РОССИЙСКИЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ, 2011, том 5(14), № 3–4, с.

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

НОВАЯ ЛИНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РЕПОРТЕРНЫХ МЫШЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ

© 2011 г. А.А. Кучмий[*,], А.А. Круглов[**,***], А.Р. Галимов[***], Ю.В. Шебзухов[**], Д.М. Чудаков[****], С.А. Лукьянов[****], С.А. Недоспасов[*,**,***]**

[*]*Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;*
[**]*Немецкий Ревматологический Исследовательский Центр (DRFZ), Институт Лейбница, Шаритеплац, Берлин, Германия;*
[***]*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;*
[****]*Учреждение Российской академии наук Институт Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия;*

Поступила: 10.09.2011. **Принята**: 07.10.2011

Фактор некроза опухолей (TNF) — важный провоспалительный и иммунорегуляторный цитокин, играющий роль в защите организма от внутриклеточных паразитов и в организации структуры лимфоидных органов. С другой стороны, TNF может проявлять себя при развитии аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, язвенный колит, псориаз, а также при различных видах септического шока. Для высокочувствительного выявления клеток, производящих TNF, и их характеристики и визуализации в норме и при патологиях нами была создана новая линия трансгенных TNF-репортерных мышей. В этой модели клетки, производящие TNF, одновременно экспрессируют флуоресцентный белок («Катюшка»), и могут быть им помечены. Нами продемонстрирована совместная экспрессия TNF и Катюшки определенными типами клеток иммунной системы в ответ на специфические стимулы. Эти репортерные мыши позволяют детектировать экспрессию TNF на уровне одной клетки и могут быть использованы для более детального изучения экспресии и физиологических функций TNF в нормальных условиях и при TNF-зависимых патологиях.

Ключевые слова: TNF, флуоресцентный белок, трансгенные животные, репортерная мышиная модель

ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухолей (TNF) является важнейшим цитокином, регулирующим множество аспектов развития и функционирования иммунной системы. Исследования на мышиных моделях с фармакологической или генетической инактивацией цитокина показали критическую роль TNF в защите организма от внутриклеточных патогенов, а так же в развитии и поддержании структуры вторичных лимфоидных органов [1, 2]. Нарушение регуляции и избыточная продукция TNF могут лежать в основе патогенеза хронического воспаления, ассоциированного с целым рядом аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Крона, аутоиммуный псориаз и прочие [3]. В настоящее время для лечения некоторых из таких заболеваний успешно применяются фармакологические блокаторы TNF [3–5]. С другой стороны, системная нейтрализация этого иммунорегуляторного цитокина может приводить к серьезным побочным эффектам: реактивации туберкулеза, развитию других аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка и прочие), повышению вероятности развития лимфом [3].

В предыдущих работах нашей лаборатории была выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза о том, что отдельные функции TNF могут быть опосредованы цитокином, произведенным только каким-то определенным типом или типами клеток [6]. Если это так, то блокирование TNF, производимого только

Адрес: *119991, Москва, ул. Голева 13, ул. Вавилова.*
E-mail: *sergei.nedospasov @googlemail.com*

одним типом клеток может нейтрализовать преимущественно негативные эффекты TNF в случае патологии, но не затрагивать другие функции этого цитокина. Работы, выполненные на панели мышей с генетической инактивацией TNF в том или ином клеточном компартменте, показали, что некоторые (не все) биологические функции TNF действительно обусловлены типом клеток-продуцентов. Так TNF, производимый В-лимфоцитами, важен для поддержания гомеостаза лимфоидных органов, в частности, для созревания фолликулярных дендритных клеток (ФДС), для синтеза гомеостатических хемокинов, ответственных за пространственную сегрегацию Т- (CCL19, CCL21) и В- (CXCL13) клеточных зон первичных фолликулов, и для иммунного ответа на антигены, зависящие от Т клеток [7, 8]. TNF, продуцируемый макрофагами, важен для защиты от листериоза, а для защиты от микобактерий более важную роль играет TNF, производимый Т-лимфоцитами [6]. TNF, продуцируемый клетками, которые индуцируют образование лимфоидных тканей (LTIC), важен для эмбриогенеза Пейеровых бляшек (неопубликованные данные). С другой стороны, TNF, производимый макрофагами и нейтрофилами, играет центральную роль в патогенезе септического шока, индуцированного липополисахаридом [6]. Известно также, что в мышах без Т- и В-клеток, дефицитных по транскрипционному фактору T-bet, развивается неконтролируемая продукция TNF дендритными клетками слизистой кишечника, которая приводит к развитию колита [9]. Кроме того, в литературе был описан специальный тип клеток моноцитарного происхождения, так называемые TNF/iNOS-производящие клетки, ответственные за TNF-опосредованную защиту от бактериальных инфекций [10]. Наконец, тучные клетки производят TNF, важный для формирования подкожных гранулем [11] и для феномена «набухания» дренирующих лимфатических узлов, в случае инфекции [12, 13].

Вместе с тем, на настоящий момент далеко не все подтипы клеток, экспрессирующих TNF, хорошо охарактеризованы, и физиологическая функция некоторых клеточных источников TNF до конца не понята. Кроме того, не исключено, что существуют важные субпопуляции клеток, как иммуноцитов, так и стромальных, которые могут производить TNF в специальных условиях.

