



Цитокины семейства Фактора Некроза Опухолей

Лекция 2

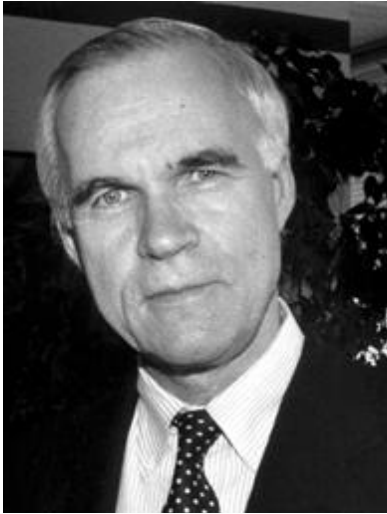
С.А. Недоспасов

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

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



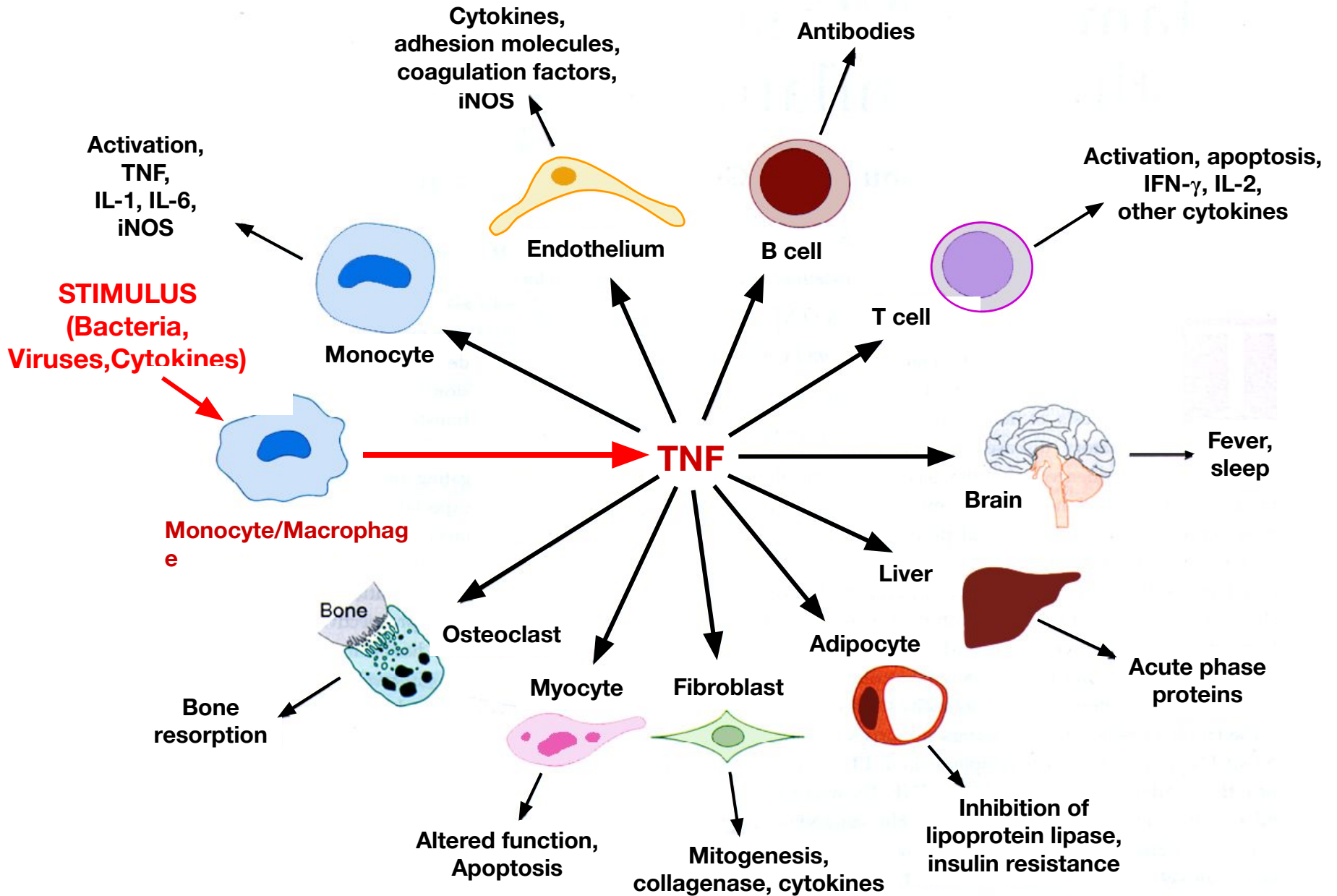
Bruce Beutler



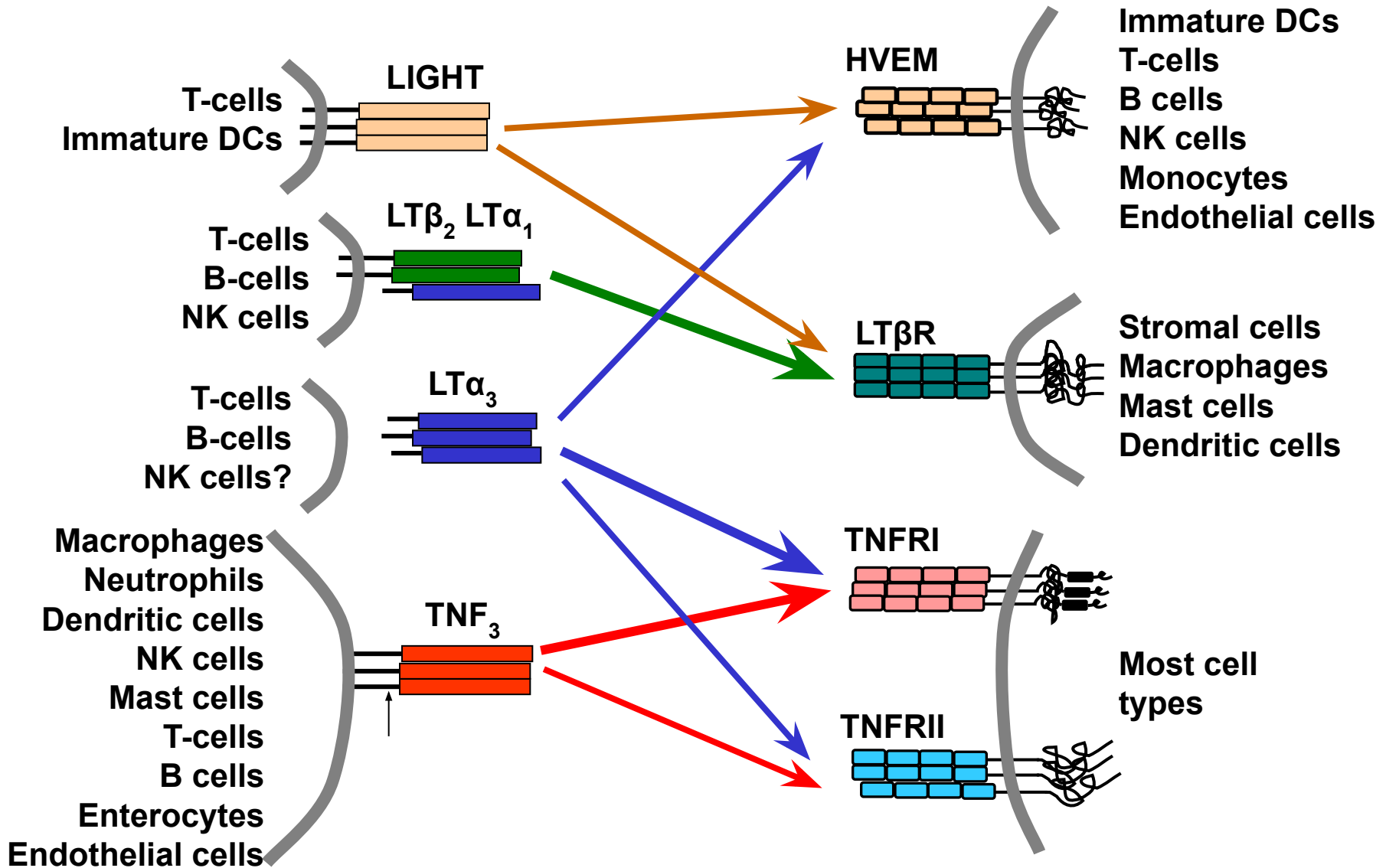
George Kollias

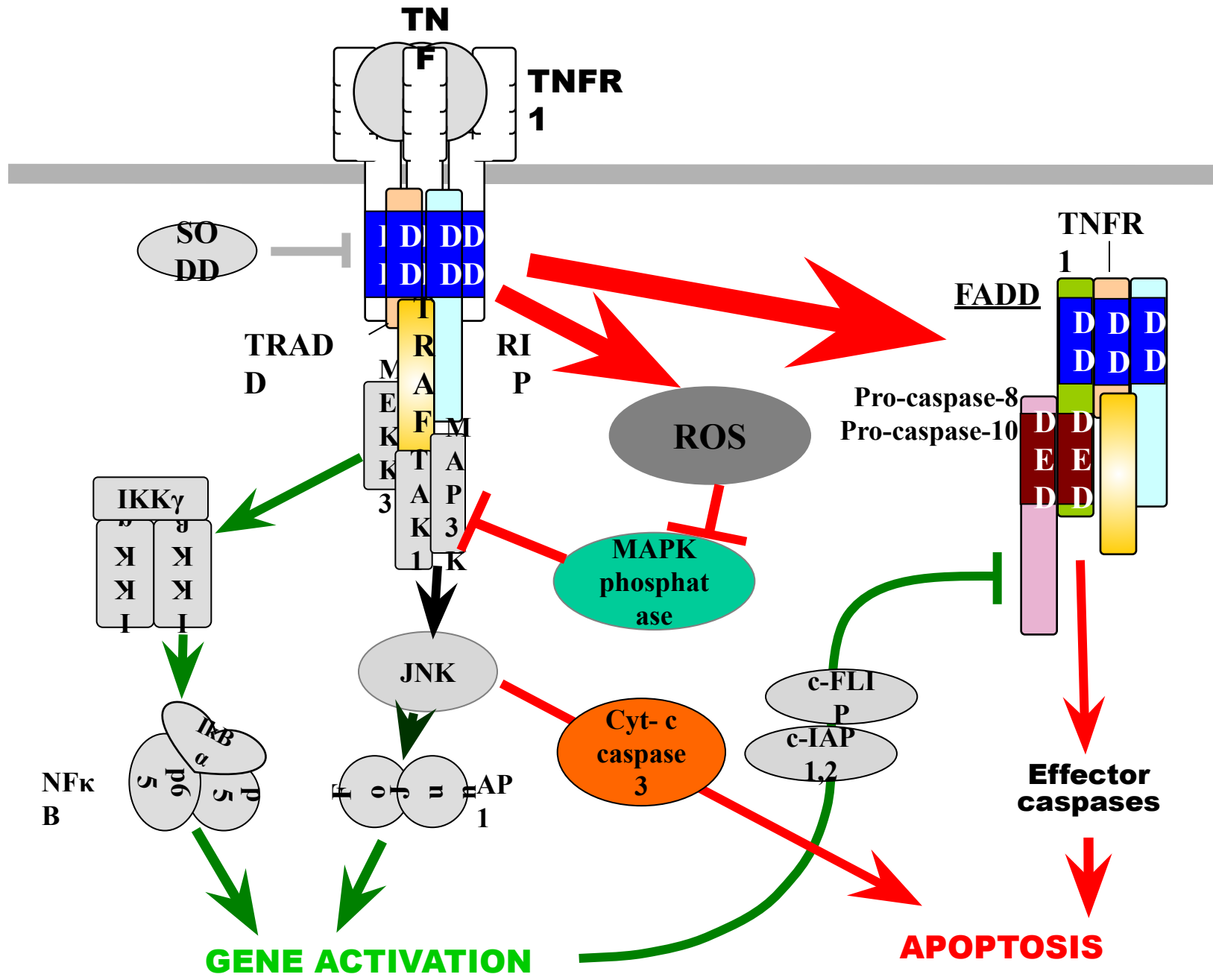
**Благодарность за помощь
в подготовке лекций**

