

## ИММУНОБИОЛОГИЯ ЛИМФОТОКСИНА: РОЛЬ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Гоголева В.С.<sup>1</sup>, Друцкая М.С.<sup>1,2</sup>, Недоспасов С.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Резюме.** Сложность иммунобиологии лимфотоксина (LT $\alpha$ ) связана с несколькими модальностями передачи сигнала — от растворимого гомотримера или от мембранного гетеротримера, с участием минимум трех рецепторов. Известно, что лимфотоксин критически важен для образования и поддержания нормальной архитектуры вторичных лимфоидных органов. Несмотря на эти гомеостатические функции LT $\alpha$ , его избыточная продукция характерна для таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и рассеянный склероз. Роль лимфотоксина в развитии модели рассеянного склероза у мышей, экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЕАЕ), считалась патогенной, так как в ранних работах мыши с генетической инактивацией LT $\alpha$  были резистентны к индукции ЕАЕ. Однако индукция ЕАЕ у RAG1-дефицитных мышей, которым был осуществлен адоптивный перенос костного мозга от LT $\alpha$ -дефицитных мышей, приводила к развитию клинических симптомов ЕАЕ, тем самым ставя под сомнение вывод о роли LT $\alpha$  в развитии ЕАЕ.

Целью работы было прояснение роли LT $\alpha$  в ЕАЕ, вызываемого иммунизацией MOG<sub>35-55</sub>-пептидом. Для этого использовали мышей с генетическим дефицитом по LT $\alpha$  или по LT $\beta$ R, являющимся рецептором для мембранного комплекса. Нокаутные по LT $\alpha$  мыши были созданы в лаборатории ранее и свободны от артефакта, связанного с дизайном генетической конструкции, который приводил к подавлению экспрессии гена TNF в миелоидных клетках у широко распространенного «классического» нокаута по LT $\alpha$ .

Оказалось, что мыши с дефицитом LT $\alpha$  и с интактной экспрессией TNF развивали ЕАЕ, сравнимый по клиническим показателям с мышами дикого типа. В то же время генетическая инактивация LT $\beta$ R приводила к задержке в развитии ЕАЕ, однако на поздних этапах заболевания результатом удаления LT $\beta$ R было ухудшение клинических симптомов ЕАЕ.

Таким образом, вклад LT $\alpha$  в развитие ЕАЕ является более сложным, чем предполагали ранее, а LT $\beta$ R выполняет различные функции в зависимости от стадии заболевания — патогенную на ранней стадии и защитную на поздних этапах развития болезни.

**Ключевые слова:** цитокины, лимфотоксин, LT $\beta$ R, мышинные модели, рассеянный склероз, ЕАЕ

### Адрес для переписки:

Недоспасов Сергей Артурович  
ФГБУН «Институт молекулярной биологии  
имени В.А. Энгельгардта»  
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.  
Тел.: 8 (499) 135-23-11.  
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

### Address for correspondence:

Sergei A. Nedospasov  
Engelhardt Institute of Molecular Biology  
32 Vavilov St  
Moscow  
119991 Russian Federation  
Phone: +7 (499) 135-23-11.  
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

### Образец цитирования:

В.С. Гоголева, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов  
«Имунобиология лимфотоксина: роль в мышинной  
модели рассеянного склероза» // Российский  
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 4. С. 437-442.  
doi: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

© Гоголева В.С. и соавт., 2023  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

V.S. Gogoleva, M.S. Drutskaya, S.A. Nedospasov  
“Immunobiology of lymphotoxin: Role in a mouse model of  
multiple sclerosis”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy  
Immunologicheskii Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 4, pp. 437-442.  
doi: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

© Gogoleva V.S. et al., 2023  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-13534-IOL

## IMMUNOBIOLOGY OF LYMPHOTOXIN: ROLE IN A MOUSE MODEL OF MULTIPLE SCLEROSIS

Gogoleva V.S.<sup>a</sup>, Drutskaya M.S.<sup>a, b</sup>, Nedospasov S.A.<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

