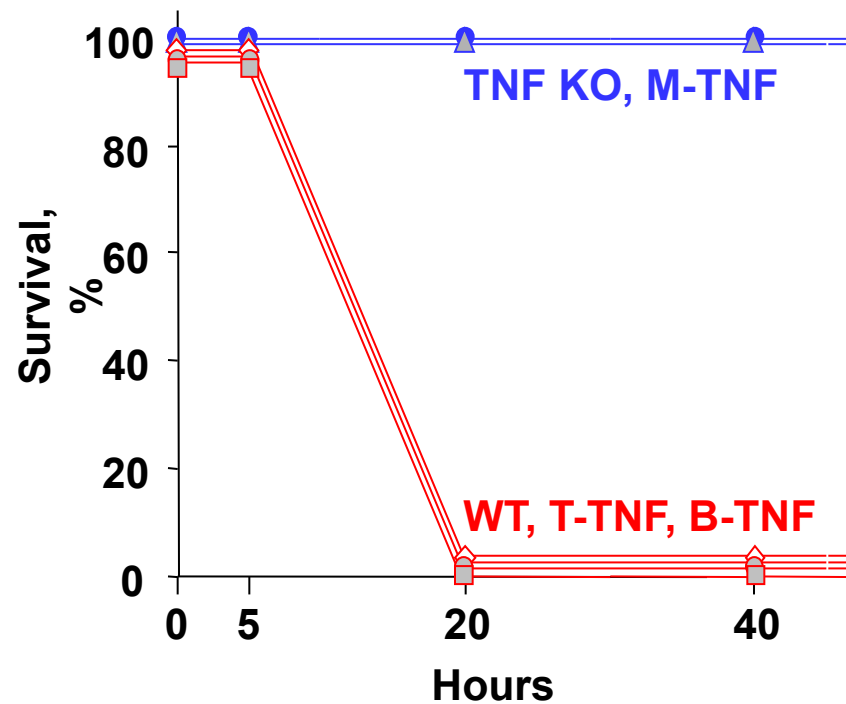


сыворотка

Макрофаги и нейтрофилы являются главным источником «системного» ФНО

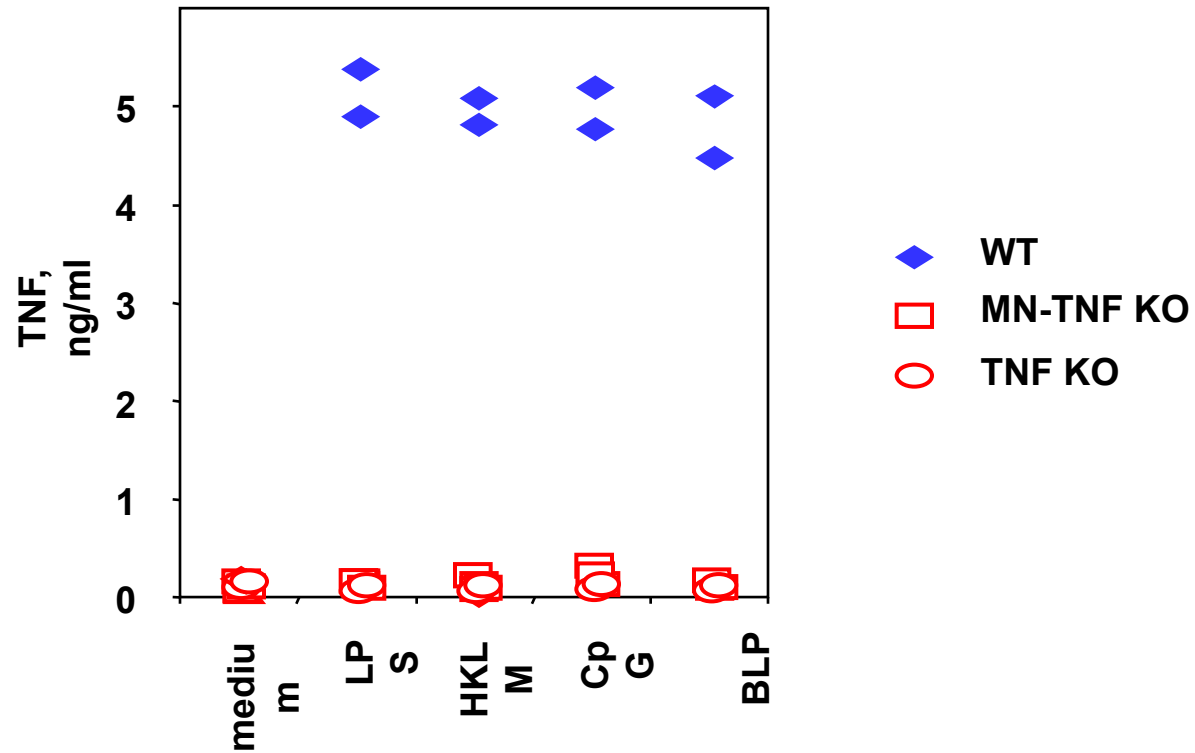


Уровень ФНО в сыворотке



ЛПС / D-Gal токсичность

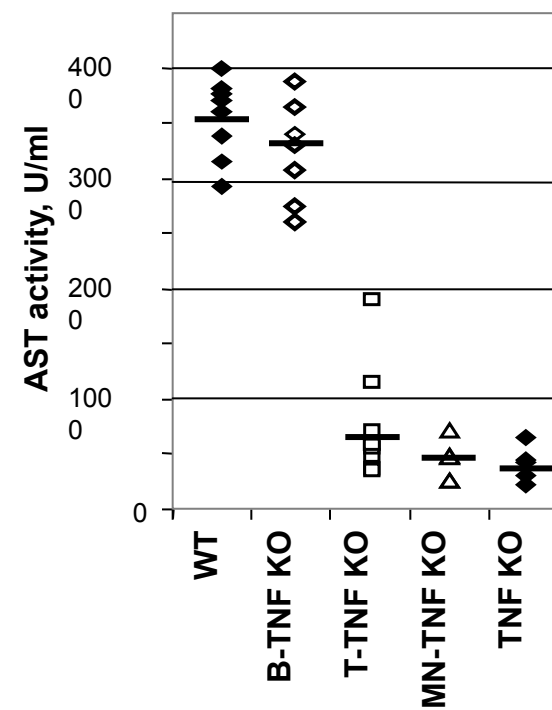
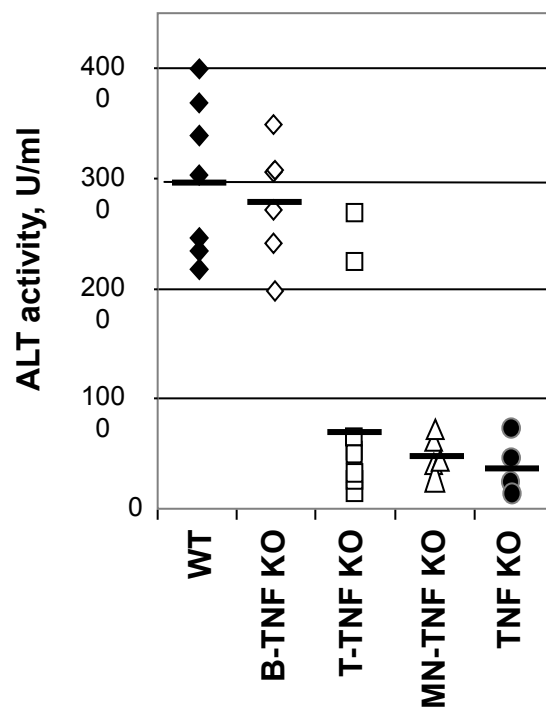
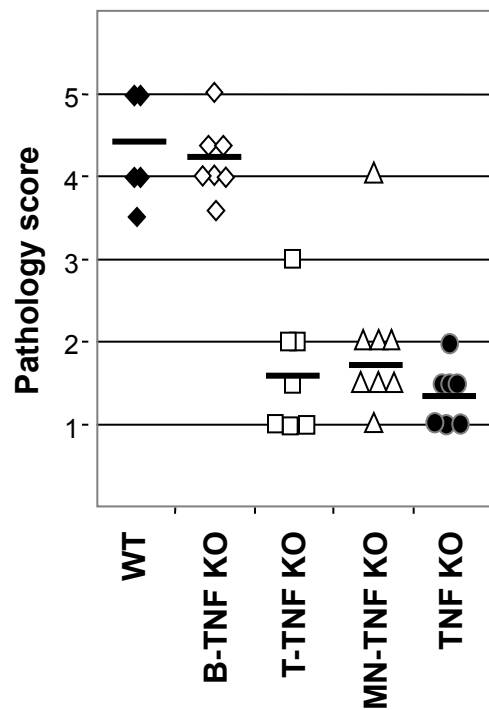
ФНО является геном-мишенью при активации многих TLR рецепторов



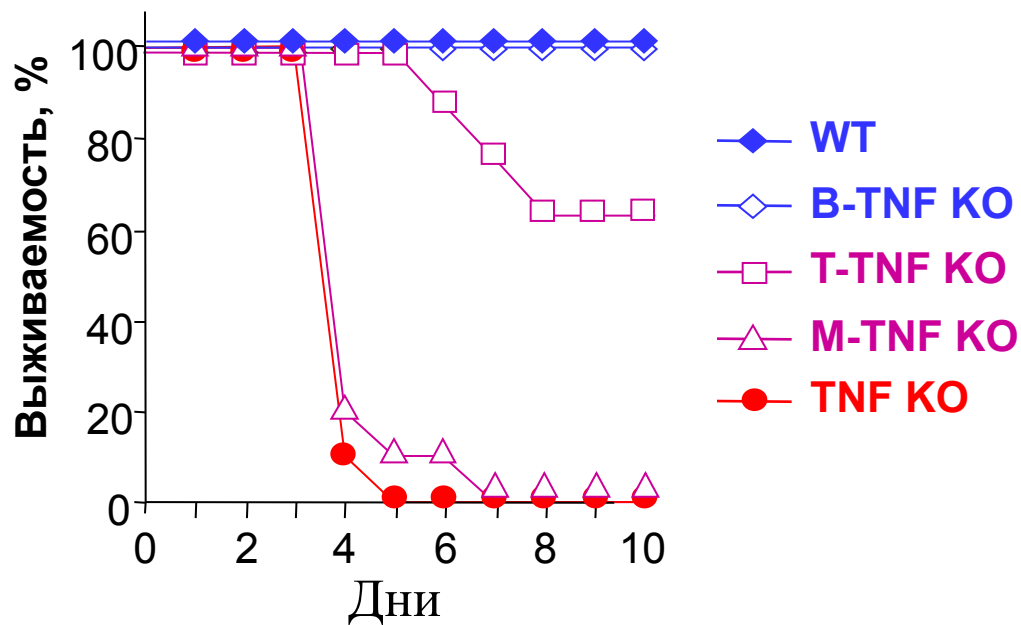
ФНО, продуцируемый как макрофагами, так и Т лимфоцитами, является медиатором токсичности к продукту Грам-положительных бактерий, SEB