**Дмитрий Купраш
Сергей Гривенников
Ян Вилчек**

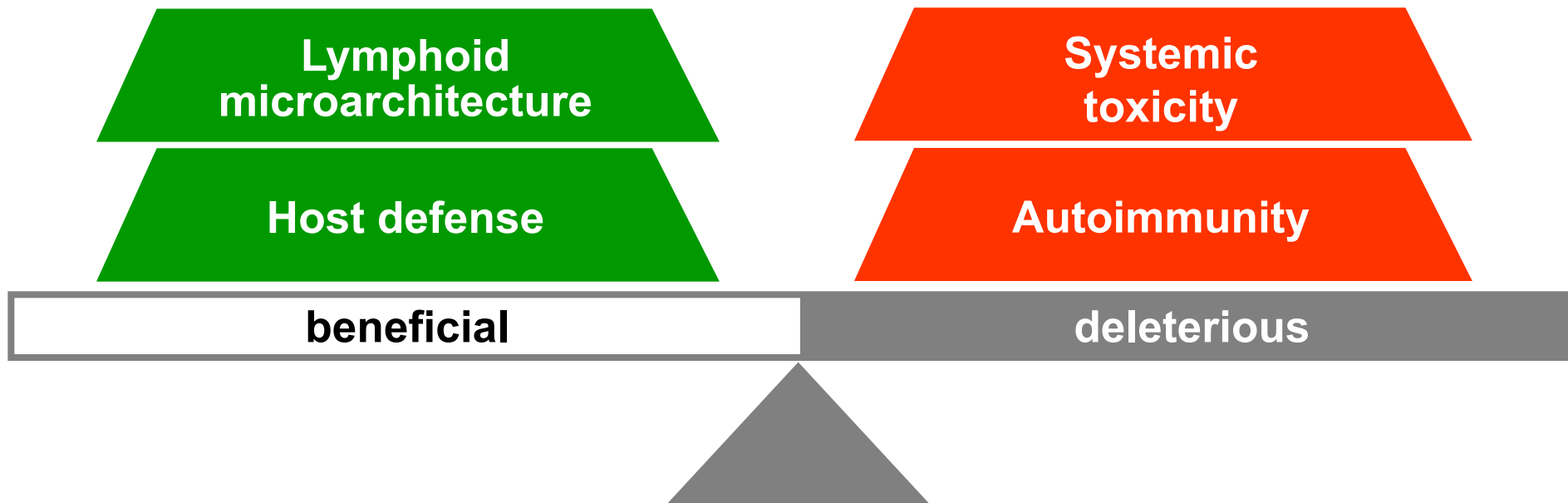


Ligands and Receptors of the LT-TNF Subfamily

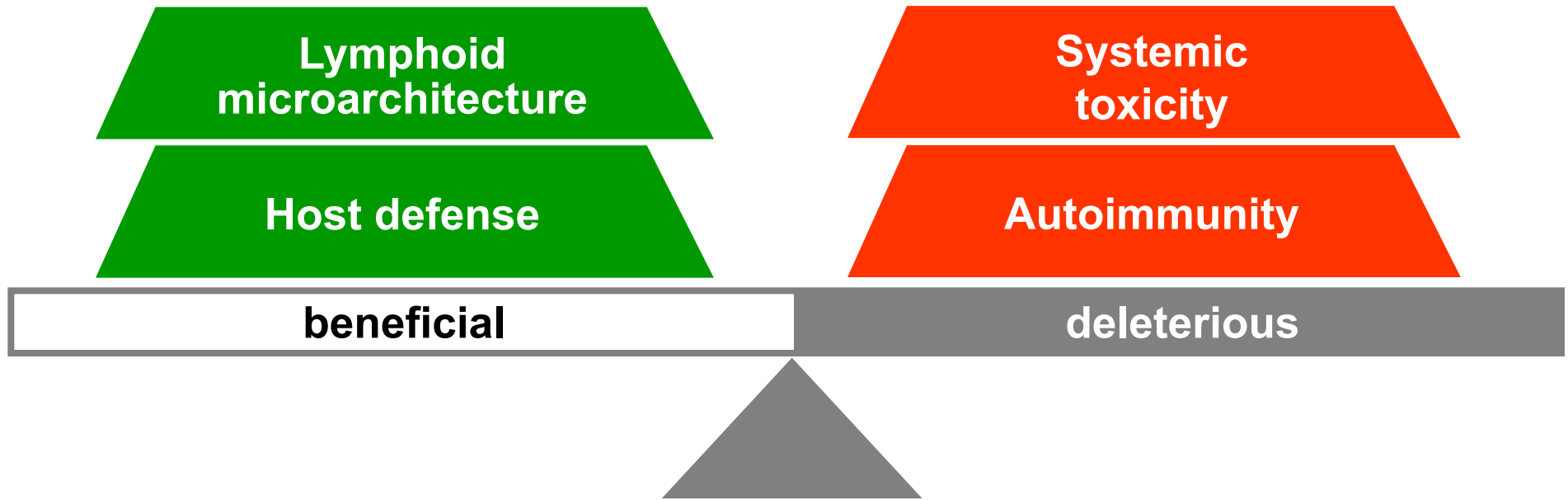




«Плохой» и «хороший» TNF *in vivo*.

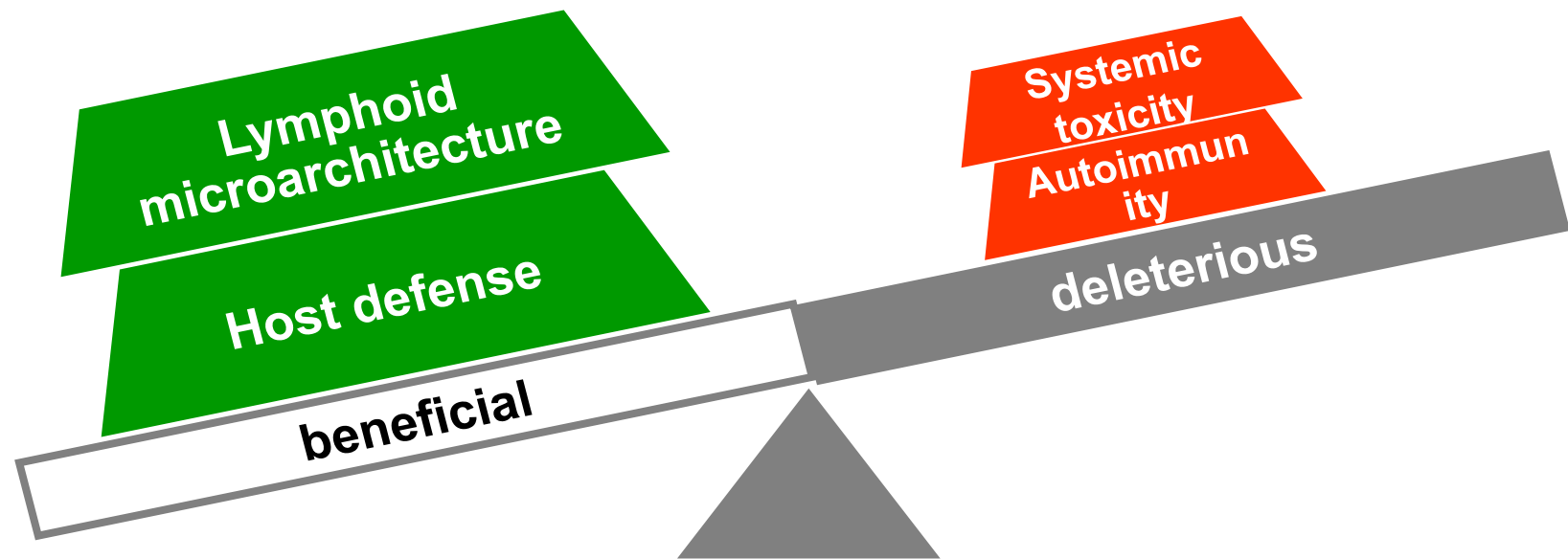


«Плохой» и «хороший» ФНО *in vivo*.



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

Баланс «полезных» и «вредных» свойств ФНО

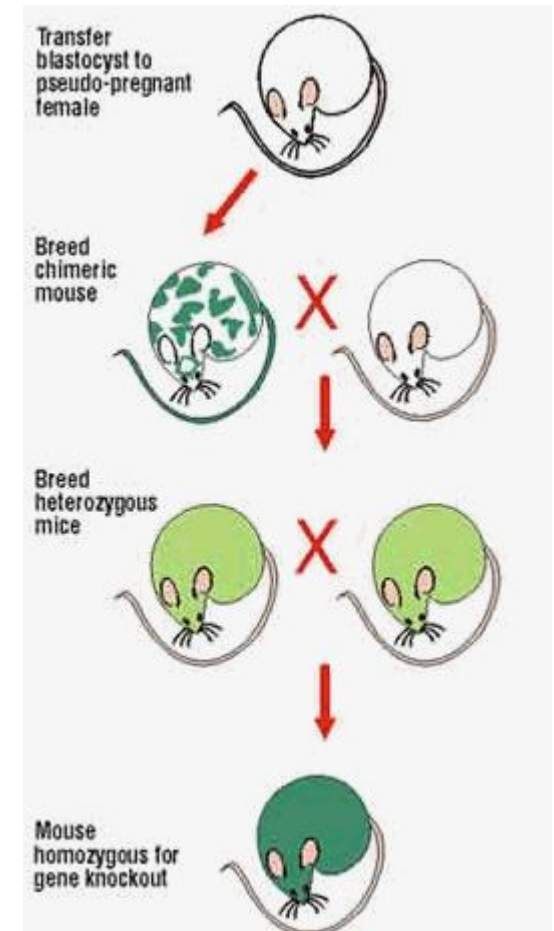
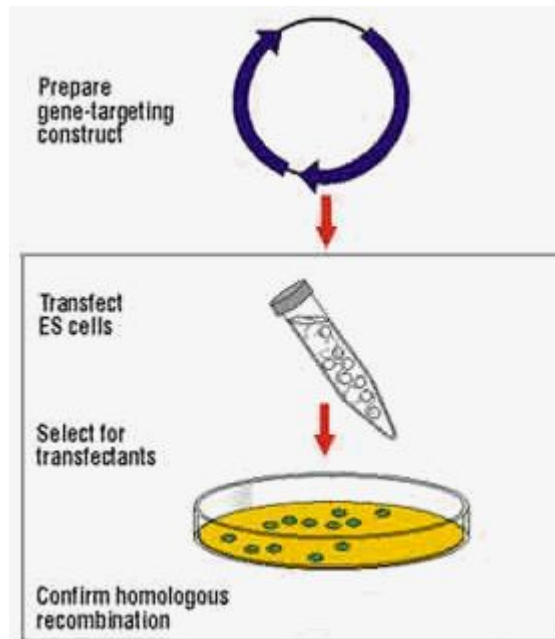


Что произойдет при системном блокировании ФНО у больных (препараты Infliximab, Etanercept)?
- Инфекции (ТБ), лимфомы?