Использование новых экспериментальных подходов, основанных на флуоресцентных красителях, позволяет проводить детекцию и анализ клеток-продуцентов цитокинов с высокой чувствительностью и разрешением [14, 15]. В настоящей работе создана модель TNF-репортерных мышей с использованием гена красного флуоресцентного белка Катюшка. Эти мыши могут быть в дальнейшем использованы для различных фундаментальных и прикладных исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

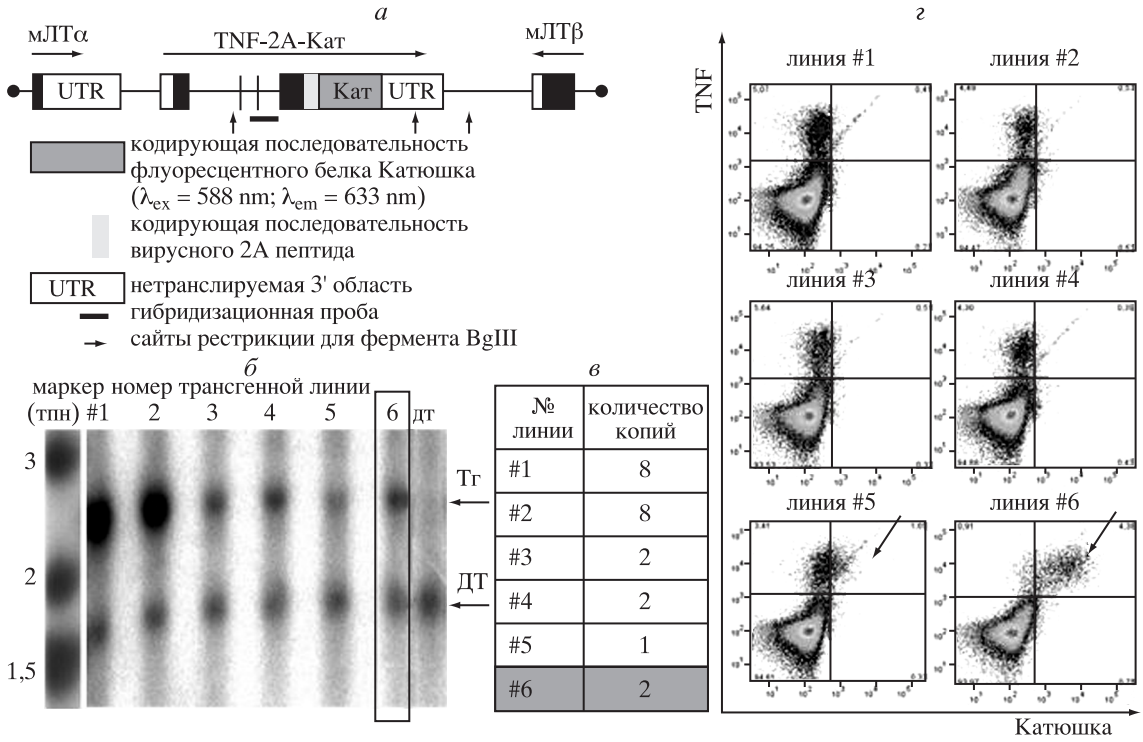
Линии мышей

TNF-2A-Кат трансгенные мыши были получены с использованием генетической конструкции, изображенной на Рис. 1а. Трансгенные мыши на генетической основе линии мышей дикого типа C57Bl/6 были получены в отделении по работе с трансгенными животными Института Клеточной Биологии и Генетики им. Макса Планка (MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, Дрезден, Германия). Анализ генотипа трансгенных животных проводили при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на геномной ДНК, выделенной из фрагмента хвоста. Для типирования использовался следующий набор праймеров: TNFTypF2 — TGGGGACAGCTCAGCTCCGT, TNFKatR — TCCTCTCCCATGTGAAGCCC, TNFTypR — CAGCGCTGAGGTCAATCTGC. Фрагмент, характерный для мышей дикого типа, соответствовал длине 650 пн; фрагмент, характерный для трансгенной вставки, соответствовал длине 430 пн.

Радиоактивное мечение проб и Саузерн-блот гибридизация

Рестриктаза для выявления трансгенной вставки BglII (New English Biolabs, R0144S) была подобрана *in silico* с использованием программы Vector NTI Advance 9. Расположение гибридизационной пробы относительно последовательности гена TNF отражено на **рис. 1а**. В результате гибридизации положительно определяются фрагменты: дикого типа — длиной 1600пн, трансгенной вставки-2400 пн.

Получение гибридизационной пробы осуществлялось методом ПЦР с использованием следующих праймеров: TNFPrF-AGGATTGAGTCAGTGTCACC, TNFPrR-AGAGACAGAAATGAGAGAGG. В качестве матрицы использовалась геномная ДНК. После



№ линии	количество копий
#1	8
#2	8
#3	2
#4	2
#5	1
#6	2

Рис. 1. Получение линии трансгенных TNF-репортерных мышей.
а — схема генетической конструкции: мЛТα — ген лимфотоксина α мыши, мЛТβ — ген лимфотоксина β мыши, TNF-2A-Кат — последовательность, содержащая ген TNF и ген флуоресцентного белка Катюшка, разделенные последовательность вирусного 2A пептида (см. пояснения в тексте); *б* и *в* — подтверждение наличия трансгенной вставки методом Саузерн-блот гибридизации и анализ количества копий вставки; *г* — анализ паттерна экспрессии TNF и Катюшки методом проточной цитофлуориметрии в мононуклеарных клетках периферической крови, стимулированных LPS (10 мкг/мл); стрелками указана популяция клеток ко-экспрессирующих TNF и Катюшку; тпн — тысяча пар нуклеотидов; ДТ — дикий тип; Тг — трансгенные TNF-репортерные мыши.