	Type of challenge/pathophysiological model				
Mice	SEB/D-Gal	LPS			
	100 µg/20mg	0,4 mg	0,7 mg	1 mg	1,5 mg
WT, TNF floxed	8/10	0/5	8/13	6/6	5/5
MN-TNF KO	3/10	0/7	4/8	8/9	9/10
T-TNF KO	1/10	-	5/10	5/5	5/5
TNF KO	0/10	0/7	2/11	6/12	8/10

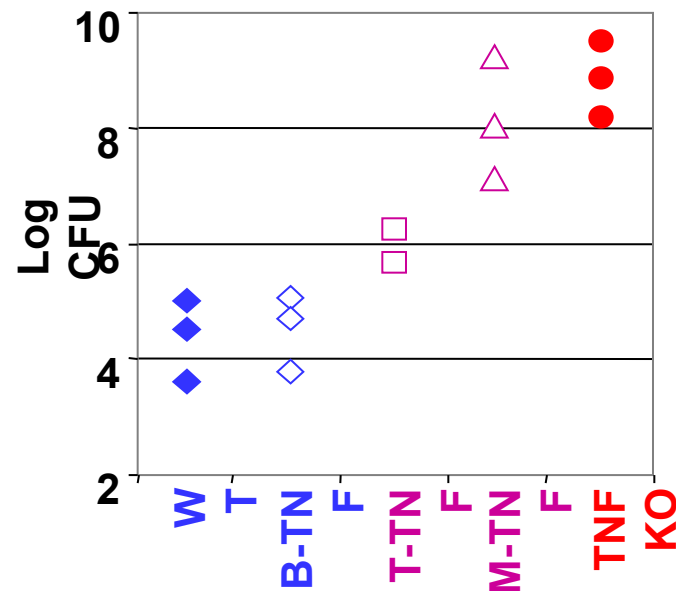
Как T-ФНО, так и MN-TNF, являются медиаторами экспериментального аутоиммунного гепатита



ФНО, производимый как макрофагами, так и Т клетками, необходим для защиты от инфекции внутриклеточными патогенами