Краткое введение в нокауты: «обратная» генетика

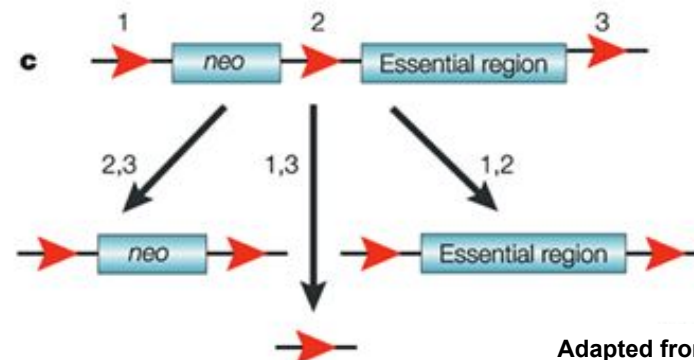
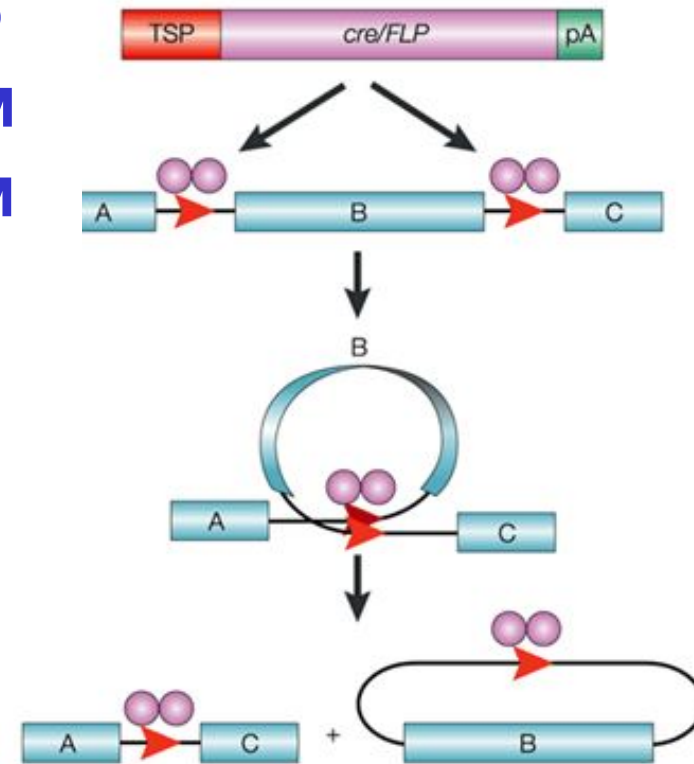
1. **Генетический нокаут: изучение физиологических последствий инактивации одного единственного гена.**
2. ***Проблема №1:* из-за вырожденности функций близкородственных генов генетический нокаут может не «вскрыть» всех физиологических функций продукта гена.**
3. ***Проблема №2:* практически при любой 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

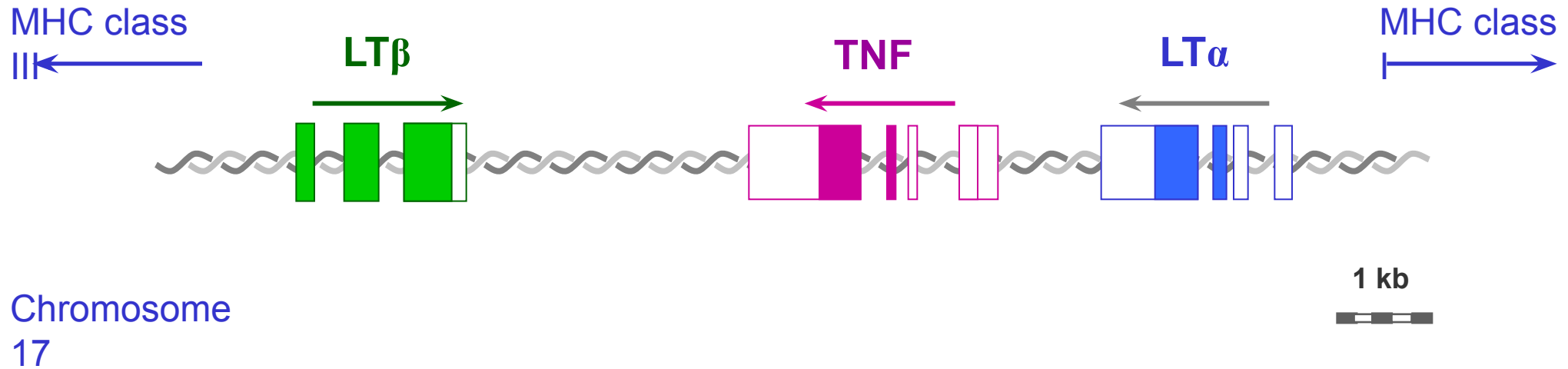


Технология генетического нокаута с использованием Cre/loxP или Flp/Frt систем (precision targeting)

a *loxP*
ATAACTTCGTATAATGATGCTATACGAAGTTAT
FRT
CTTCAAGGATAAGAGATCTTTGTATAGGAACTTC



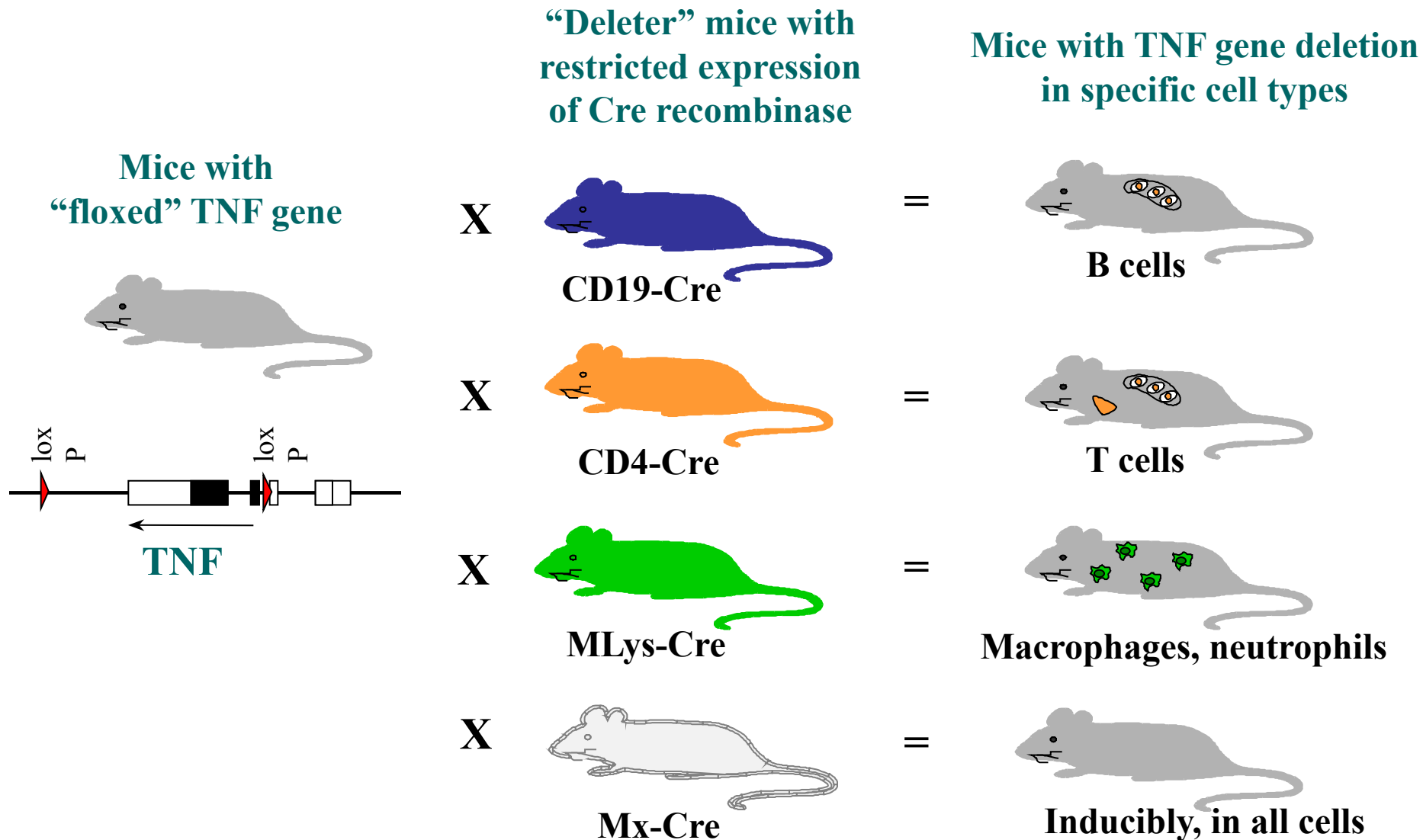
Мишень для генетических манипуляций: локус ФНО-ЛТ мыши



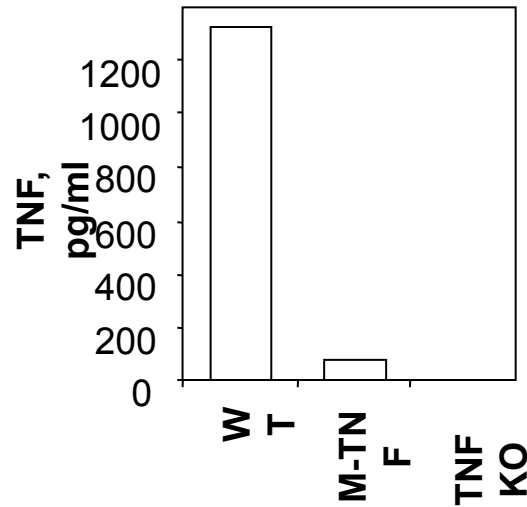
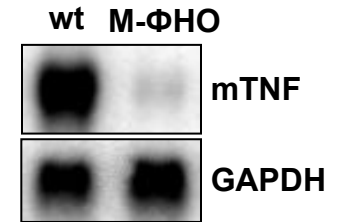
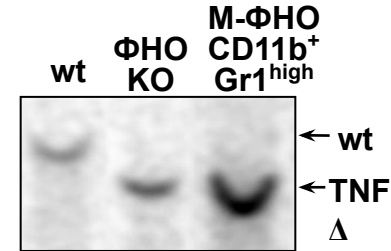
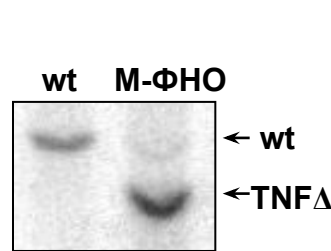
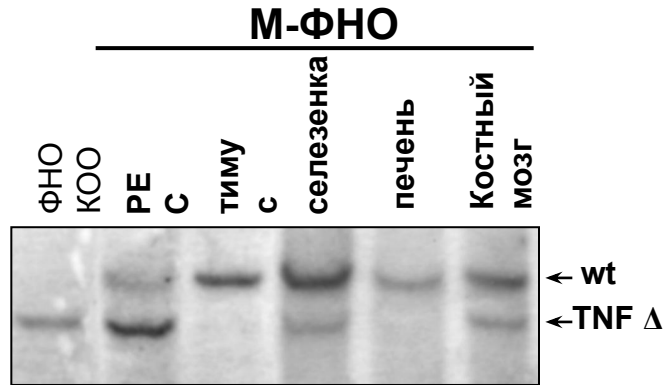
Receptors:

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

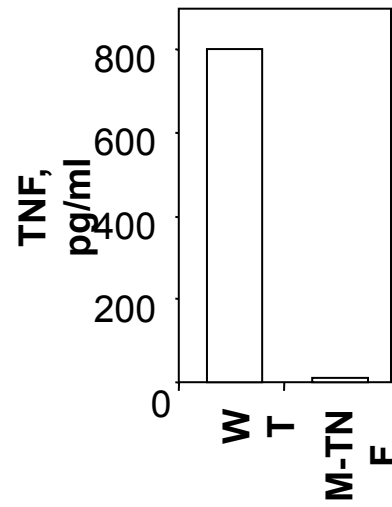
Панель мышей с *кондиционной* инактивацией гена ФНО