этапа промежуточного клонирования (TOPO TA cloning, Invitrogen) проба очищалась из геля при помощи коммерческого набора Gel Extraction kit II Nucleospin. Далее 50 нг пробы радиоактивно метились (^{32}dCTP) с использованием набора Amersham, RPN1604 согласно протоколу производителя. Проба очищались от не включившегося предшественника методом гель фильтрации, используя колонки с сефадексом G50 (GE HealthCare, 28-9034-08). Плавление пробы осуществлялось в течение 5 минут при 96 °С, далее пробы инкубировались на льду.

Рестрикция 10 мкг экспериментальных образцов ДНК, выделенных из биопсий хвостов, осуществлялась в течение 12 часов, фермент рестрикции был взят в концентрации (0,6 ед/мкл), всего 30 единиц. Далее образцы ДНК наносились на 0,8% агарозный гель и электрофорез проводился при 5мВ/см в течение 12 часов. Перенос ДНК на нитроцеллюлозную мембрану HybondN+, (Amersham, RPN119B) производился в 10×SSC (0.15 М цитрат натрия, 1,5 М хлорид натрия, pH = 7,0) 12–16 часов. Предгибридизация мембраны осуществлялась в гибридизационном буфере (Sigma, H7033) в течение минимум 1-го часа при 65 °С. Далее в предгибридизационный буфер добавлялась радиоактивно-меченая метка в количестве 0,05 МБк/мл. Отмывки проводились на следующий день 2xSSC, 0,1% SDS в течение 20 минут и 0,5×SSC, 0,1% SDS в течение 10 минут при 65 °С.

Проточная цитофлуориметрия

Цитофлуориметрический анализ клеток, изолированных из органов, осуществлялся, как описано в [16]. Свежевыделенные клетки селезенки инкубировались в присутствии липополисахарида (LPS, Sigma, L2630) (100 нг/мл), клетки из лимфатических узлов — в присутствии форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA, Sigma, 79346) (100 нг/мл)/иономицина (Iono, Sigma, I0634) (1 мкг/мл) в течение 6 часов. Для внутриклеточного окрашивания цитокинов на последние 5 часов инкубации добавлялся брефельдин А (Sigma, B6542) в концентрации (5 мкг/мл). Для блокировки Fcγ-рецепторов использовалось анти-Fcγ-

антитело (11 мкг/мл, DRFZ). Анализ иммунофенотипа клеток осуществлялся антителами к соответствующим поверхностным антигенам: CD11b-FITC (3 мкг/мл, M1/70, DRFZ), CD11c-bio (2,5 мкг/мл, N418, eBioscience,13-0114-82) и CD3-bio (2,5 мкг/мл, 17A2, eBioscience, 13-0031-85) — окрашенные стрептавидином, конъюгированным с APC-eFluor780 (0,4 мкг/мл, 47-4317-82, eBioscience), anti-CD19-FITC (2,5 мкг/мл, 1D3, DRFZ), анти-TNF-антитела (5 мкг/мл, XT22, BD Farmingen, 554420). Для проникновения внутрь клеток антител к внутриклеточным антигенам клетки обрабатывались 0,5% сапонином (Sigma, 84510) в фосфатном буфере, содержащем 0,1% бычьего сывороточного альбумина. Анализ проводился на цитофлуориметре BD LSRFortessa. Белок Катюшка детектировался следующим набором фильтров: LP = 600 нм (фильтр нижних частот) и BP = 610/20 нм (полосовой фильтр), возбуждающая длина волны 561 нм генерировалась желто-зеленым лазером (100 мВ).

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция в реальном времени

Суммарная матричная РНК была выделена при помощи реагента Tri-reagent (Sigma,T9424) согласно рекомендованному протоколу изготовителя. Для синтеза первых цепей кДНК использовался 1 мкг тотальной матричной РНК (мРНК). Примеси ДНК были удалены обработкой ДНКазой (Promega, M6101) при 37 °С в течение 1 ч, с последующе инактивацией фермента при 65 °С в течение 10 мин. Далее осуществлялся отжиг случайных 9-нуклеотидных праймеров (0,1 мкг/мкл) с пробой при 70 °С в течение 5 мин, для предотвращения плавления праймеров реакция затем охлаждалась на льду. Реакция обратной транскрипции осуществлялась с использованием набора ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, A3800). В состав реакции входили следующие компоненты: образец РНК с праймерами, хлорид магния (5mM), набор дезоксинуклеотидов (2 мМ), ингибитор рибонуклеаз (RNAsin, Promega, N2511) 10 единиц на реакцию, обратная транскриптаза (ImProm-II™ Reverse Transcriptase, Promega, A3802) 1 мкл. В качестве негативного контроля использовался образец без добавления обратной транскриптазы. Реакционная смесь с Brilliant II SYBR Green QPCR (Agilent, 600828) 2,5X применялась для полимеразно-цепной реакции в реальном времени. Для определения количества копий транскриптов TNF использовались следующие праймеры: mTNFe2—3F: CCCAGACCCTCACACTCAGATCA, mTNFe4R: GATCCATGCCGTTGGCCAGGA, размер ампликона 141 пн ; для определения количества копий транскриптов Катюшки использовались праймеры: KatRNAF-GGTGAACTTCCCATCCAACGG, KatRNAR-TCTTGAGGGAGCAGTGCAGG, размер ампликона 158 пн.

Культуры костномозговых макрофагов

Костномозговые макрофаги были получены как описано в работе [17] с использованием рекомбинантного макрофагального колониестимулирующего фактора (30 нг/мл, Milteniy Biotech, 130—094—129). Для анализа продукции цитокинов костномозговые макрофаги (10^6/мл) стимулировались липополисахаридом (LPS, Sigma, L2630) в концентрации 100 нг/мл в полной среде RPMI 1640, с добавлением пенициллина/стрептомицина и 10% бычьей сыворотки.