Листерия -модель
внутриклеточного патогена



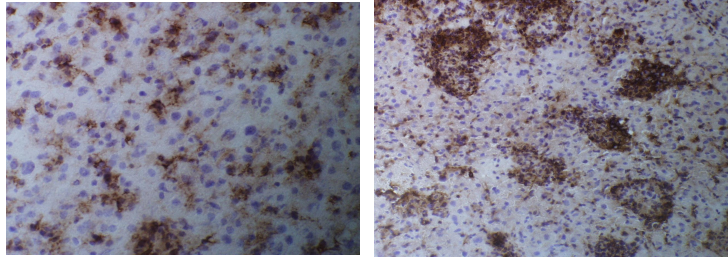
Количество бактерий в
печени

TNF induces granuloma formation and antibacterial mechanisms

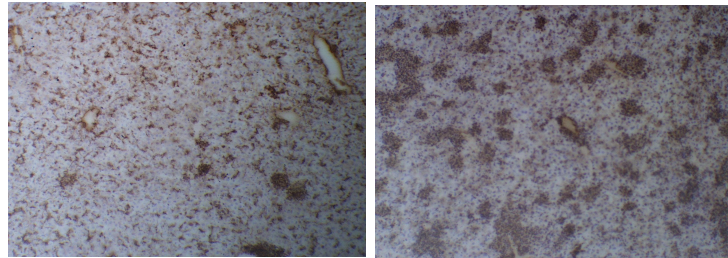
TNF KO

WT

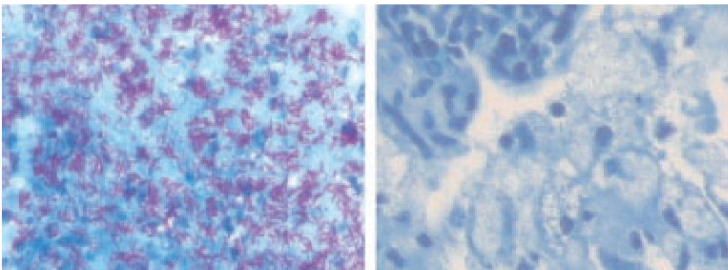
CD11b



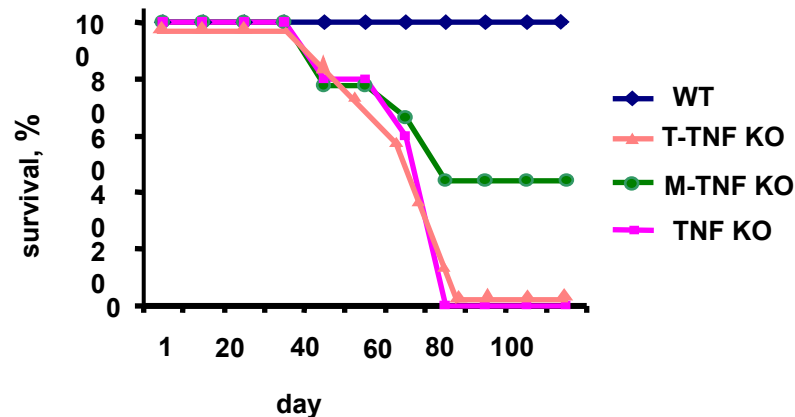
iNOS



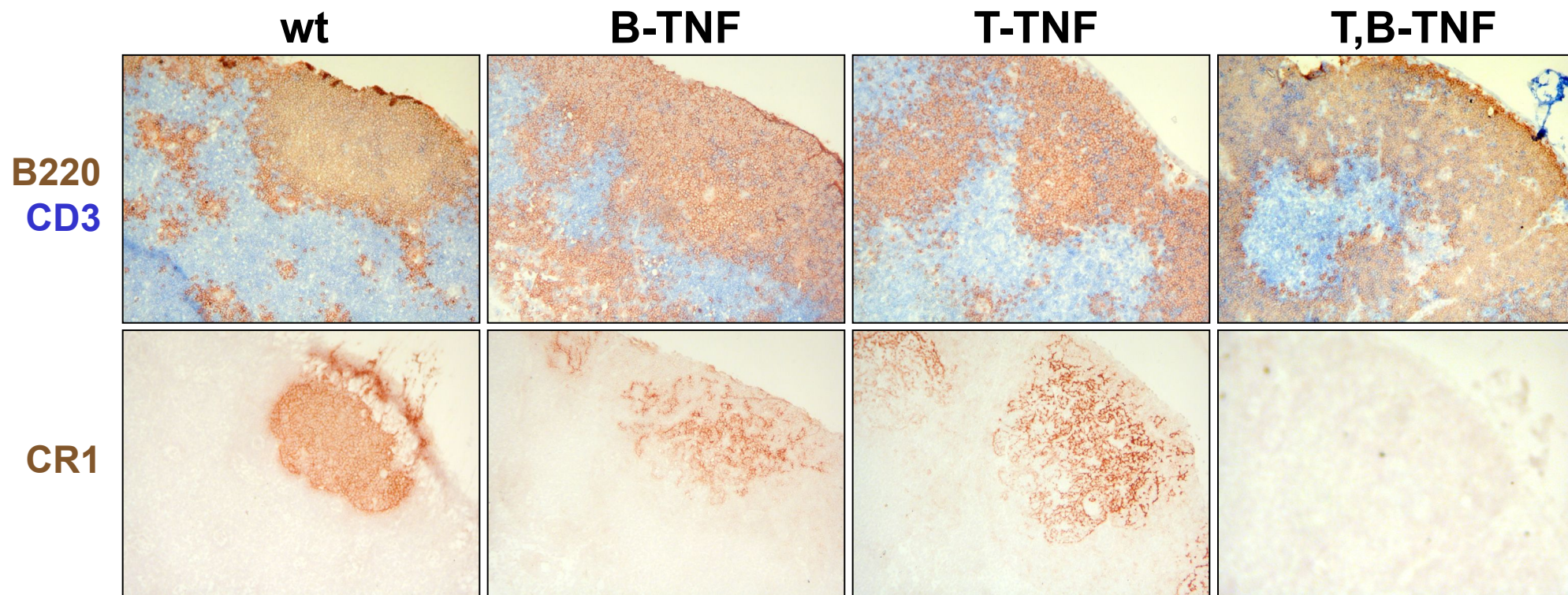
bacilli



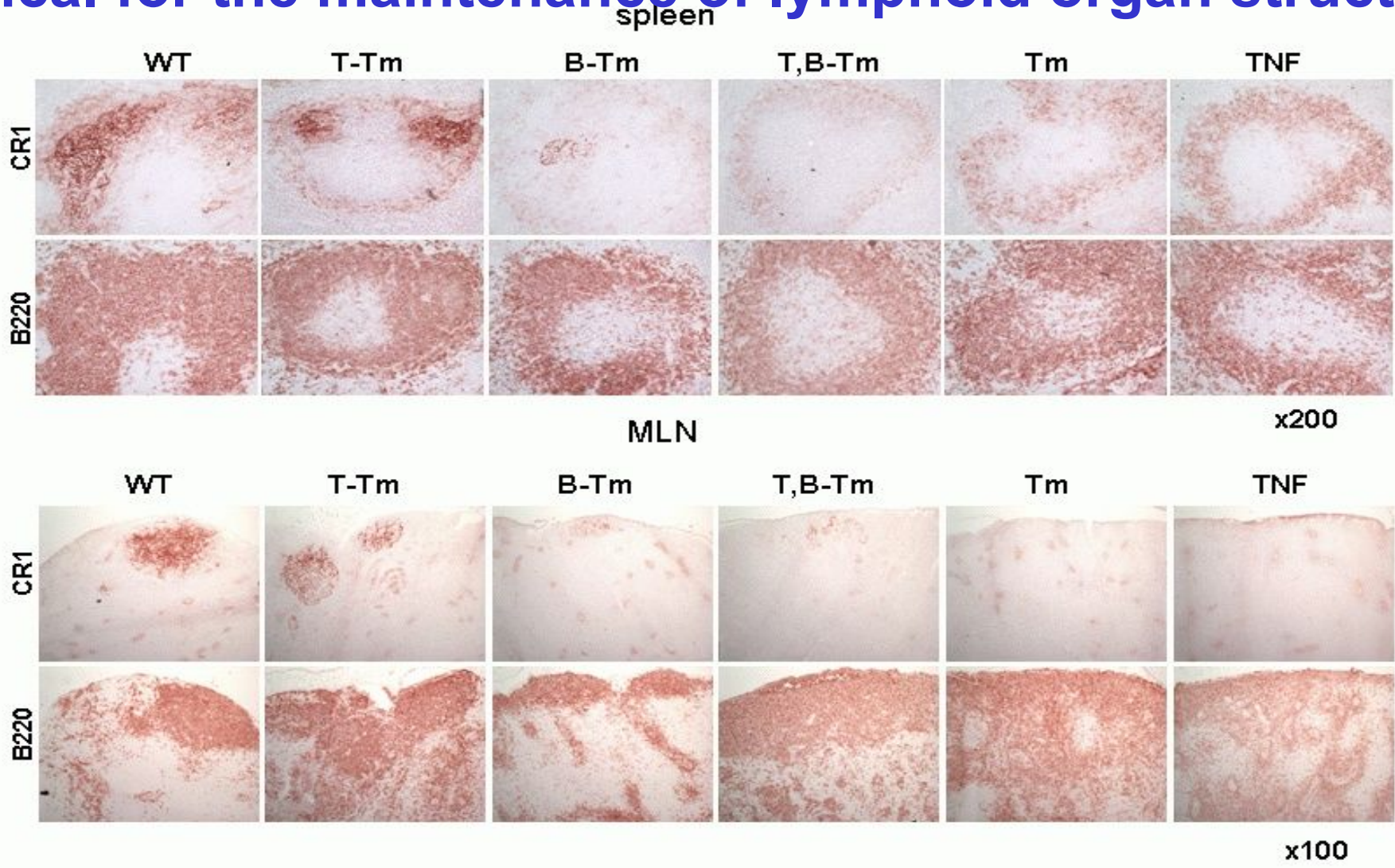
- 1) Granuloma- macrophages + CD4 T cells