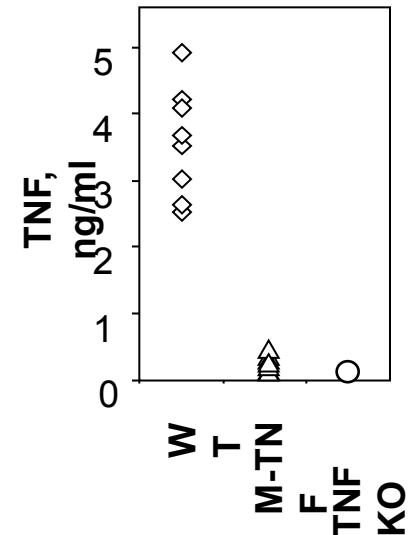
Эффективность и специфичность делеции гена ФНО в М-ФНО мышах



клетки брюшной полости

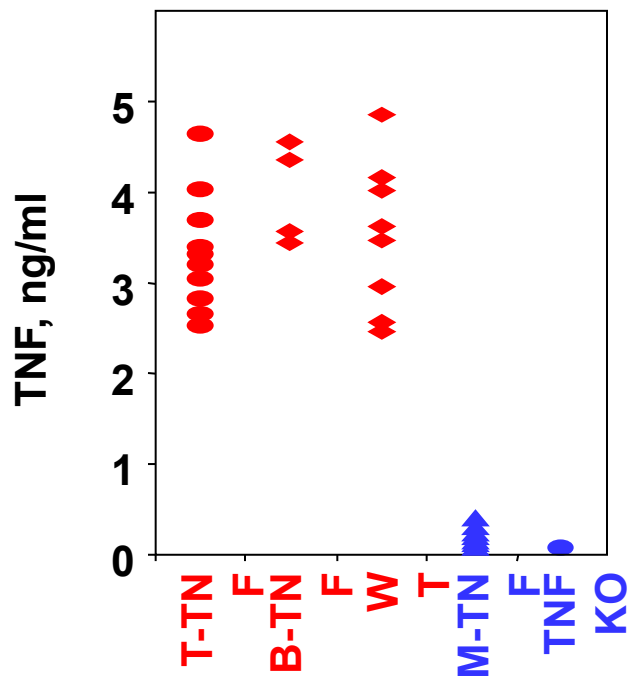


нейтрофилы

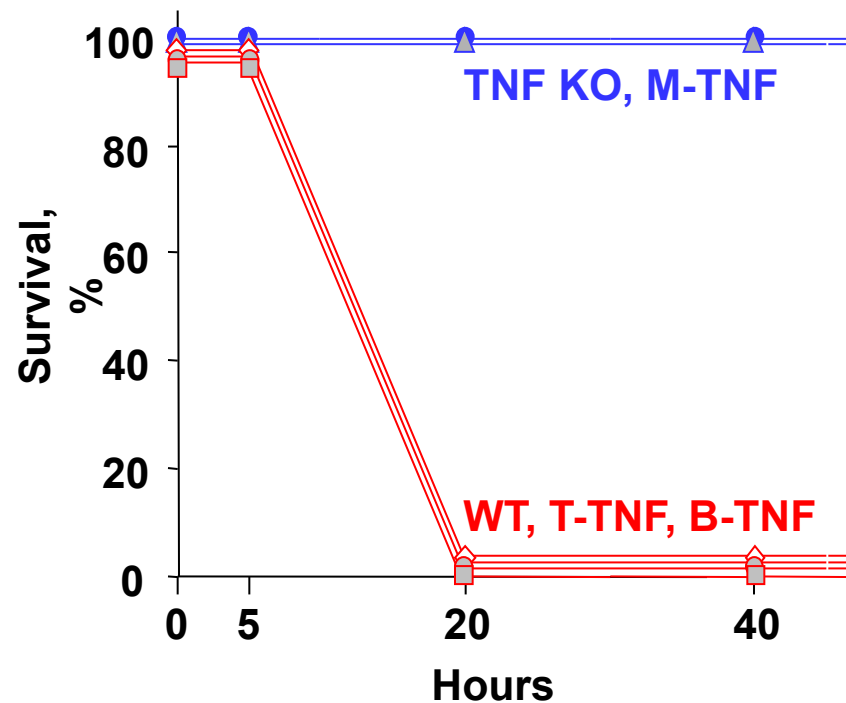


сыворотка

Макрофаги и нейтрофилы являются главным источником «системного» ФНО

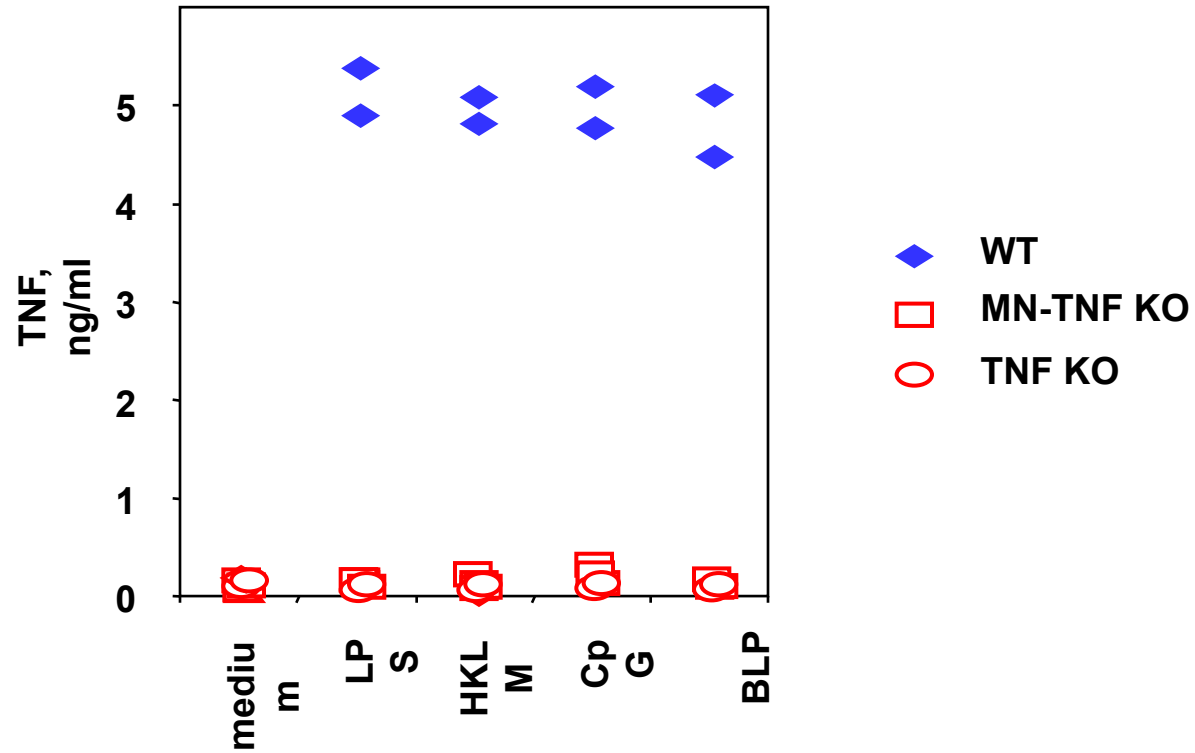


Уровень ФНО в сыворотке



ЛПС / D-Gal токсичность

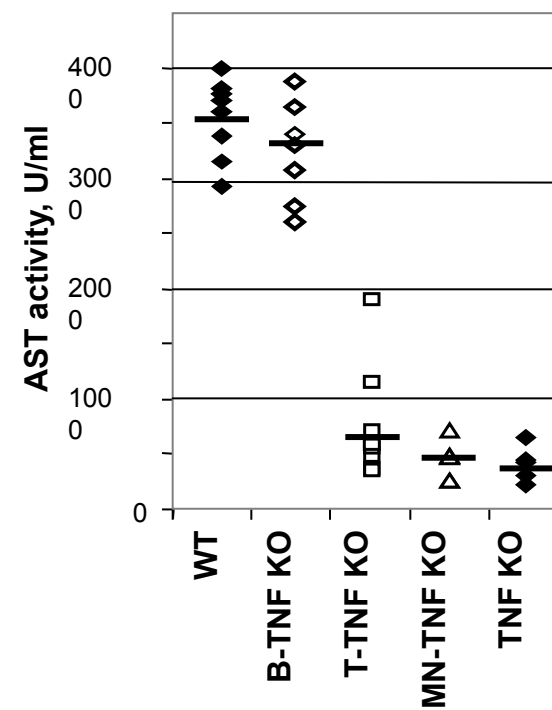
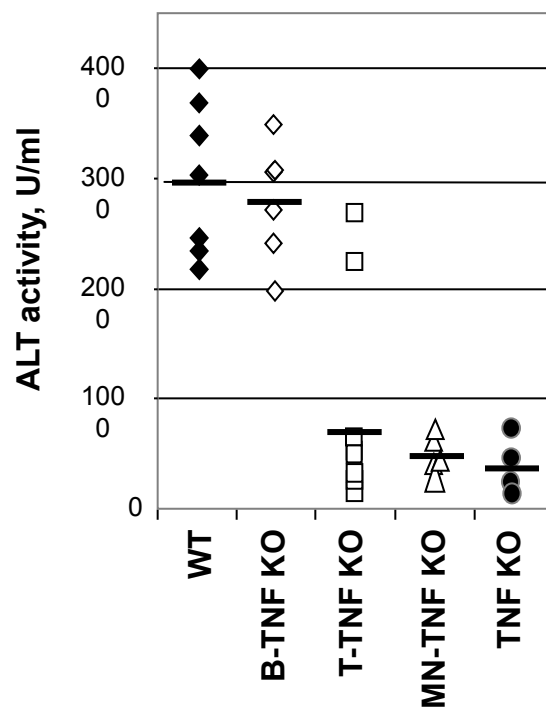
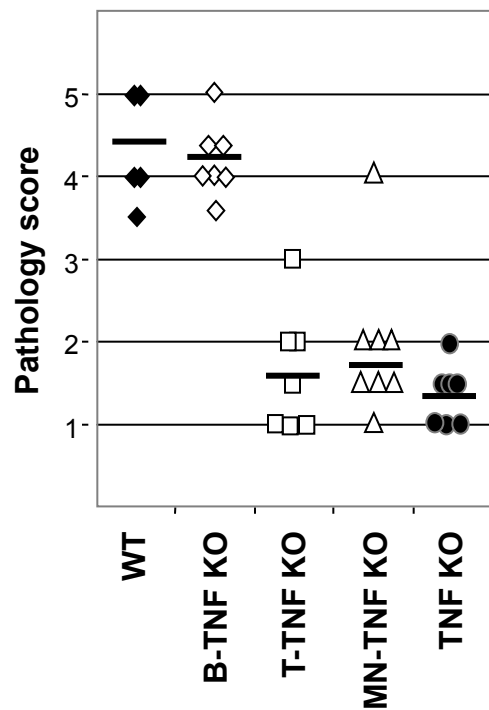
ФНО является геном-мишенью при активации многих TLR рецепторов