Определение концентрации TNF

Количественная оценка TNF осуществлялась с помощью коммерческого набора для иммуноферментного определения (eBioscience, 88-7324-88) мышиного TNF. Чувствительность наборов находится в диапазоне 8—1000 пг/мл

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение и отбор линии трансгенных TNF-репортерных мышей

Для получения трансгенной линии TNF-репортерных мышей использовалась генетическая конструкция TNF-2A-Кат, изображенная на **рис. 1а**. Для обеспечения своих физиологических функций TNF должен производиться определенными клетками организма, причем его количество, время синтеза и кинетика высвобождения должны четко регулироваться. Для того, чтобы максимально сохранить регуляторные генетические элементы, ответственные за правильный биосинтез TNF, в генетической конструкции использовалась большая часть локуса TNF/ЛТ размером в 11 тпн. В качестве флуорохрома для мечения TNF-экспрессирующих клеток был выбран белок Катюшка [18, 19]. Длины волн возбуждения и эмиссии этого белка (λ_{ex} = 588 нм и λ_{em} = 633 нм, соответственно) попадают в «оптическое окно», благоприятное для проникновения флуоресценции сквозь живые ткани. Таким образом, использование Катюшки является перспективным для при-

жизненной микроскопии тканей. Более того, использование флуоресцентной метки в качестве маркера с применением современного оборудования позволяет осуществлять анализ на уровне одной клетки, в том числе в тканях и органах. Гены TNF и Катюшки в конструкции были разделены последовательностью вирусного 2А пептида [20]. Трансляция через эту аминокислотную последовательность приводила к раздельному синтезу TNF и Катюшки.

В результате двух раундов микроинъекций конструкции были получены 6 линий животных, несущих различное число копий трансгена TNF-2A-Кат (**рис. 1б, в**). Анализ экспрессии TNF и Катюшки в мононуклеарных клетках периферической крови после стимуляции липополисахаридом (LPS) позволил отобрать линию #6 (рис. 1в), как показавшую наиболее высокий уровень экспрессии репортёрного белка с хорошей корреляцией между экспрессией TNF и Катюшки в моноцитах периферической крови. Именно эта линия мышей была использована в дальнейшей работе.

Первичная характеристика репортерных TNF-2A-Кат мышей in vitro

Для верификации TNF-2A-Кат репортерной модели (Тг) был проведен ряд *in vitro* экспериментов, в которых продукция TNF и Катюшки анализировалась в ответ на специфический для определенного вида клеток стимул.

За распознавание бактериальных продуктов клетками врожденного иммунитета ответственны различные паттерн-распознающие рецепторы, в том числе, Толл-подобные рецепторы (TLR). Активация TLR 4, экспрессированного на макрофагах и нейтрофилах, под действием липополисахарида приводит к активному синтезу и секреции TNF [21]. Клетки селезенки TNF-репортерных мышей были активированы LPS и последующий анализ экспрессии TNF и Катюшки проводили методом проточной цитофлуориметрии. Оказалось, что TNF и Катюшка ко-экспрессированы в $CD11b^+CD11c^-$ макрофагах, $CD11b^+CD11c^+$ дендритных клетках и $CD11b^{high}$ $CD11c^-$ нейтрофилах (**рис. 2**).