**Abstract.** Complex immunobiology of lymphotoxin (LT $\alpha$ ) is due to multiple modalities of signal transduction, involving a soluble homotrimer and membrane-bound heterotrimers that engage at three different receptors. While LT $\alpha$  is crucial for the formation and maintenance of secondary lymphoid organs, its overproduction is observed in autoimmune diseases, e.g., rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. Initially, LT $\alpha$  was considered pathogenic in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a mouse model of multiple sclerosis, as demonstrated by resistance of mice with genetic LT $\alpha$  inactivation to EAE induction. However, conflicting observations arose when EAE was induced in RAG1-deficient mice that underwent adoptive bone marrow transfer from LT $\alpha$ -deficient mice, thereby calling into question previous conclusions about the role of LT $\alpha$  in EAE development. This study aimed to investigate the role of LT $\alpha$  in MOG<sub>35-55</sub>-induced EAE using mice deficient in LT $\alpha$  or its membrane receptor, LT $\beta$ R. LT $\alpha$  knockout mice used here were designed to avoid the artifact involving TNF gene downregulation in myeloid cells, which occurred in the conventional LT $\alpha$  knockout mice. Surprisingly, LT $\alpha$ -deficient mice with normal TNF expression developed EAE clinically comparable to wild-type mice. Conversely, genetic inactivation of LT $\beta$ R delayed EAE onset. However, during the later stages of the disease, LT $\beta$ R deletion exacerbated clinical symptoms of EAE.

These findings demonstrate that the involvement of LT $\alpha$  in EAE development is more complex than previously suggested, and that LT $\beta$ R exhibits diverse functions depending on the disease stage, being pathogenic at the early stage and protective at the later stages of EAE.

*Keywords:* cytokines, lymphotoxin, LT $\beta$ R, mouse models, multiple sclerosis, EAE

### Введение

Термин «лимфотоксин» появился примерно в 1968 г. благодаря экспериментам в американских лабораториях G. Granger [6] и B. Waxman [10] в США. В обоих случаях речь шла о цитотоксической активности по отношению к культуре фибробластов, которую высвобождали активированные лимфоциты. После очистки цитотоксического белка из супернатантов лимфобластоидной линии [1] и молекулярного клонирования [7] лимфотоксином стали называть TNF-подобный цитокин (сгоряча, но временно переименованный в TNF $\beta$ ).

Следующая глава в увлекательной истории о лимфотоксинах была написана в 1993-1994 гг. когда, во-первых, были созданы первые мыши с генетическим нокаутом LT $\alpha$  (бывший TNF $\beta$ ), фенотип которых оказался сенсационным — у них отсутствовали лимфатические узлы и Пейеровы бляшки [4], во-вторых, был открыт партнер

LT $\alpha$  — LT $\beta$ , образующий мембранный гетеротримерный комплекс с LT $\alpha$  [2], в-третьих, был охарактеризован новый рецептор, LT $\beta$ R [3], который и передавал сигнал от мембранного лимфотоксина. При этом LT $\alpha$  действительно может существовать и в TNF-подобной конфигурации гомотримера, и сигнализировать через TNFR1. Отметим, что позднее в «классическом» LT $\alpha$ -нокауте был обнаружен «встроенный артефакт», связанный с нарушением экспрессии соседнего гена TNF по меньшей мере в миелоидных клетках из-за неоптимального дизайна таргетирующей генетической конструкции [8].

Функции лимфотоксина были изучены в различных экспериментальных моделях заболеваний, в том числе в экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (EAE), признанной мышшиной модели рассеянного склероза. Ранее в работе [12] сообщалось об устойчивости LT $\alpha$ -, но не LT $\beta$ -дефицитных мышшей к EAE, что указы-

вало на патогенную роль лимфотоксина, предположительно в виде растворимого  $LT\alpha$ . Этот результат как будто подтверждал вывод ранней работы из той же лаборатории [11], в которой использовались блокирующие моноклональные антитела.