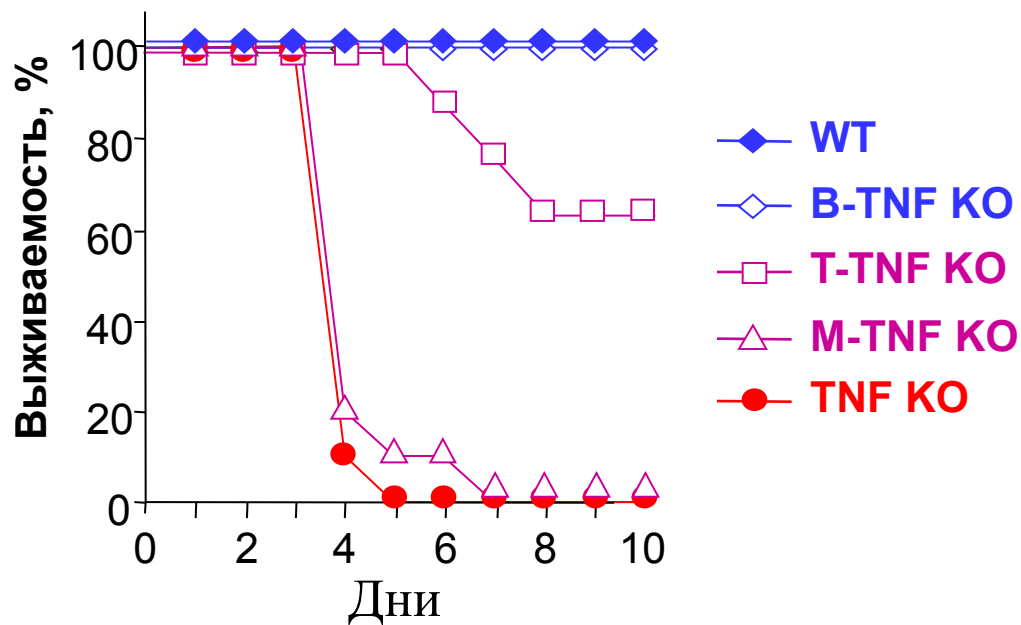
ФНО, продуцируемый как макрофагами, так и Т лимфоцитами, является медиатором токсичности к продукту Грам-положительных бактерий, SEB

	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

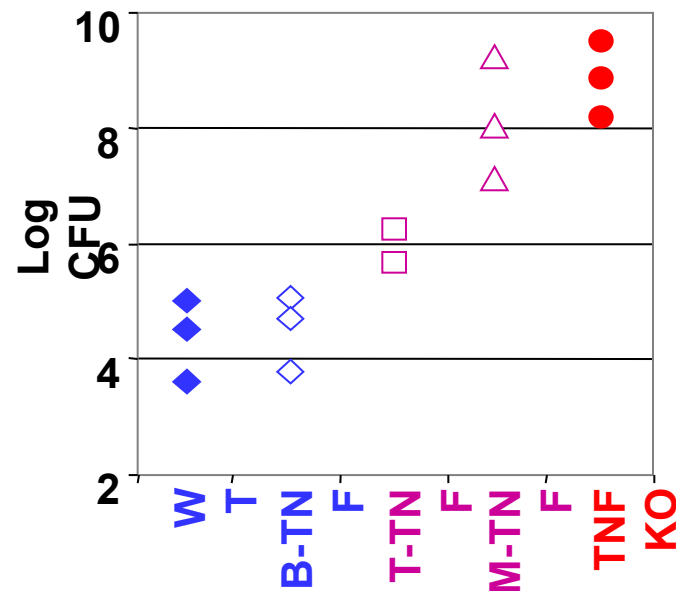
Как T-ФНО, так и MN-TNF, являются медиаторами экспериментального аутоиммунного гепатита



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



Листерия -модель
внутриклеточного патогена



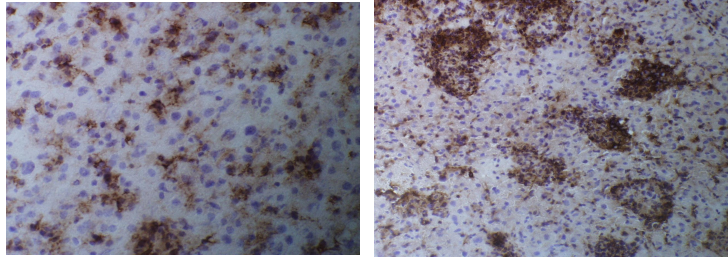
Количество бактерий в
печени

TNF induces granuloma formation and antibacterial mechanisms

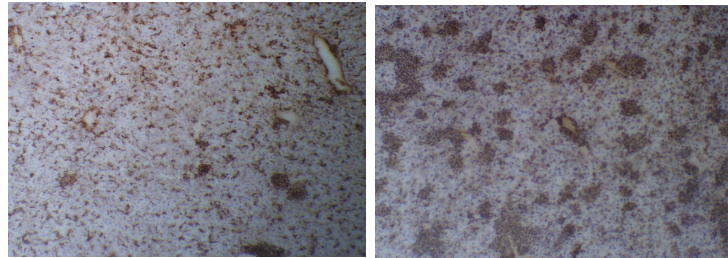
TNF KO

WT

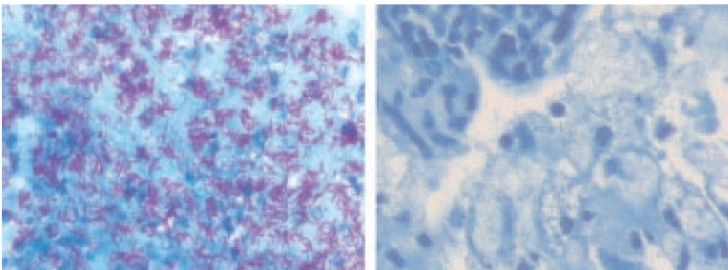
CD11b



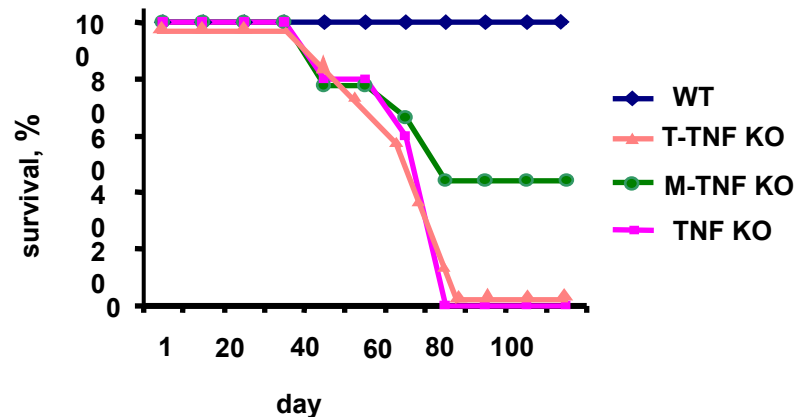
iNOS



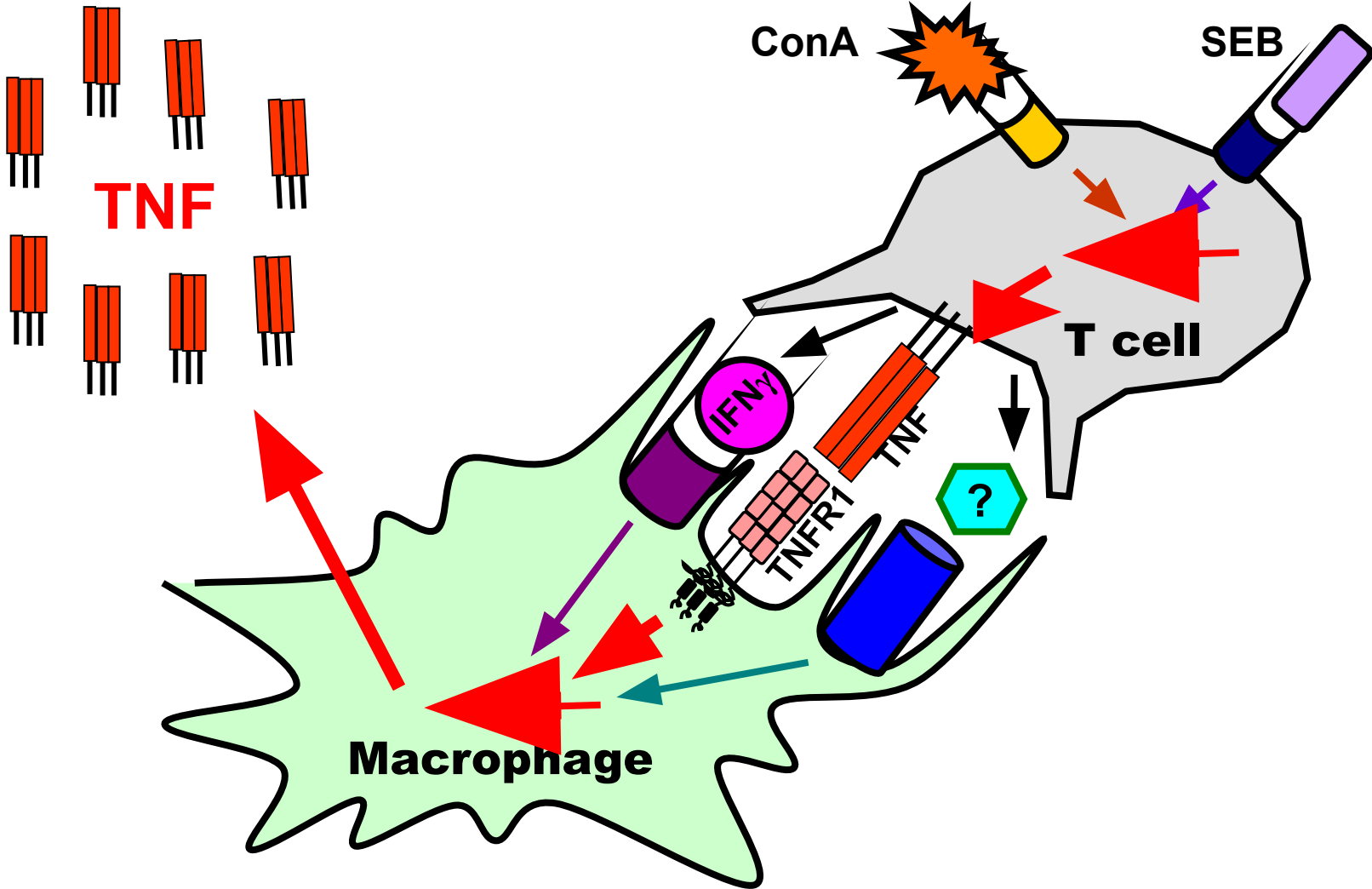
bacilli



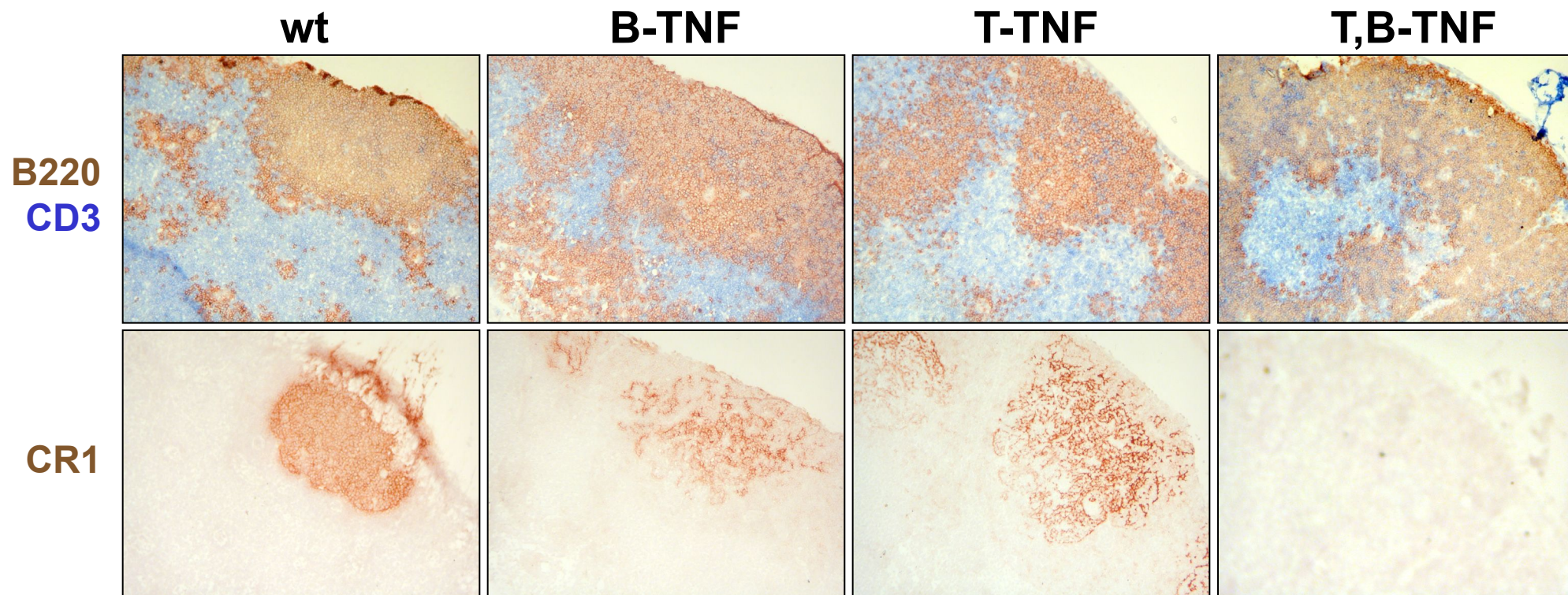
- 1) Granuloma- macrophages + CD4 T cells
 - activation of macrophages
 - expression of iNOS
 - chemokines/more cells
- 2) Granuloma formation requires TNF
 - anti-TNF or TNF KO- no granuloma
 - BCG expressing TNF- restoration of granuloma
- 3) TNF is produced by macrophages and by T cells
- 4) Blockade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