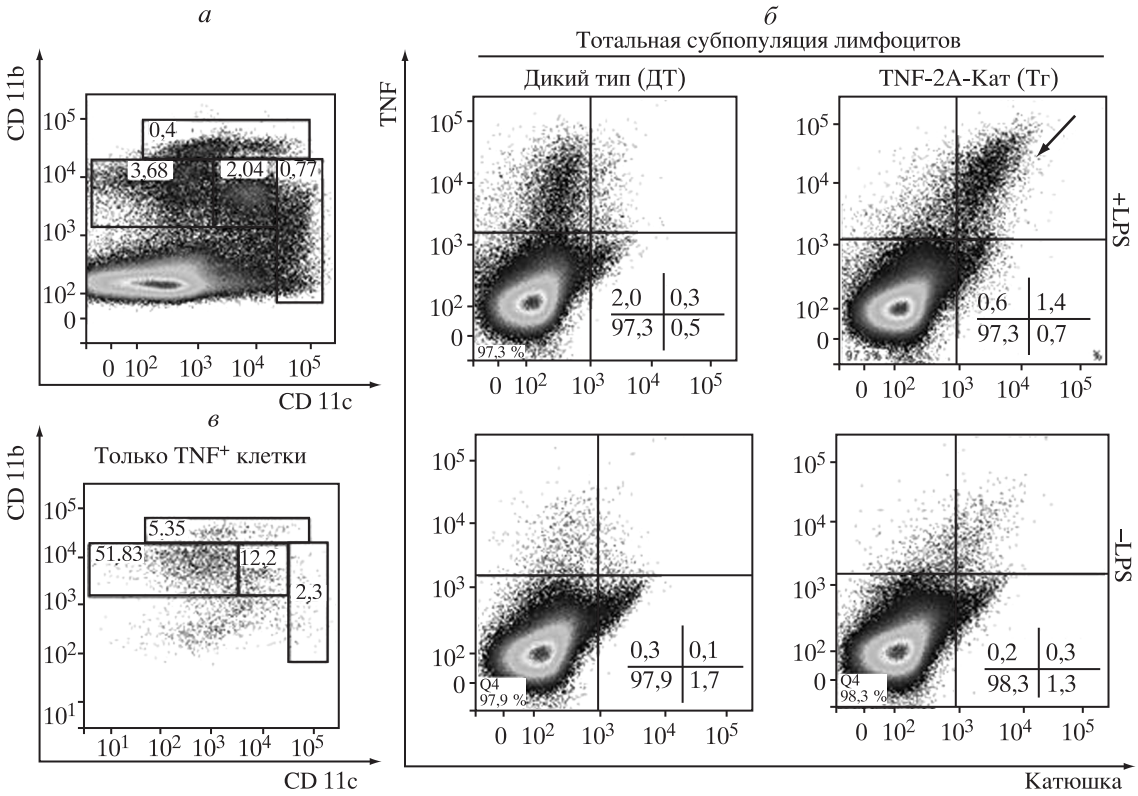


Рис. 2. Первичная характеристика репортерных TNF-2A-Кат мышей *in vitro*: анализ экспрессии TNF и Катюшки спленоцитами в ответ на стимуляцию LPS.
а — типичный процентный состав клеток миелоидного ряда в селезенках мышей дикого типа (ДТ) и репортерных мышей (Тг); *б* — анализ экспрессии TNF и Катюшки в спленоцитах после стимуляции LPS в указанных группах мышей, совместная экспрессия TNF и Катюшки в спленоцитах репортерных мышей показана стрелкой; *в* — анализ иммунофенотипа клеток, экспрессирующих TNF и Катюшку: $CD11b^+$ $CD11c^-$, $CD11b^+CD11c^{int}$ макрофаги и $CD11b^{high}$ нейтрофилы.

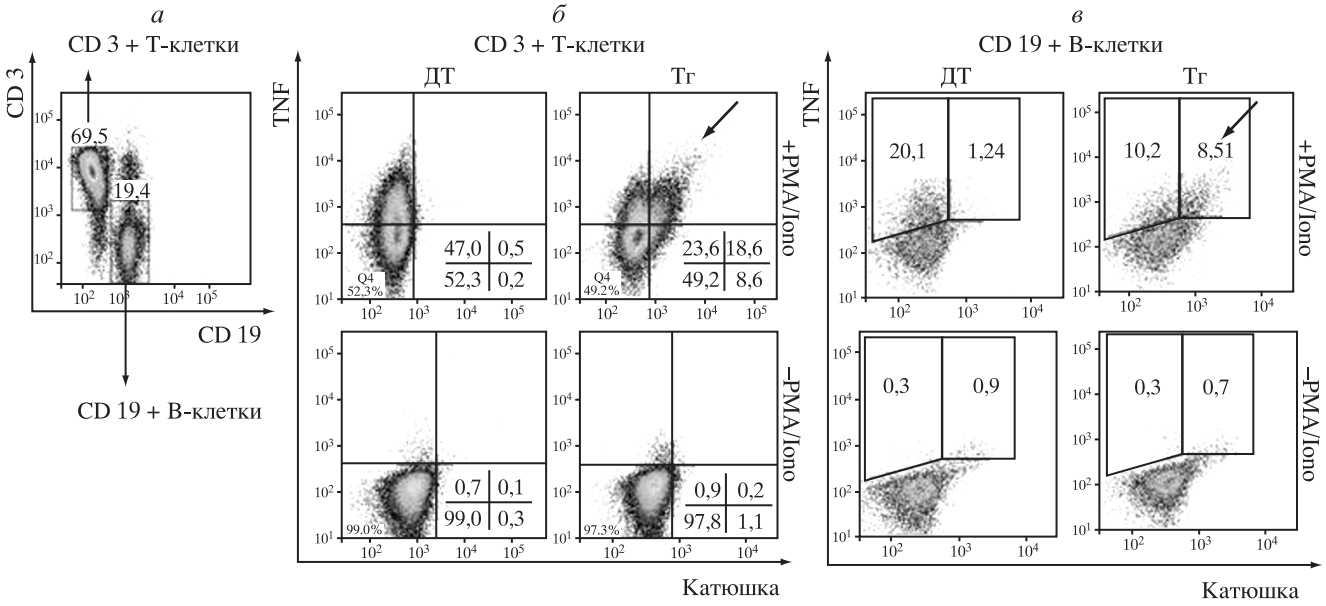


Рис. 3. Первичная характеристика репортерных TNF-2A-Кат мышей *in vitro*: анализ экспрессии TNF и флуоресцентного белка Катюшки в $CD3^+$ Т-клетках и $CD19^+$ В-клетках после стимуляции PMA/иономицином.
а — типичный процентный состав $CD3^+$ Т- и $CD19^+$ В-клеток в лимфатических узлах мышей дикого типа (ДТ) и репортерных мышей (Тг); *б* и *в* — анализ экспрессии TNF и Катюшки Т- клетками и В-клетками, соответственно, после стимуляции PMA/иономицином. Фракция TNF-производящих Т- и В-клеток, которая ко-экспрессирует Катюшку после стимуляции PMA/иономицином показана стрелкой

TNF из В- и Т-лимфоцитов важен для поддержания микроархитектуры вторичных лимфоидных органов [6—8]. Однако анализ нестимулированных клеток лимфатических узлов из TNF-репортерных мышей не выявил заметной экспрессии TNF и Катюшки (**рис. 3**). Для детекции экспрессии TNF клетками лимфатических узлов использовалась стимуляция PMA и иономицином. Иономицин представляет собой Ca^{2+} ионофор, а PMA является активатором протеин-киназы С, причем совместное действие этих двух реагентов является фармакологическим аналогом активации Т-клеточного или В-клеточного рецепторов. Для внутриклеточного накопления цитокинов использовался лактонный антибиотик брефельдин А, блокирующий ретроградный транспорт из аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум, что обеспечивало более надежную детекцию [16]. На рис. 3б и рис. 3в изображены двумерные графики, отражающие процентное содержание Т- и В клеток из лимфатических узлов, производящих TNF и Катюшку после стимуляции PMA/иономицином. Из графиков видно, что TNF и Катюшку совместно экспрессирует только часть TNF-производящих Т- и В клеток. Такая частичная ко-экспрессия может быть обусловлена особенностями регуляции генов с трансгенной вставки TNF-2A-Кат в данном подтипе клеток на уровне транскрипции или трансляции.