 - activation of macrophages
 - expression of iNOS
 - chemokines/more cells
- 2) Granuloma formation requires TNF
 - anti-TNF or TNF KO- no granuloma
 - BCG expressing TNF- restoration of granuloma
- 3) TNF is produced by macrophages and by T cells
- 4) Blockade of TNF leads to TB reactivation



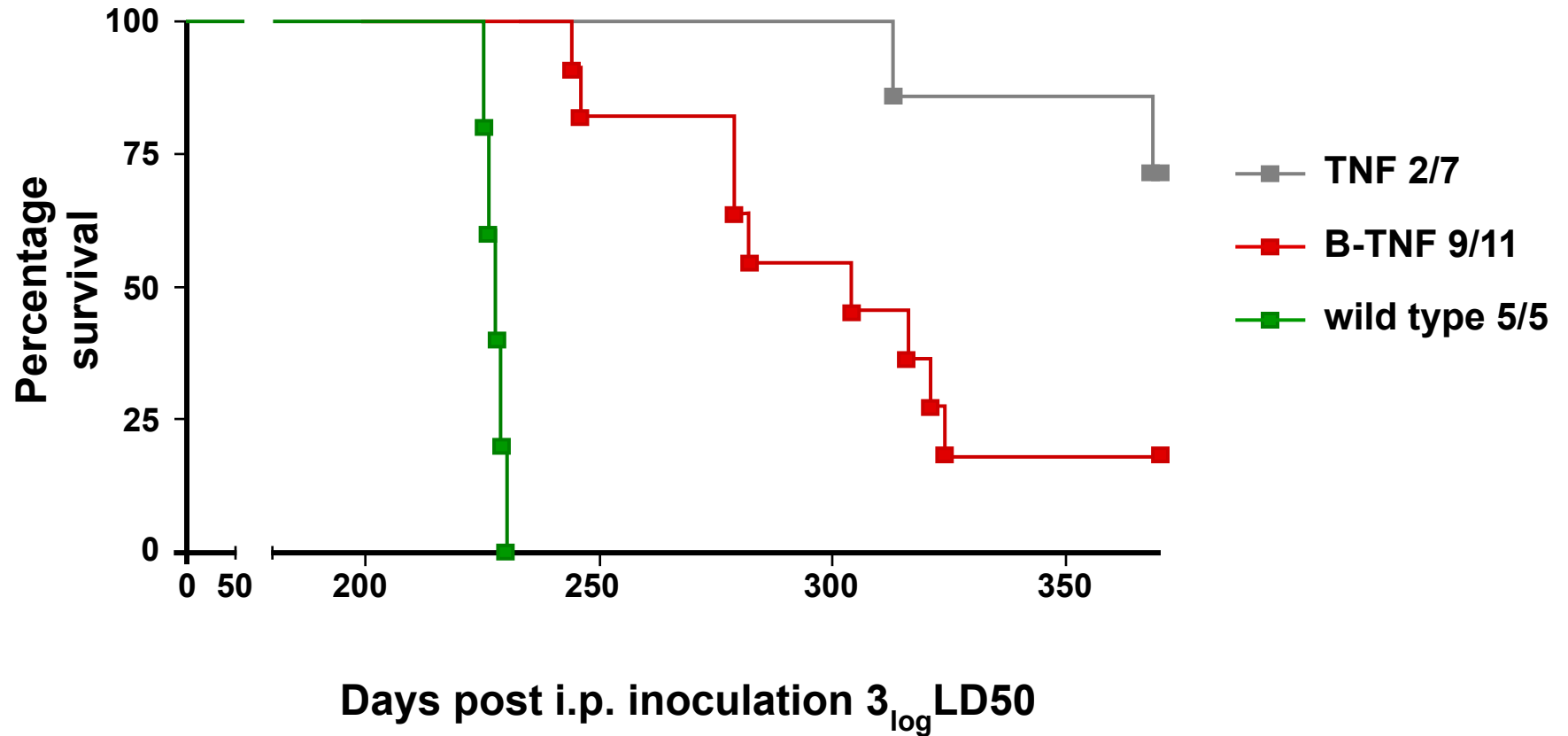
Кооперация ФНО, продуцируемого В и Т лимфоцитами, в развитии и поддержании структуры лимфатических узлов