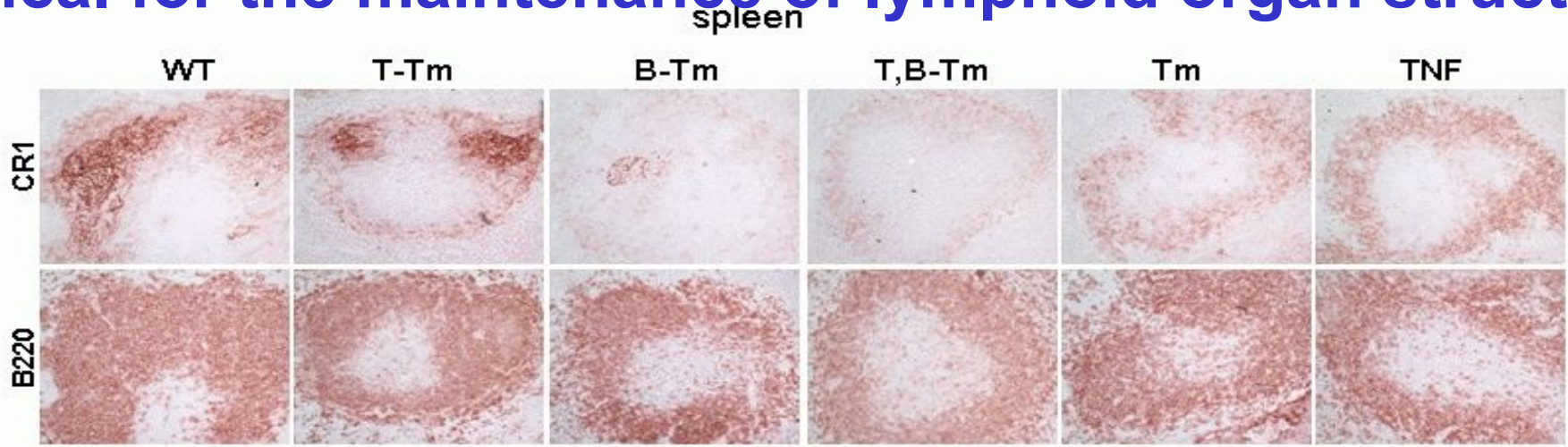
TNF amplification in response to polyclonal T-cell activation



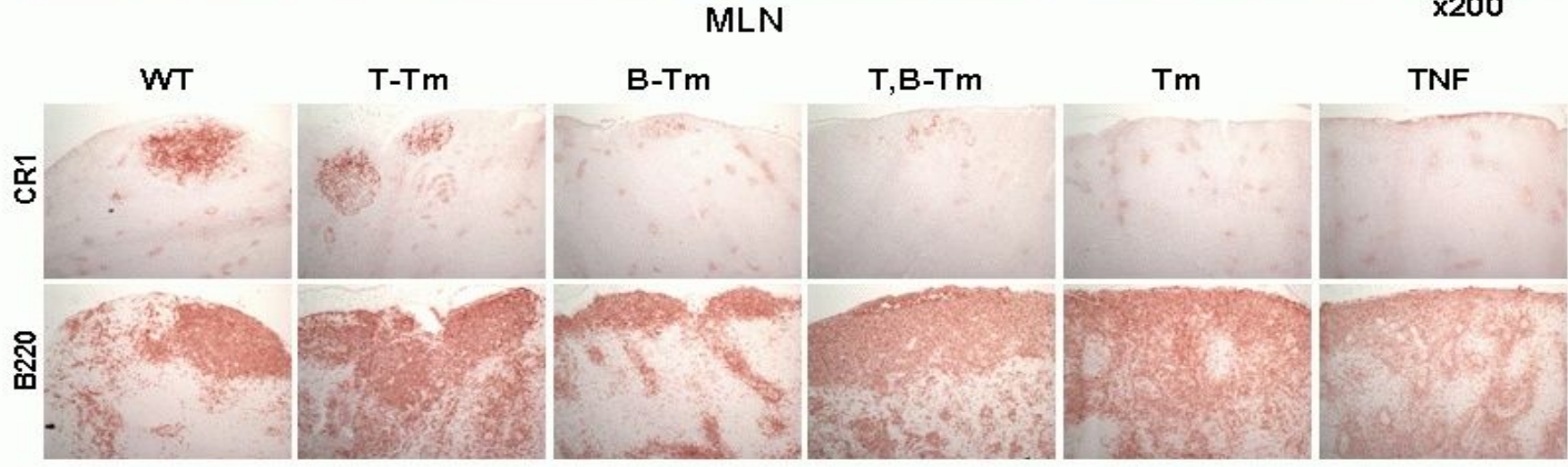
Кооперация ФНО, продуцируемого В и Т лимфоцитами, в развитии и поддержании структуры лимфатических узлов