Особенности регуляции экспрессии гена TNF с трансгенной вставкой in vitro в культурах костномозговых макрофагов

Культуры костномозговых макрофагов являются удобной модельной системой для изучения регуляции экспрессии TNF на уровнях транскрипции, стабильности мРНК и трансляции. Костномозговые макрофаги представляют собой первичную гомогенную клеточную культуру, дифференцированную из клеток костного мозга *in vitro* в присутствии макрофагального колониестимулирующего фактора [22].

Для наших экспериментов трансгенные репортерные мыши были скрещены с мышами, дефицитными по TNF [23]. Костномозговые макрофаги были получены из мышей разного генотипа: гемизигот по трансгенной вставке, имеющих один аллель TNF дикого типа ($Тг^+TNF^{+/-}$), гемизигот по трансгенной вставке на генетической основе TNF-дефицитных мышей ($Тг^+TNF^{-/-}$) и мышей с делецией одного аллеля TNF ($Тг^-TNF^{+/-}$). Клетки были стимулированы LPS и анализ кинетики экспрессии мРНК TNF осуществлялся методом полимеразной цепной реакции в

реальном времени, причем полученные значения нормировались на количество убиквитарного транскрипта β-актина. Как видно из графика (**рис. 4а**) относительное количество транскриптов мРНК «трансгенного» TNF и TNF дикого типа имеют схожий паттерн экспрессии с пиком через 1 час после активации, что соответствует опубликованным данным [24, 25]. Однако, в клетках репортерных мышей, имеющих генетическую основу TNF-«нокаута», мРНК цитокина через 6 часов после стимуляции уже не определялась, когда как в клетках дикого типа мРНК TNF через такое же время она еще детектировалась. Этот результат может быть связан со сниженной стабильностью мРНК трансгенной вставки или другими особенностями регуляции, которые еще предстоит установить. Количество транскриптов флуоресцентного белка Катюшка (**рис. 4б**) совпадает с количеством мРНК TNF трансгенной вставки в мышах $Tr^{+}TNF^{-/-}$, что указывает на преимущественную экспрессию целостного транскрипта. Совпадение количеств мРНК Катюшки в макрофагах $Tr^{+}TNF^{+/-}$ и $Tr^{+}TNF^{-/-}$ говорит о том, что экспрессия мРНК с трансгенной вставки не зависит от наличия или отсутствия эндогенных генов TNF.

Параллельно с анализом экспрессии транскриптов TNF была проанализирована продукция цитокина в среде (**рис. 4в**). Количество TNF в супернатантах от макрофагов $Tr^{+}TNF^{-/-}$ было значительно снижено по сравнению с количеством TNF, экспрессируемом макрофагами $TNF^{+/-}$ во всех временных точках. Такое снижение вероятно является следствием того, что только часть клеток из общей популяции макрофагов экспрессирует трансгенную вставку (данные не показаны).

Таким образом, можно заключить, что хотя общий паттерн экспрессии мРНК TNF трансгенной вставки соответствует таковому для эндогенных аллелей, имеются особенности регуляции гена в трансгенной вставке на уровне транскрипции и, возможно, на посттранскрипционном уровне, которые еще предстоит изучить.