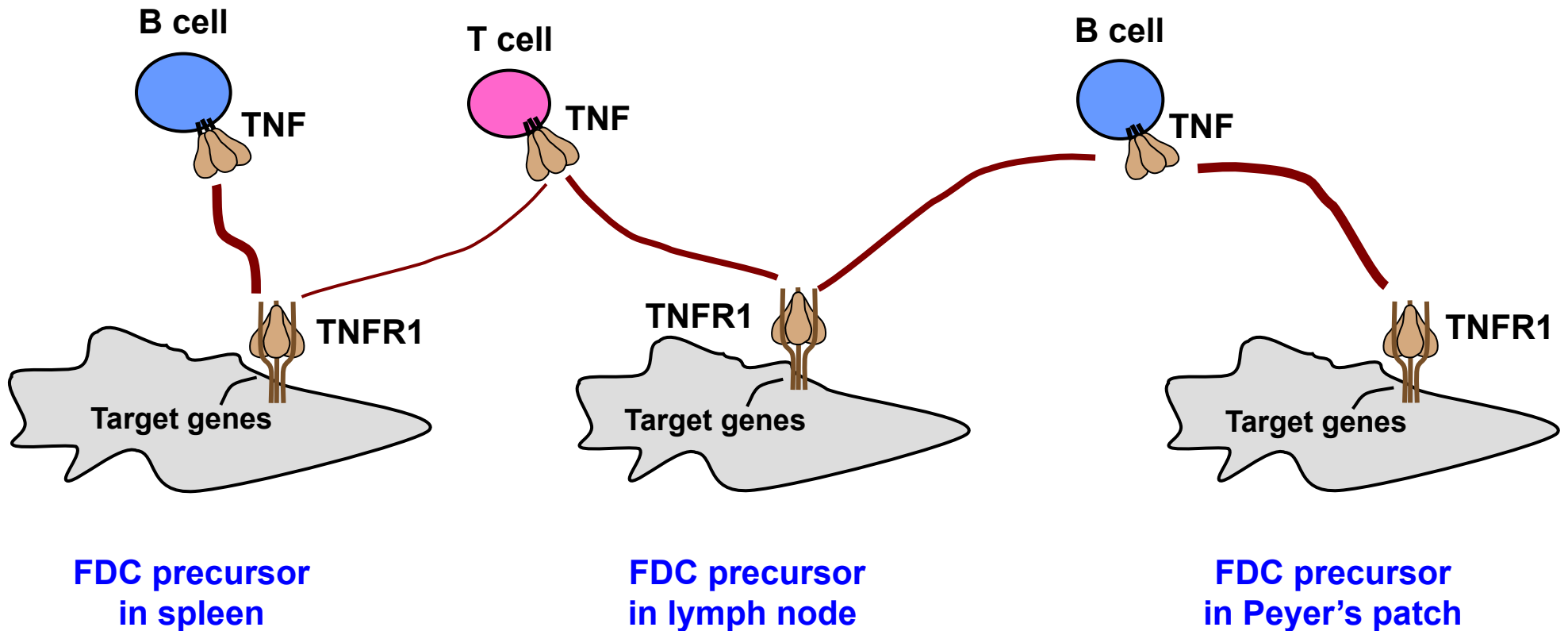
Soluble TNF from B cells, but not from T cells (?) is critical for the maintenance of lymphoid organ structure



Задержка терминальной фазы прионной болезни у B-TNF KO мышей

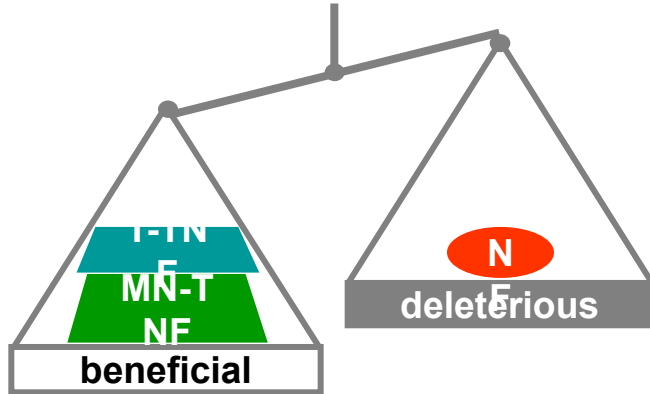


Роль ФНО, продуцируемого В и Т лимфоцитами, в развитии фолликулярных дендритных клеток во вторичных лимфоидных органах

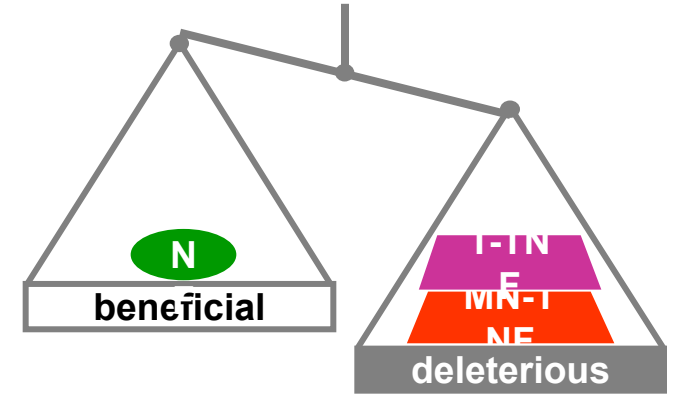


Выводы: сложный баланс между защитными и разрушительными функциями ФНО *in vivo*.