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

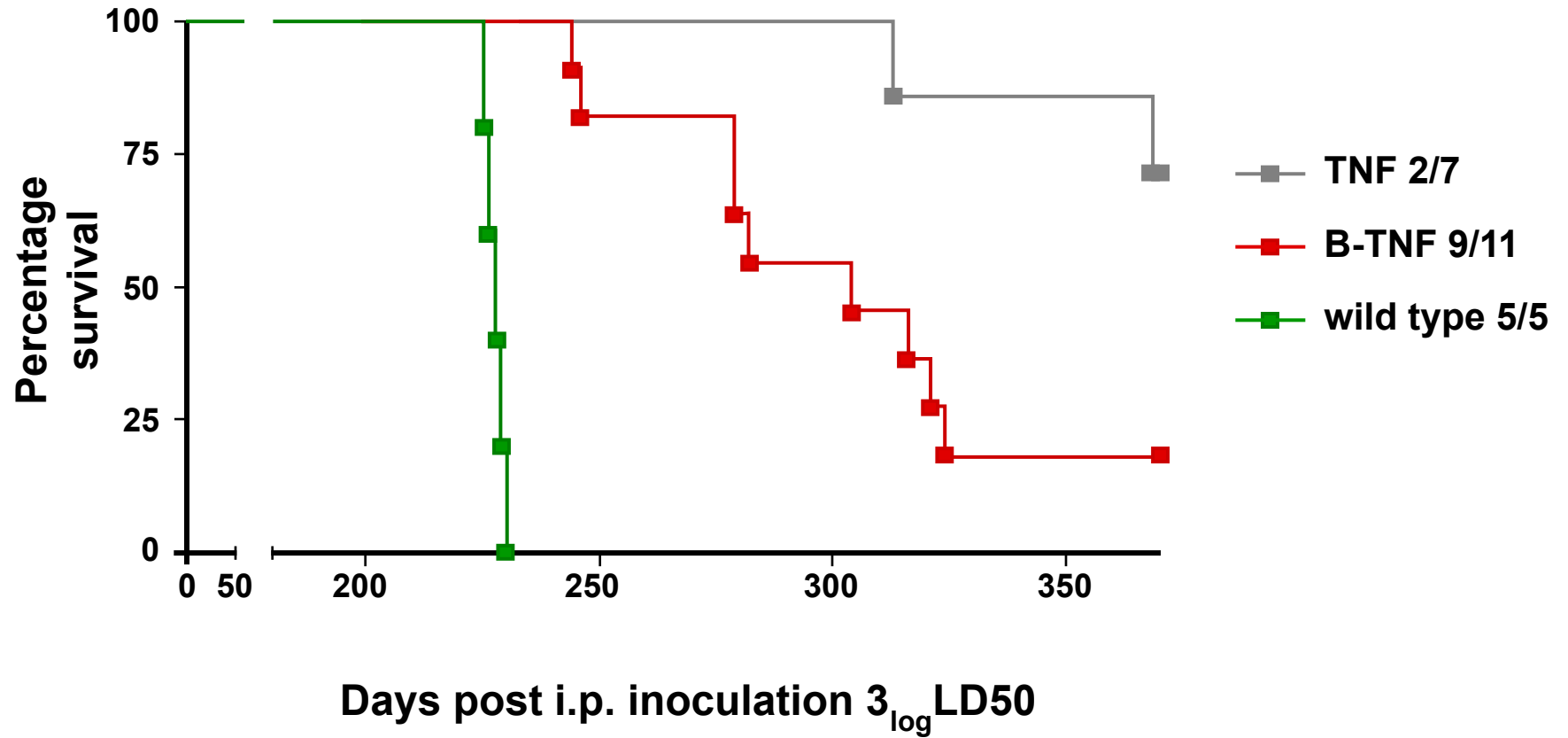


x200

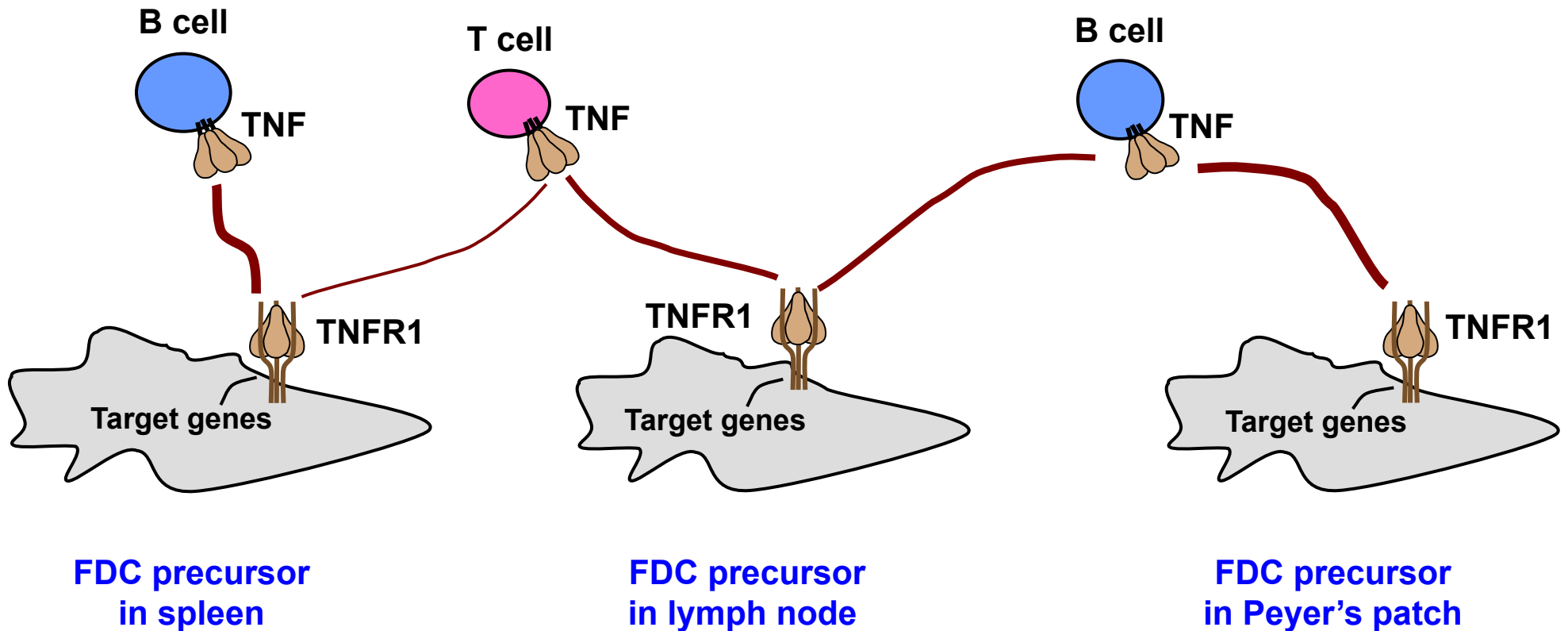


x100

Задержка терминальной фазы прионной болезни у B-TNF KO мышей

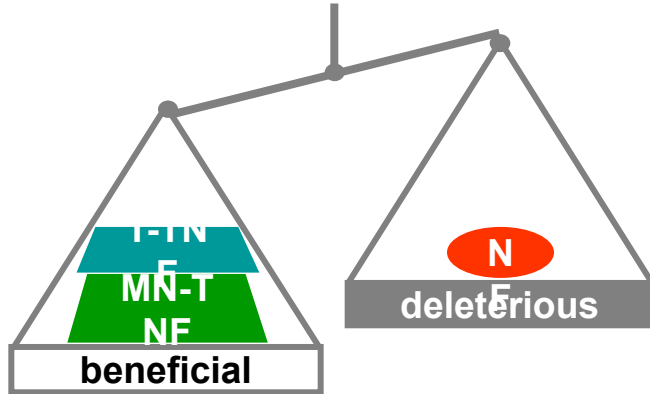


Роль ФНО, продуцируемого В и Т лимфоцитами, в развитии фолликулярных дендритных клеток во вторичных лимфоидных органах

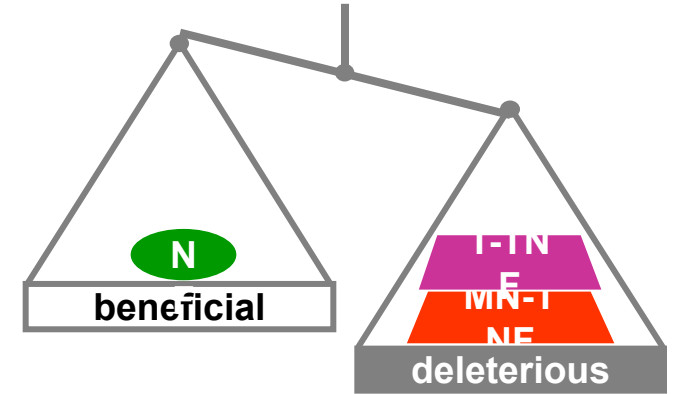


Выводы: сложный баланс между защитными и разрушительными функциями ФНО *in vivo*.

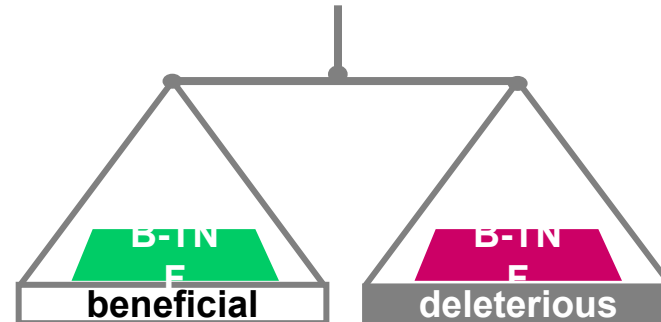
Intracellular pathogen



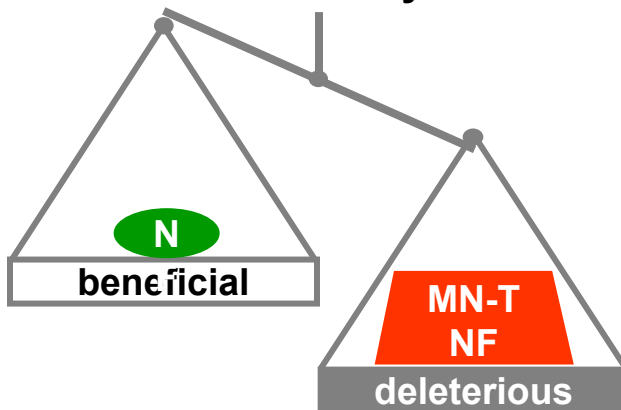
Autoimmune hepatitis



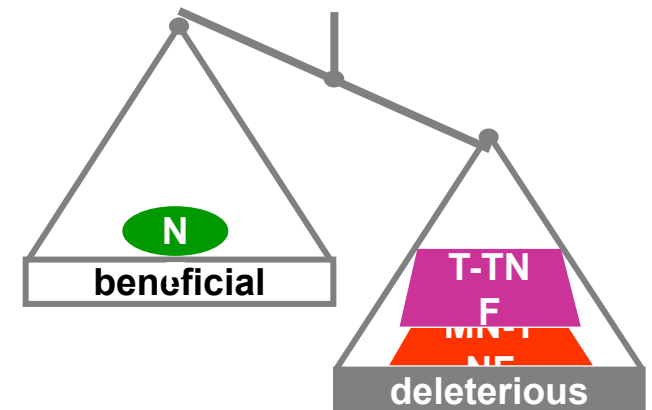
Lymphoid tissue maintenance, prion transmission



LPS induced toxicity



Superantigen induced shock



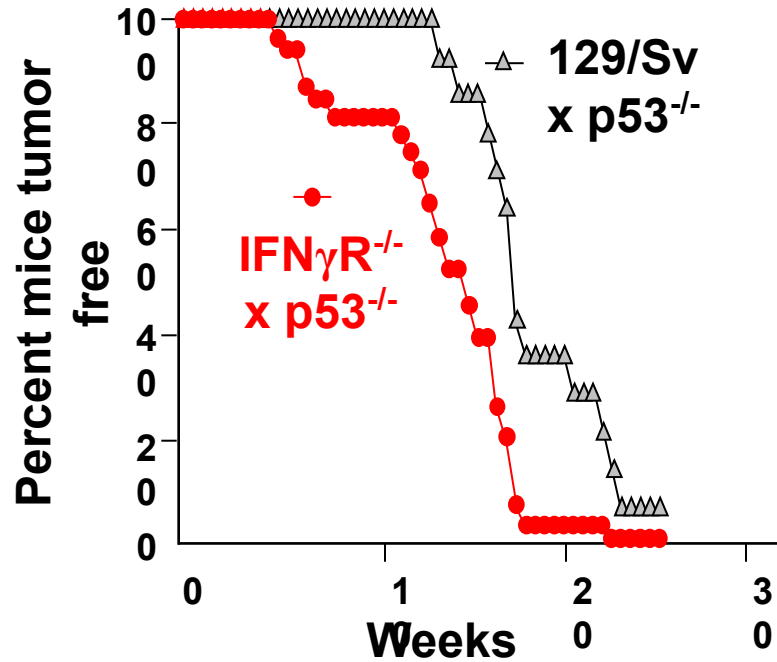
ФНО и рак

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

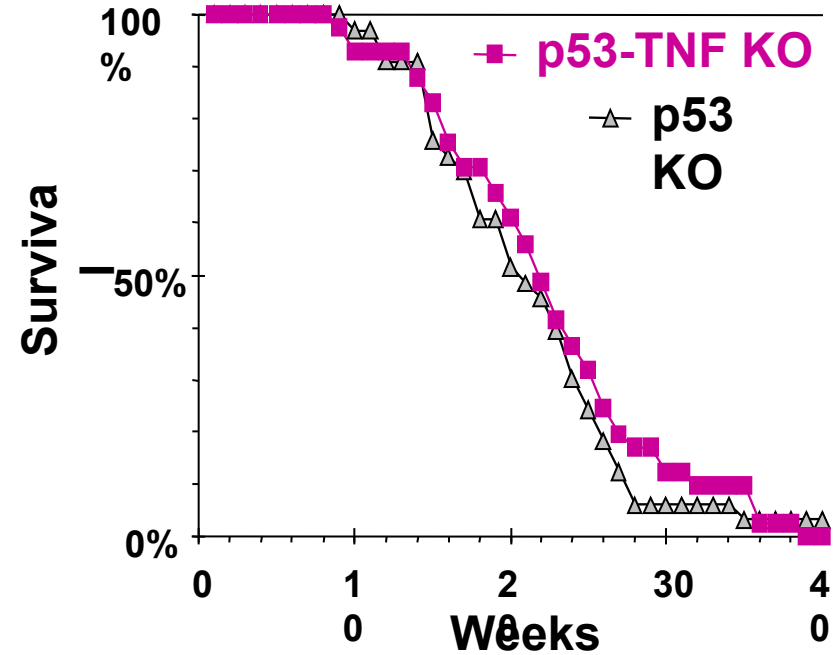
Может ли ФНО быть компонентом системы «иммунологического надзора» над возникающими опухолевыми клетками?

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

Является ли ФНО компонентом системы «иммунного надзора»?