В настоящей работе проведенные эксперименты с ЕАЕ на  $LT\beta R$ -дефицитных мышях [5] и на  $LT\alpha$ -нокаутах, созданных с помощью Cre-loxP технологии [8], привели к новым результатам и выводам.

## Материалы и методы

### Мыши

В работе использовали мышей на генетической основе C57BL/6с полной инактивацией генов  $LT\alpha$  [8] или  $LT\beta R$  [5]. В качестве контроля использовали мышей дикого типа C57BL/6. В экспериментах были использованы самки и самцы возраста 9-12 недель. Мышей разводили и содержали в стандартных условиях Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Уникальная научная установка «Био-модель» ИБХ РАН; Биоресурсная коллекция «Коллекция лабораторных грызунов SPF статуса для фундаментальных, биомедицинских и фармакологических исследований»), имеющего международную аккредитацию AAALACi. Эксперименты на генетически-модифицированных мышях в модели ЕАЕ были одобрены Биоэтическим комитетом ИМБ РАН (Протокол № 3 от 27.10.2023) и проведены в Автономном экспериментально-биологическом комплексе для временного размещения и исследования генетически модифицированных линий лабораторных мышей категории SPF при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660).

### MOG<sub>35-55</sub>-индуцированный ЕАЕ

Индукцию ЕАЕ осуществляли подкожной иммунизацией 100 мкг MOG<sub>35-55</sub>-пептида (Anaspec, США) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich, США), с добавлением 5 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis* (BD Difco, США) и последующим двукратным введением 200 нг Pertussis toxin (Sigma-Aldrich, США). Оценку клинических симптомов проводили ежедневно по стандартной шкале, где 0 – отсутствие симптомов заболевания; 1 – полная потеря тонуса хвоста; 2 – полное нарушение рефлекса переворачивания; 2,5 – нарушение походки и хромота; 3 – частичный паралич задних конечностей;

3,5 – полный паралич задних конечностей; 4 – частичный паралич передних конечностей; 4,5 – полный паралич передних конечностей; 5 – полная потеря двигательной активности.

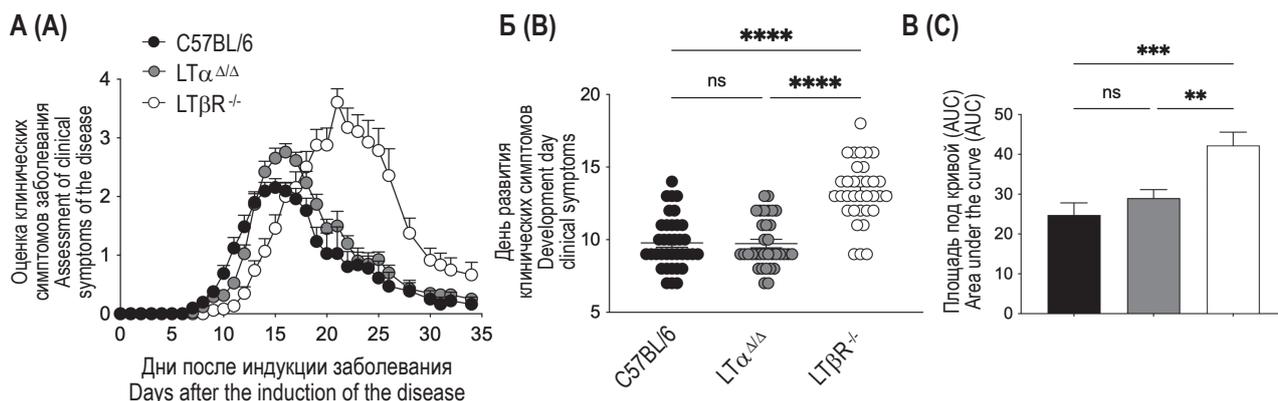
### Статистический анализ

Анализ результатов и статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prism с помощью one-way ANOVA.