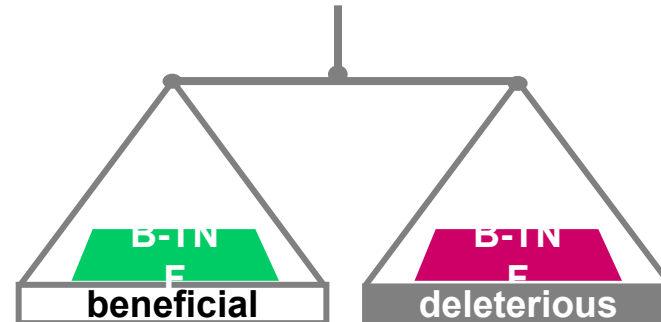
Intracellular pathogen



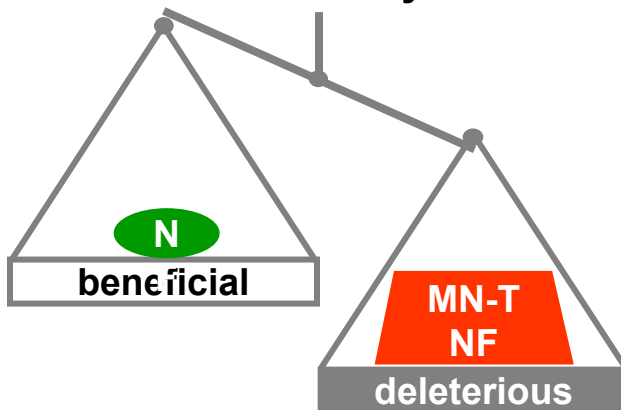
Autoimmune hepatitis



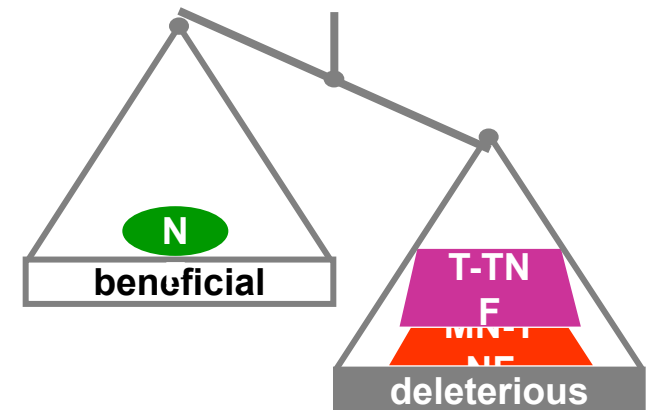
Lymphoid tissue maintenance, prion transmission



LPS induced toxicity



Superantigen induced shock



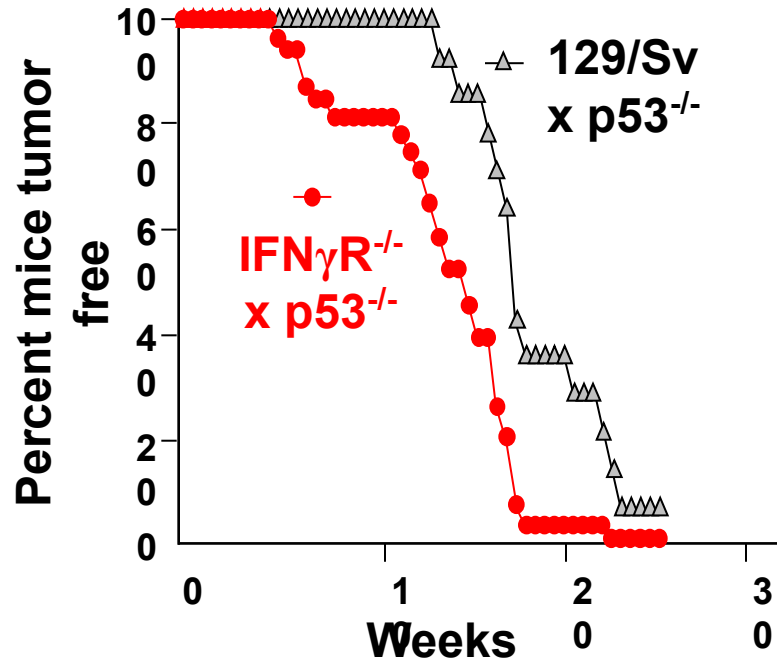
ФНО и рак

1. Рекомбинантный ФНО имеет ярко выраженный противоопухолевый эффект (некроз опухолей) на модельных опухолях мышей.
2. Опухоли, экспрессирующие ФНО, растут медленно или отторгаются.

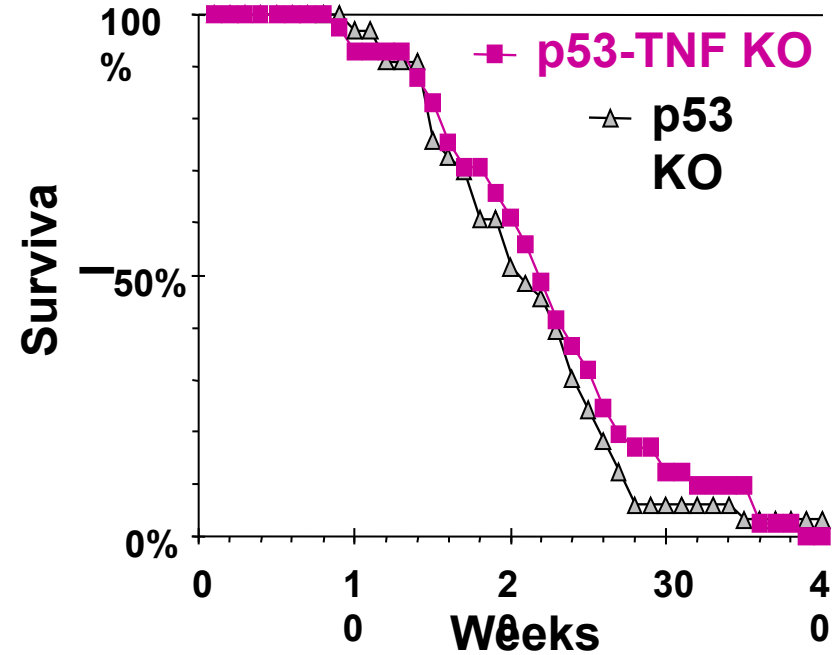
Может ли ФНО быть компонентом системы «иммунологического надзора» над возникающими опухолевыми клетками?

3. Инактивация ФНО защищает мышей от химически – индуцированных опухолей кожи.

Является ли ФНО компонентом системы «иммунного надзора»?