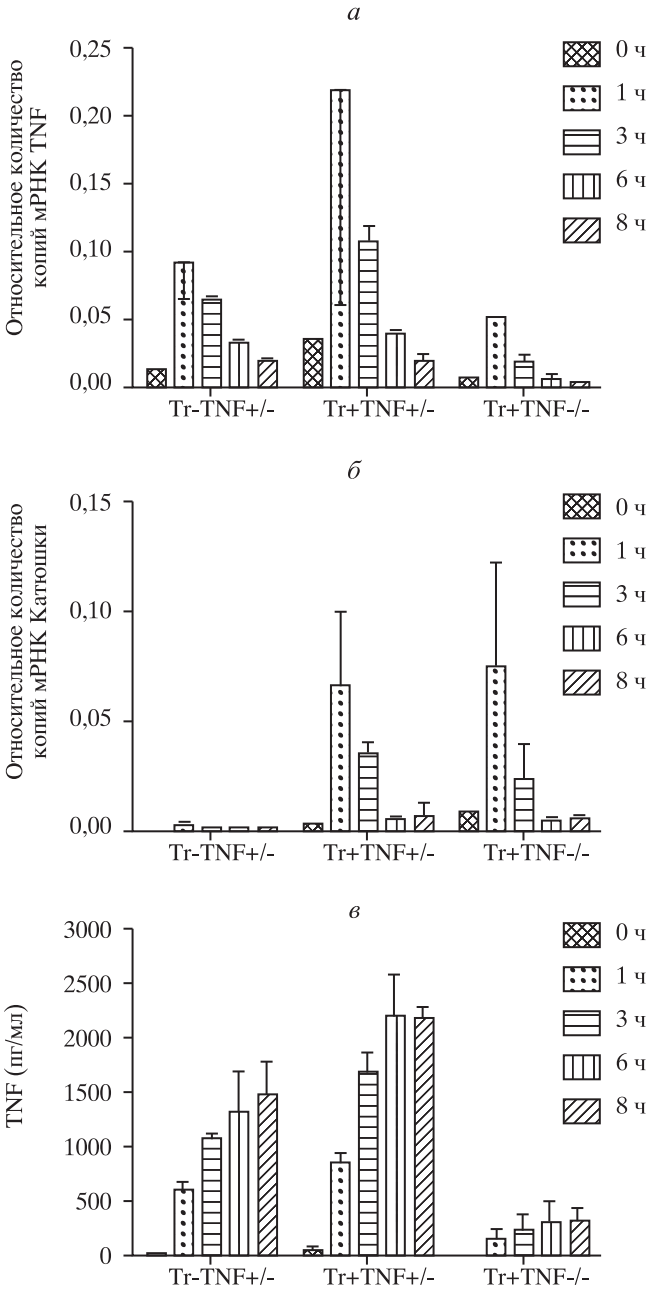


Рис. 4. Особенности регуляции экспрессии гена TNF с трансгенной вставкой *in vitro* в культурах костномозговых макрофагов.
а — кинетика продукции мРНК гена TNF костномозговыми макрофагами в ответ на стимуляцию LPS. Использовались макрофаги следующих генотипов: $Tr^{-}TNF^{+/-}$, $Tr^{+}TNF^{+/-}$, $Tr^{+}TNF^{-/-}$; *б* — кинетика продукции мРНК гена Катюшки макрофагами с тем же генотипом; *в* — кинетика экспрессии белка TNF макрофагами с тем же генотипом. Количество копий транскриптов TNF и Катюшки нормализовалось на количество копий транскриптов β-актина, ч — час.

ОБСУЖДЕНИЕ

TNF представляет собой важнейший многофункциональный цитокин, нарушение регуляции и избыточная продукция которого лежат в основе патогенеза некоторых острых и хронических заболеваний. Настоящая работа посвящена созданию и первичной характеристике новой трансгенной линии TNF-репортерных мышей.

В качестве метки в TNF-репортерной модели использовался флуоресцентный белок, что позволяет выделять отдельные живые клет-

ки- продуценты TNF с помощью цитофлуориметрического сортера, а затем проводить фенотипический и транскриптомный анализ. Флуоресцентная метка также делает возможным визуализацию и локализацию TNF-экспрессирующих субпопуляций на срезах тканей и в толще органов (с использованием двухфотонной микроскопии) [15]. Предыдущие опубликованные работы использовали другие, менее эффективные системы детекции. Так, ранее использовался репортерный трансген, содержащий 4 тпн локуса TNF, в котором сам ген TNF был замещен геном хлорамфениколацетилтрансферазы [26]. Детекция экспрессии могла проводиться только в гомогенатах ткани. Кроме того, была разработана другая трансгенная TNF — репортерная модель, где под контролем 2,5 тпн предпромоторной области гена TNF (с сохранением 3′-нетранслируемой области гена TNF) синтезировалась люцифераза [27]. Следует отметить, что сканирующая биолюминесцентная томография всего тела с использованием люциферазы имеет меньшее разрешение по сравнению с двухфотонной прижизненной флуоресцентной микроскопией [28]. Другим преимуществом TNF-2A-Кат модели, в сравнении с опубликованными TNF-репортерными мышами, является сохранение большинства известных регуляторных элементов, ответственных за синтез TNF. Так, нами использовался участок локуса TNF/ЛТ длиной в 11 тпн, включавший и регуляторный элемент в 3-м интроне гена [29].

Нами показано, что TNF и флуоресцентный белок Катюшка совместно экспрессируются в дендритных клетках, макрофагах и нейтрофилах селезенки, в ответ на липополисахарид. Анализ экспресии TNF в клетках адаптивного иммунитета показал частичную корреляцию продукции TNF и Катюшки в В-клетках и Т-клетках в ответ на PMA/иономицин. Эти результаты позволяют считать основную задачу исследования выполненной. Созданная модель является уникальным инструментом для изучения биологических функции TNF в норме и при патологиях. Дальнейшие исследования будут направлены на характеристику субпопуляций клеток, производящих TNF, в моделях TNF-зависимых патологий, таких как коллаген индуцированный артрит, LPS- и КонканавалинА — индуцированный шок, а так же в моделях колита и при инфекционных заболеваниях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа осуществлена при поддержке Гос. контрактов №16.512.11.2054 и №16.740.11.0005 Министерства образования и науки РФ и грантов ДФГ SFB633, Transregio 52. Мы благодарны Р. Науману за помощь в получении трансгенных животных, Л.Н. Друцкой за генотипирование мышей и Д.В. Купрашу за полезные обсуждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nedospasov S.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V.* Physiologic roles of members of the TNF and TNF receptor families as revealed by knockout models. In: Contemporary immunology: Cytokine Knockouts, 2nd edition, Fantuzzi G. (ed.), Humana Press, Inc., Totowa, NJ 2003, 439—460.
2. *Efimov G.A., Kruglov A.A., Tillib S.V., Kuprash D.A., Nedospasov S.A.* Tumor Necrosis Factor and the consequences of its ablation in vivo. Mol. Immunol. 2009, 47(1), 19—27.
3. *Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H., Salfeld J.G., Tak P.P.* Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol. Ther. 2008, 117(2), 244—279.
4 *Feldmann M., Brennan F.M., Elliott M., Katsikis P., Maini R.N.*TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. Circ. Shock. 1994, 43(4), 179—84.
5. *Насонов Е.Л.* Перспективы фармакотерапии воспалительных ревматических заболеваний: моноклональные антитела к фактору некроза опухоли. РМЖ, 2001, 7, 280—284.
6. *Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. et al.* Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. Immunity 2005, 22(1), 93—104.
7. *Tumanov A.V., Grivennikov S.I., Kruglov A.A., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. et al.* Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. Blood 2010, 116(18), 3456—3464.
8. *Endres R., Alimzhanov M.B., Nedospasov S.A., Pfeffer K., Pfeffer K. et al.* Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. J. Exp. Med. 1999, 189(1), 159—68.
9. *Garrett W.S., Lord G.M., Punit S., Glickman J.N., Glimcher L.H. et al.* Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. Cell 2007, 131(1), 33—45.
10. *Serbina N.V., Salazar-Mather T.P., Biron C.A., Kuziel W.A., Pamer E.G.* TNF/iNOS-producing

dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity 2003, 19(1), 59–70.
11. *von Stebut E., Metz M., Milon G., Knop J., Maurer M.* Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1alpha/beta released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNFalpha. Blood 2003, 101(1), 210–215.
12. *McLachlan J.B., Hart J.P., Pizzo S.V., Shelburne C.P., Abraham S.N. et al.* Mast cell-derived tumor necrosis factor induces hypertrophy of draining lymph nodes during infection. Nat. Immunol. 2003, 4(12), 1199–1205.
13. *Kunder C.A., St John A.L., Li G., Leong K.N., Abraham S.N. et al.* Mast cell-derived particles deliver peripheral signals to remote lymph nodes. J. Exp. Med. 2009, 206(11), 2455–2467.
14. *Croxford A.L., Buch T.* Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned. Immunology 2011, 132(1), 1–8.
15. *Phan T.G., Bullen A.* Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper. Immunol. Cell. Biol. 2010, 88(4), 438–444.
16. *Foster B., Prussin C., Liu.F, Whitmire J.K, Whitton J.L.* Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry. In: Curr. Protoc. Immunol., John Wiley & Sons, Inc., 2007, 78:6.24.1–6.24.21.
17. *Tanne A., Ma B., Boudou F., Tailleux L., Neyrolles O. et al.* A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. J. Exp. Med. 2009, 206(10), 2205–2220.
18. *Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Lukyanov S., Chudakov D.M. et al.* Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. Nat. Methods. 2007, 4(9), 741–746.
19. *Diéguez-Hurtado R., Martín J., Martínez-Corral I., Martínez M.D., Ortega S. et al.* A Cre-reporter transgenic mouse expressing the far-red fluorescent protein Katushka. Genesis. 2011, 49(1), 36–45.
20. *Radcliffe P.A., Mitrophanous K.A.* Multiple gene products from a single vector: 'self-cleaving' 2A peptides. Gene Therapy 2004, 11, 1673–1674.
21. *Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R.* Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. Nature 2007, 447(7147), 972–978.
22. *Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M.* The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. In: Curr. Protoc. Immunol., John Wiley & Sons, Inc., 2008, 83:14.1.1–14.1.14.
23. *Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. et al.* Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. Eur. J. Immunol. 2005, 35(5), 1592–600.
24. *Dumitru C.D., Ceci J.D., Tsatsanis C., Kontoyiannis D., Tsichlis P.N.* TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway.Cell 2000, 103(7), 1071–1083.
25. *Kontoyiannis D., Pasparakis M., Pizarro T.T., Cominelli F. Kollias G.* Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. Immunity 1999, 10(3), 387–398.
26. *Giroir B.P., Johnson J.H., Brown T., Allen G.L., Beutler B.* The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. J. Clin. Invest. 1992, 90(3), 693–698.
27. *Kravchenko V.V., Kaufmann G.F., Mathison J.C., Scott D.A., Ulevitch R.J. et al.* Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule. Science 2008, 321(5886), 259–263.
28. *Luker G.D., Luker K.E.* Optical imaging: current applications and future directions. J. Nucl. Med. 2008, 49(1), 1–4.
29. *Barthel R., Goldfeld A.E.* T cell-specific expression of the human TNF-alpha gene involves a functional and highly conserved chromatin signature in intron 3. J. Immunol. 2003, 171(7), 3612–3619.

NEW TNF REPORTER MOUSE TO STUDY TNF EXPRESSION

A.A. Kuchmiy[*,], A.A. Kruglov[**,***], A.R. Galimov[***], Y.V. Shebzukhov[**], D.M. Chudakov[****], S.A. Lukyanov[****], S.A. Nedospasov[*,**,***]**

[*]*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia;*
[**]*German Rheumatism Research Centre (DRFZ), a Leibniz Institute, Berlin, Germany;*
[***]*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*
[****]*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Tumor necrosis factor (TNF) is an important proinflammatory and immunomodulatory cytokine which plays critical role in host defense against intracellular bacterial infections and in the maintenance of lymphoid tissues microstructure. On the other hand, TNF may be involved in the development of autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, psoriasis and also of different types of septic shock. In order to detect TNF-expressing cells with high sensitivity and to characterize and visualize them in normal and pathological conditions we generated a new transgenic TNF-reporter mouse line. In this model TNF-producing cells are simultaneously expressing fluorescent protein «Katushka», i.e. they can be labeled with fluorescent marker. We demonstrated co-expression of TNF and Katushka in specific cellular subsets in response to appropriate stimuli *ex vivo*. These reporter mice allow detecting TNF expression at a single-cell level and can be utilized for studies on physiological TNF functions in normal conditions and in TNF-dependent pathologies.