## Результаты и обсуждение

Для изучения роли лимфотоксина в развитии ЕАЕ использовали мышей с удалением  $LT\alpha$  или  $LT\beta R$ . Таких мышей подкожно иммунизировали MOG<sub>35-55</sub>-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. Мы обнаружили, что мыши с удалением  $LT\alpha$ , полученные в нашей лаборатории [8], восприимчивы к индукции ЕАЕ (рис. 1А) и развивают заболевание, схожее по динамике с заболеванием мышей дикого типа (рис. 1Б, В). Эти результаты не согласуются с опубликованными данными, в которых мыши с конвенциональным удалением  $LT\alpha$  были практически полностью резистентны к индукции ЕАЕ [12]. Разногласие фенотипов может объясняться тем, что у мышей с конвенциональным удалением  $LT\alpha$  [4] наблюдались дефекты в продукции TNF миелоидными клетками за счет присутствия в генетической конструкции кассеты, ответственной за устойчивость к неомицину [8], которая располагалась на регуляторном участке в предпромоторной области соседнего гена TNF. В действительности  $LT\alpha$ -дефицитные  $LT\alpha^{\Delta/\Delta}$  мыши (с интактной экспрессией TNF) развивают MOG-зависимый ЕАЕ.

Интересно, что у мышей, дефицитных по  $LT\beta R$ , наблюдался фенотип, отличный от  $LT\alpha^{\Delta/\Delta}$  мышей (рис. 1А), хотя у обеих линий мышей была нарушена передача сигнала от мембранного комплекса лимфотоксина через  $LT\beta R$ . Так,  $LT\beta R^{-/-}$  мыши развивали клинические симптомы ЕАЕ на 14-15 дни после иммунизации (рис. 1Б), что может свидетельствовать о патогенной роли сигналов от  $LT\beta R$  на ранних этапах заболевания. В то же время удаление  $LT\beta R$  приводило к усилению тяжести клинических симптомов на поздних стадиях ЕАЕ по сравнению с мышами дикого типа и с мышами с делецией  $LT\alpha$  (рис. 1В). Развитие хронического заболевания при удалении  $LT\beta R$  коррелировало с динамикой симптомов ЕАЕ у мышей, дефицитных по LIGHT, другому лиганду  $LT\beta R$  [9]. Возможно, активация именно сигнального пути LIGHT/ $LT\beta R$  на поздних стадиях забо-



**Рисунок 1. Двойственная роль LTβR в развитии ЕАЕ: патогенная функция на ранней стадии ЕАЕ и защитная функция на поздних стадиях заболевания**

**Примечание.** А – развитие клинических симптомов ЕАЕ у мышей дикого типа (C57BL/6) (n = 36), мышей с удалением LTα (n = 34) или LTβR (n = 34), иммунизированных MOG<sub>35-55</sub>-пептидом в полном адьюванте Фрейнда. Результаты представлены как среднее значение оценки клинических симптомов ± SEM. Б – день развития клинических симптомов ЕАЕ. Каждая точка представляет собой индивидуальное значение ± SEM. В – площадь под кривой (area under the curve, AUC), рассчитанная для (А). ns – недостоверные отличия, \*\* – p < 0,01, \*\*\* – p < 0,001, \*\*\*\* – p < 0,0001 (one-way ANOVA).

Figure 1. Dual role of LTβR in EAE development: pathogenic at EAE onset and protective at the late stage of the disease  
Note. A, EAE disease course in wild-type (C57BL/6) mice (n = 36), mice with LTα (n = 34) or LTβR (n = 34) deletion immunized with MOG<sub>35-55</sub>-peptide in complete Freund's adjuvant. Data are shown as mean ± SEM. B, Day of onset of the disease. Each point represents an individual value ± SEM. C, Area under the curve (AUC) calculated for (A). ns, non-significant differences; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; \*\*\*\*, p < 0.0001 (one-way ANOVA).

леваня защищает мышей от ухудшения клинических симптомов.