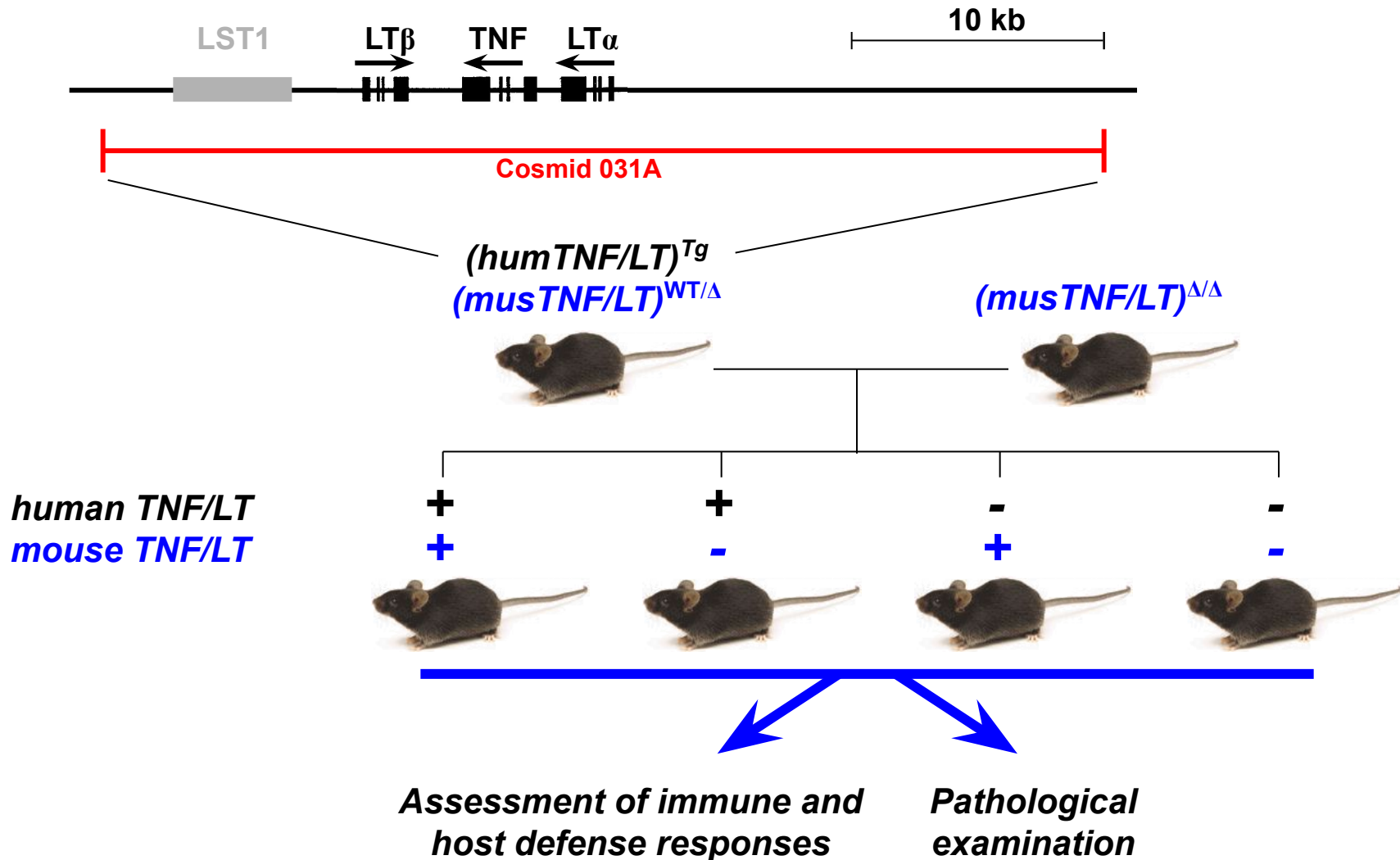


$IFN\gamma/p53$



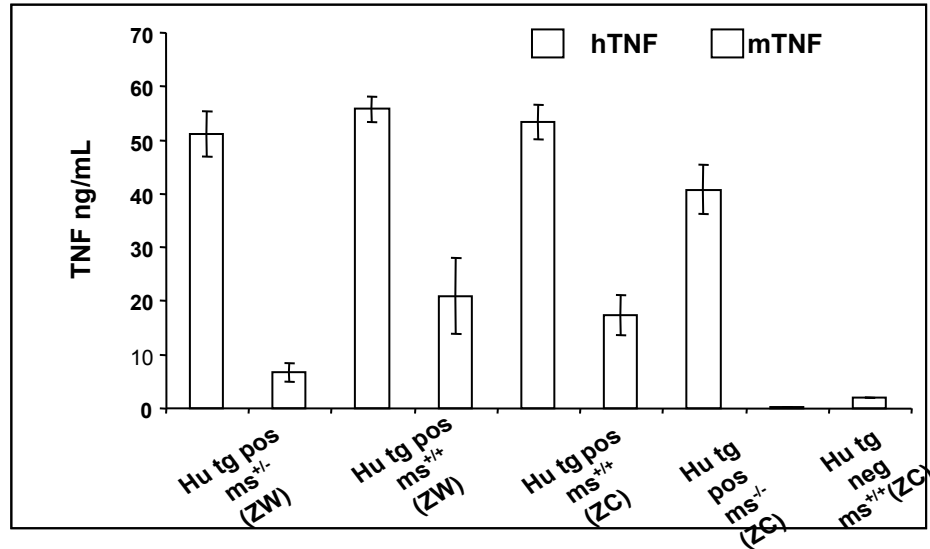
$TNF/p53$

Мыши, «гуманизированные» по локусу ФНО/ЛТ, - модель для изучения последствий блокировки ФНО

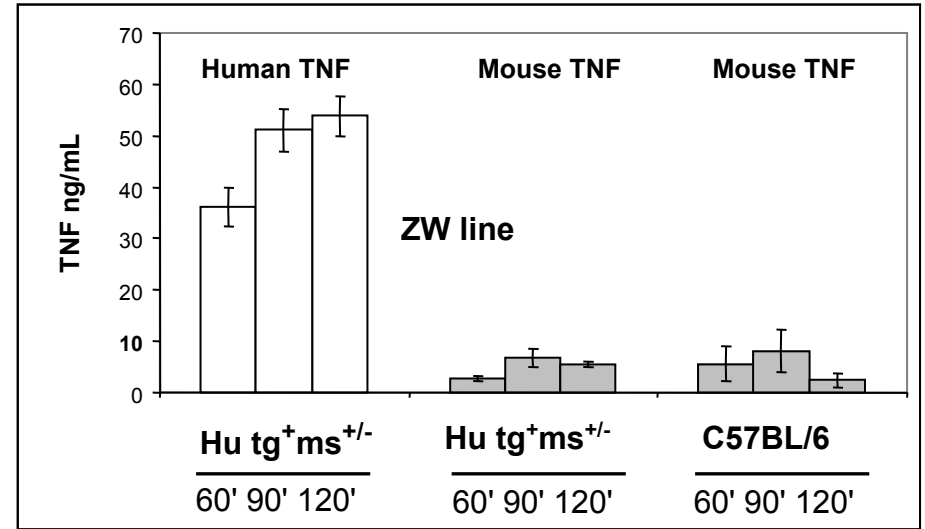


Production of human and mouse TNF by different lines of Hu-TNF/LT Tg KO mice *in vivo*