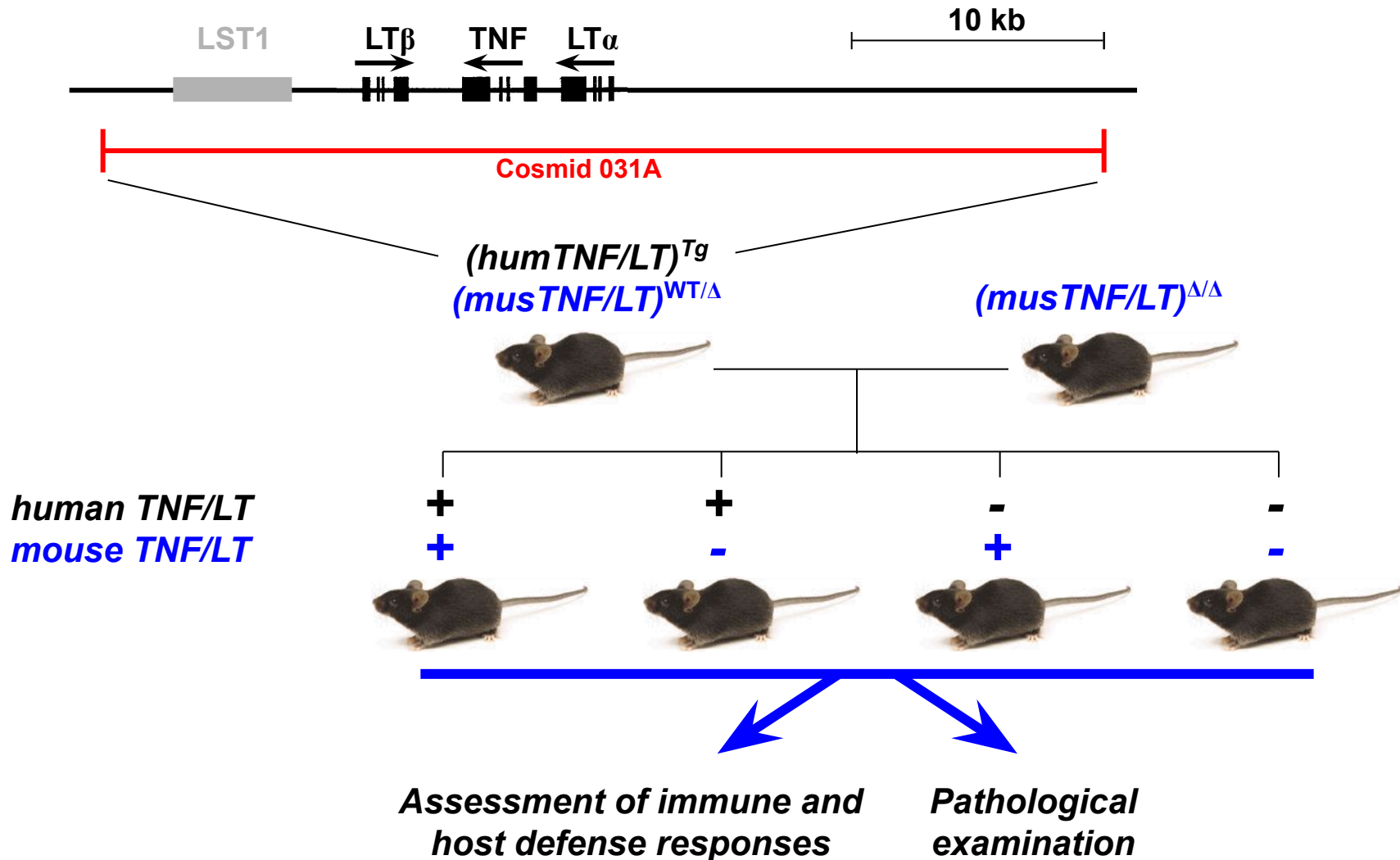


IFN γ /p53



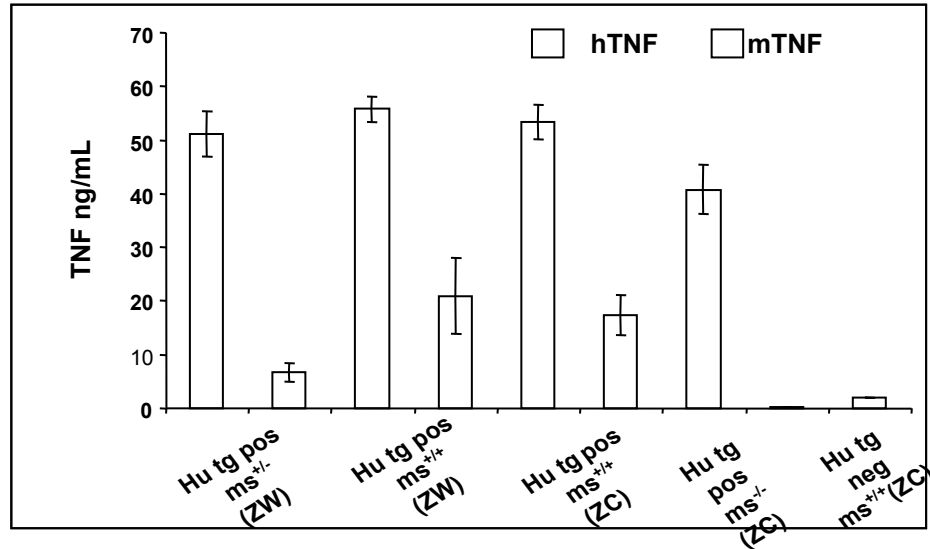
TNF/p53

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

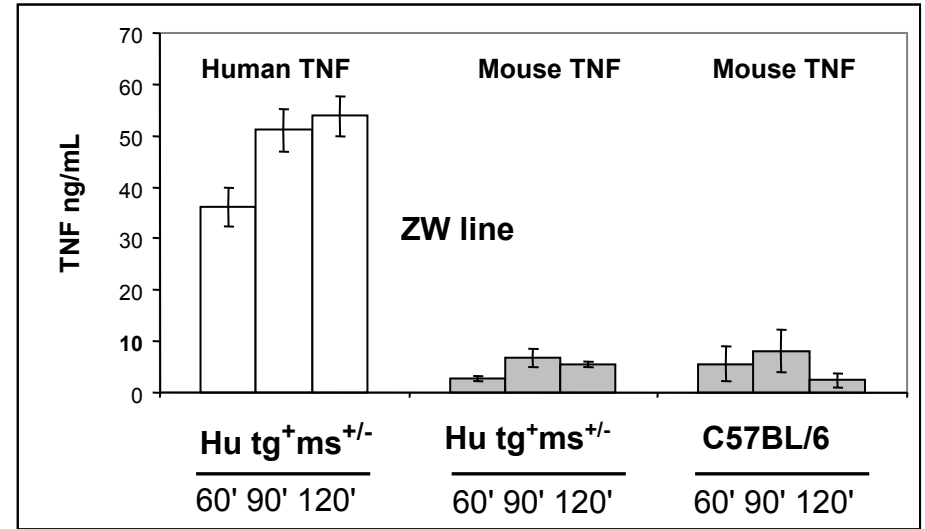


Production of human and mouse TNF by different lines of Hu-TNF/LT Tg KO mice *in vivo*

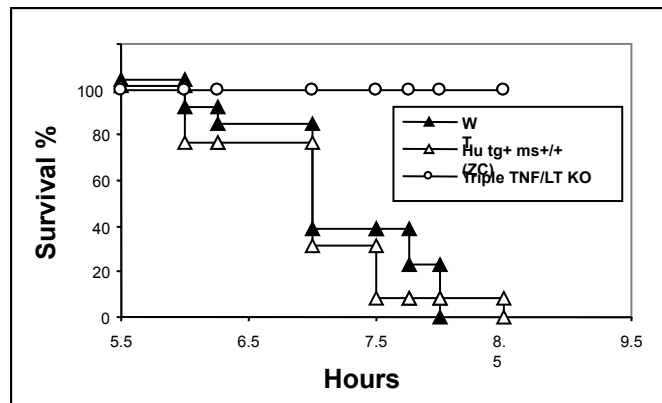
A



B

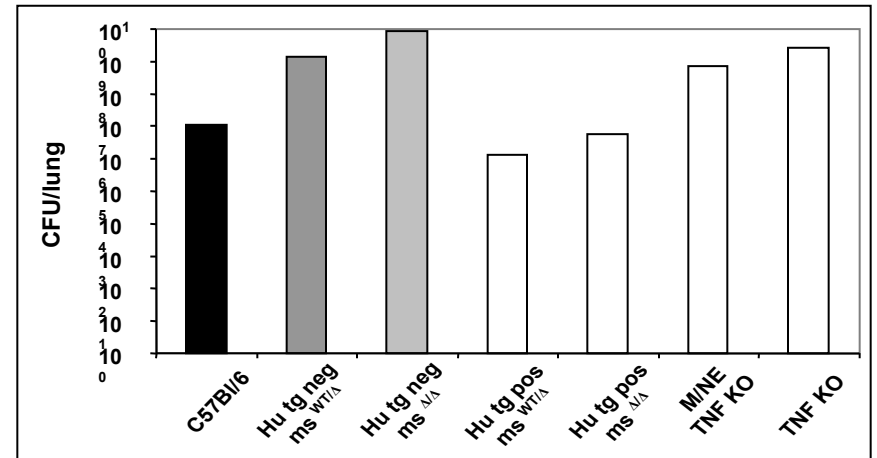
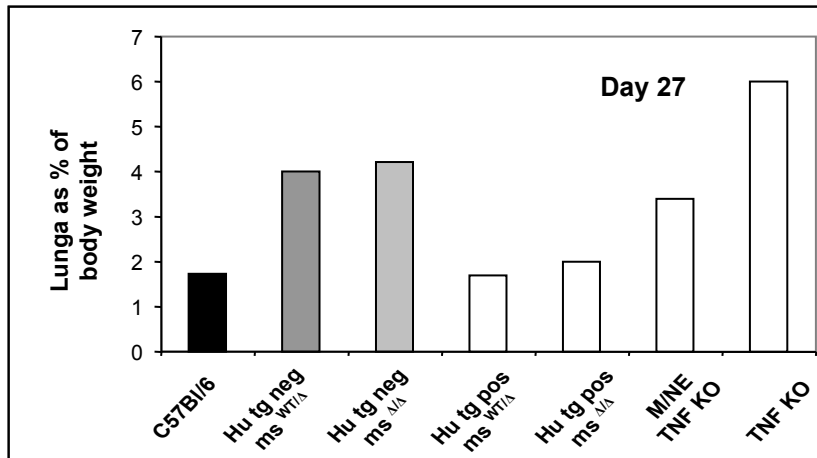
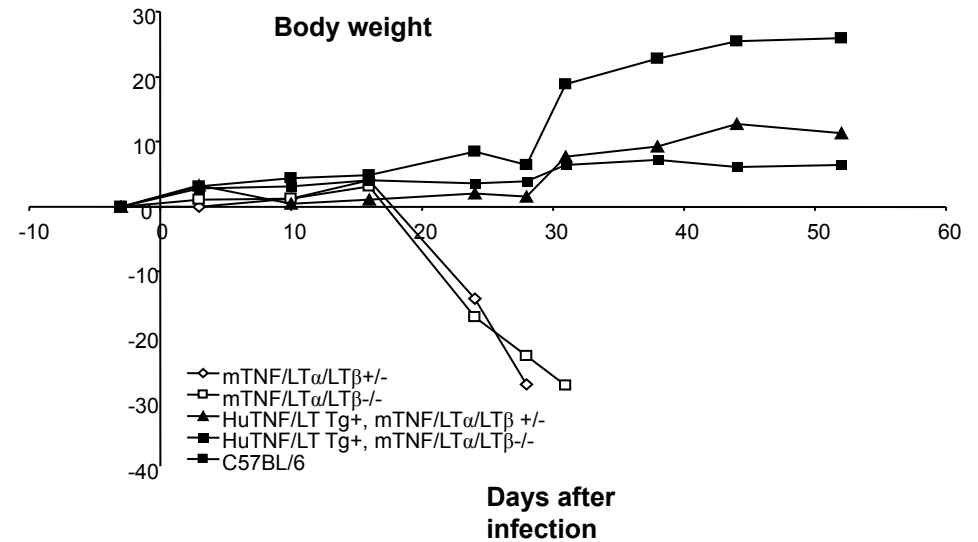
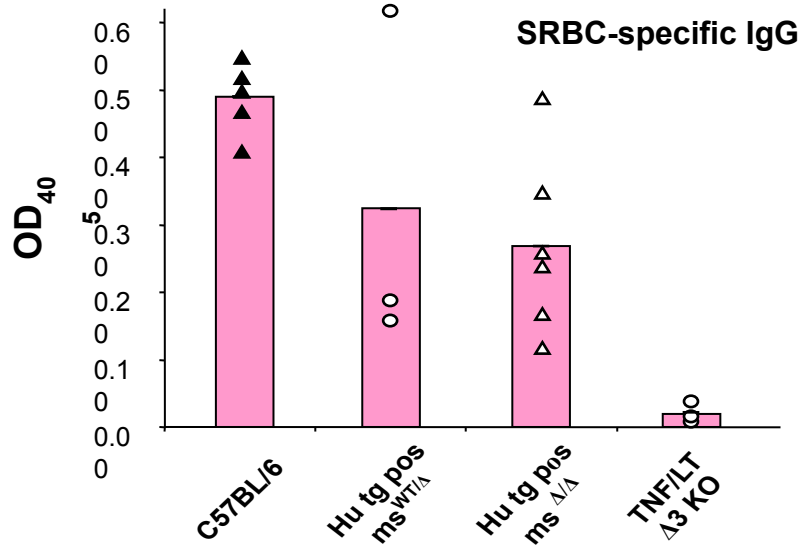


C



(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