## Заключение

В настоящей работе показано, что LTα-дефицитные мыши с интактной экспрессией TNF восприимчивы к индукции MOG<sub>35-55</sub>-зависимого ЕАЕ, что опровергает результаты работы [12]. Вывод другой ранней работы [11] объясняется тем, что использованные антитела TN3.12-19 блокируют только TNF (но не LTα<sub>3</sub>) мыши.

LTβR может выполнять различные функции в зависимости от стадии ЕАЕ – патогенную на ранних этапах и протективную на поздних эта-

пах ЕАЕ. Протективная функция LTβR может быть результатом взаимодействия с лигандом LIGHT, который необходим на стадии ремиелинизации.

## Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №19-75-30032) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019-2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1067).

Авторы благодарят А.А. Круглова и Д.В. Курпраша за содействие в работе.

## Список литературы / References

1. Aggarwal B.B., Moffat B., Harkins R.N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, 1984, Vol. 259, no. 1, pp. 686-691.
2. Browning J.L., Ngam-ek A., Lawton P., deMarinis J., Tizard R., Chow E.P., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S.F., Ware C.F. Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell*, 1993, Vol. 72, no. 6, pp. 847-856.
3. Crowe P.D., VanArsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 707-710.
4. de Togni P., Goellner J., Ruddle N.H., Streeter P.R., Fick A., Mariathasan S., Smith S.C., Carlson R., Shornick L.P., Strauss-Schoenberger J., Russell J.H., Karr R., Chaplin D.D. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5159, pp. 703-707.

5. Fütterer A., Mink K., Luz A., Kosco-Vilbois M.H., Pfeffer K. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*, 1998, Vol. 9, no. 1, pp. 59-70.
6. Granger G.A., Williams T.W. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: activation and release of a cytotoxic factor. *Nature*, 1968, Vol. 218, no. 5148, pp. 1253-1254.
7. Gray P.W., Aggarwal B.B., Benton C.V., Bringman T.S., Henzel W.J., Jarrett J.A., Leung D.W., Moffat B., Ng P., Svedersky L.P. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*, 1984, Vol. 312, no. 5996, pp. 721-724.
8. Liepinsh D.J., Grivennikov S.I., Klarmann K.D., Lagarkova M.A., Drutskaya M.S., Lockett S.J., Tessarollo L., McAuliffe M., Keller J.R., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Novel lymphotoxin alpha (LTalpha) knockout mice with unperturbed tumor necrosis factor expression: reassessing LTalpha biological functions. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, Vol. 26, no. 11, pp. 4214-4225.
9. Mana P., Linares D., Silva D.G., Fordham S., Scheu S., Pfeffer K., Staykova M., Bertram E.M. LIGHT (TNFSF14/CD258) is a decisive factor for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 1, pp. 154-163.
10. Ruddle N.H., Waksman B.H. Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. 3. Analysis of mechanism. *J. Exp. Med.*, 1968, Vol. 128, no. 6, pp. 1267-1279.
11. Ruddle N.H., Bergman C.M., McGrath K.M., Lingenheld E.G., Grunnet M.L., Padula S.J., Clark R.B. An antibody to lymphotoxin and tumor necrosis factor prevents transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 1990, Vol. 172, no. 4, pp. 1193-1200.
12. Suen W.E., Bergman C.M., Hjelmstrom P., Ruddle N.H. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 8, pp. 1233-1240.

---

**Авторы:**

**Гоголева В.С.** — младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

**Authors:**

**Gogoleva V.S.**, Junior Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Друцкая М.С.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва; доцент, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Недоспасов С.А.** — д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва; руководитель направления «Имунобиология и биомедицина» в Научно-технологическом университете «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

**Drutskaya M.S.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Assistant Professor, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

**Nedospasov S.A.**, PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow; Head, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

---

Поступила 10.07.2023  
Принята к печати 12.07.2023

Received 10.07.2023  
Accepted 12.07.2023