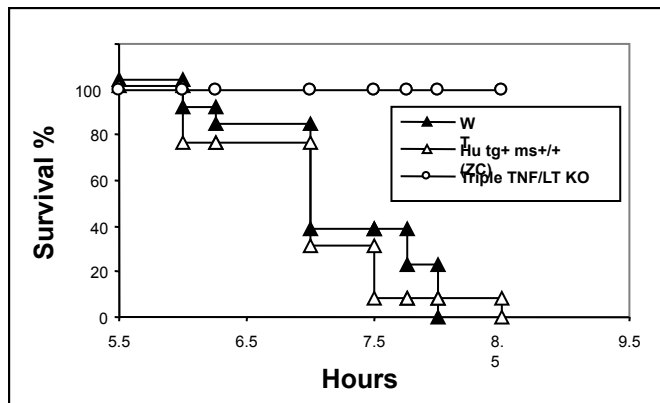
A



B

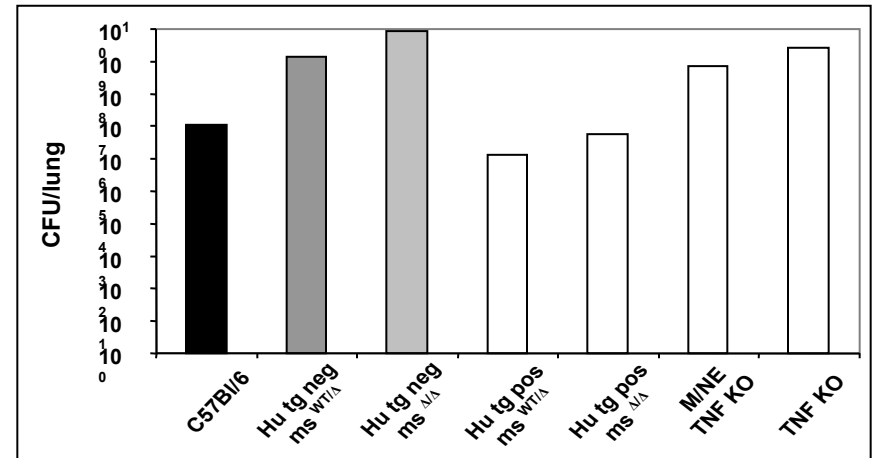
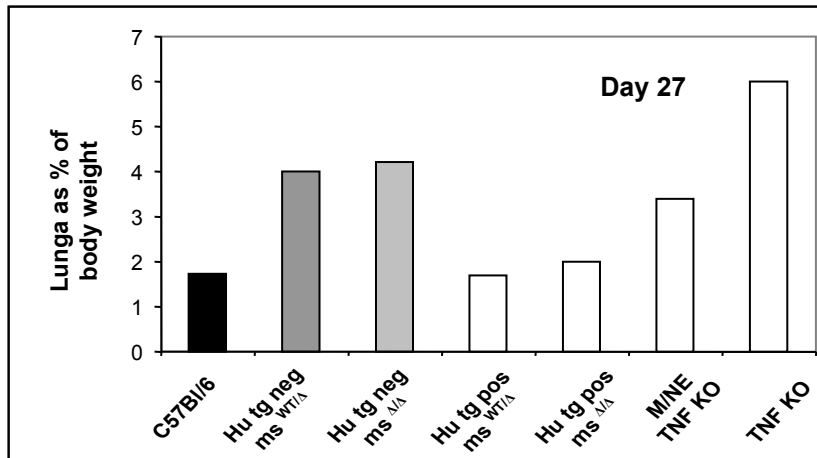
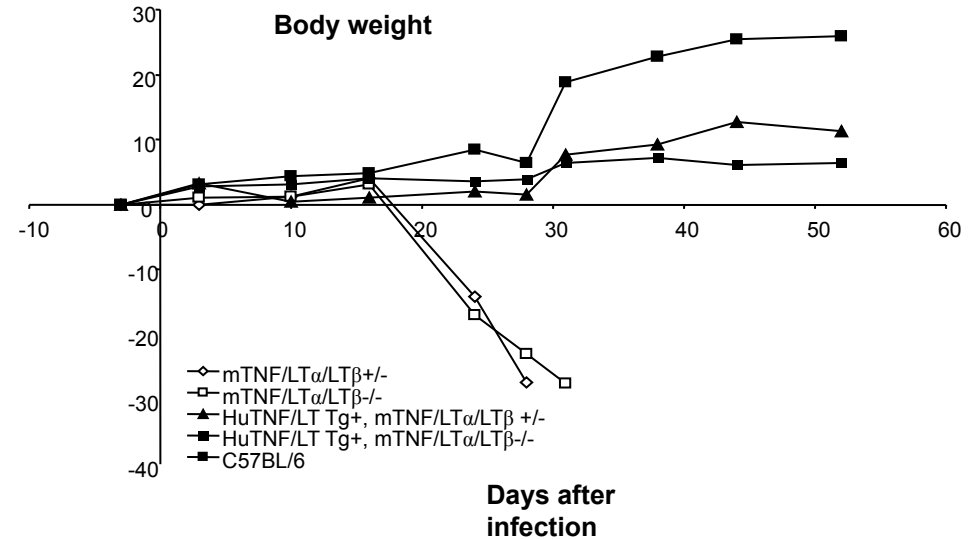
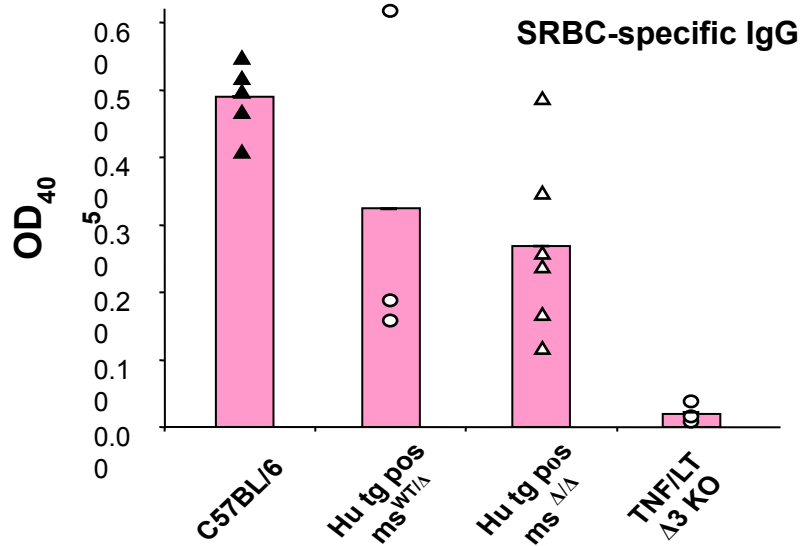


C



(A and B). TNF levels in sera after ip injection of 100 mcg LPS. (C). Mice survival after ip injection of 10 μ g LPS+20mg D-GalN.

Human TNF/LT transgene rectifies the response to a non-replicating TD antigen, SRBC, and renders transgenic mice completely protected against *M. tuberculosis*



Inducible TNF blockade, both genetic and pharmacologic, protects mice from acute LPS/D-Gal toxicity

50 mcg LPS + 20 mg
D-Gal/mouse

20 min later i.v. or i.p. injection
of TNF blockers

Remicade – mouse antibody to
human TNF (2 mg/mouse)

Enbrel - soluble human
TNFR2-Ig (1 mg/mouse)

i-TNF+polyIC – inducible deletion of
TNF gene using LoxP/Cre technology

