

## ПОИСК ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С РАЗВИТИЕМ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА, МЕТОДАМИ ПРЯМОЙ ГЕНЕТИКИ

© 2018 г. И. В. Астраханцева<sup>1</sup>, Е. А. Василенко<sup>1</sup>, А. А. Бабаев<sup>2</sup>,  
Е. О. Губернаторова<sup>3,4</sup>, Е. А. Горшкова<sup>3,4</sup>, М. С. Друцкая<sup>3,4</sup>, В. Г. Круть<sup>2</sup>,  
В. С. Тарабыкин<sup>2,5</sup>, С. А. Недоспасов<sup>1,3,4\*</sup>

\*E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

<sup>1</sup>Институт биологии и биомедицины, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>НИИ Нейронаук, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

<sup>4</sup>Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

<sup>5</sup>Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский Факультет Шарите, Берлин, Германия

Поступила: 05.09.2018. Принята: 10.09.2018

Большинство известных генов, определяющих предрасположенность к наследственным заболеваниям, несут рецессивные мутации и поэтому фенотипически проявляются в гомозиготном состоянии. Если же мутация сцеплена с X-хромосомой, то тогда она проявляется только у особей мужского пола. Главный источник новой информации о таких мутациях у человека — генетический анализ семей. Альтернативным подходом к поиску мутаций является полногеномный мутагенез в модельных животных, с последующим фенотипическим отбором особей, предрасположенных или устойчивых к выбранному типу патологий. В ходе комплексного проекта по поиску мутаций, внесенных в геном мыши нитрозомочевинной, нами были отобраны несколько линий мышей, устойчивых к летальной токсичности, вызываемой инъекцией липополисахарида и D-галактозамина. В настоящей работе приводится характеристика одной такой новой линии мышей.

**Ключевые слова:** полногеномный мутагенез в мышах, цитокины, фактор некроза опухоли, воспаление, септический шок

DOI: 10.31857/S102872210002378-0

Адрес: 119991, Москва, улица Вавилова, д. 32, Недоспасов Сергей Артурович. Тел.: +74991352311 (раб.).

E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

### Авторы:

**Астраханцева И. В.**, к.б.н., н.с. лаборатории экспериментальной иммунологии, Институт биологии и биомедицины, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

**Василенко Е. А.**, м.н.с. лаборатории экспериментальной иммунологии, Институт биологии и биомедицины, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

**Бабаев А. А.**, к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики развития мозга, НИИ Нейронаук, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

**Губернаторова Е. О.**, м.н.с., лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Горшкова Е. А.**, лаборант-исследователь лаборатории молекулярных механизмов иммунитета, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Друцкая М. С.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; Кафедра иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия;

**Круть В. Г.**, лаборант лаборатории генетики развития мозга, НИИ Нейронаук, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия;

**Тарабыкин В. С.**, д.б.н, профессор, зав. лабораторией генетики развития мозга, НИИ Нейронаук, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия; Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский Факультет Шарите, Берлин, Германия;

**Недоспасов С.А.**, д.б.н., профессор, академик РАН, зав. лабораторией экспериментальной иммунологии, Институт биологии и биомедицины, ФГАОУ ВП «Нижегородский Государственный Университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия; зав. лабораторией молекулярных механизмов иммунитета, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия; зав. кафедрой иммунологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

## ВВЕДЕНИЕ

Методы «прямой» генетики позволяют установить причинно-следственную связь между генами и мутациями в них при различных наследственных заболеваниях. Болезнетворные мутации могут быть доминантными — примером может служить мутация в гене, кодирующем рецептор, которая позволяет ему передавать сигнал в отсутствие лиганда, но наиболее часто — рецессивными [1]. Так, фенотипическое проявление (болезнь) при рецессивной мутации может возникнуть в двух случаях: либо пациент гомозиготен по этой мутации, либо этот пациент мужского пола, а «ген болезни» сцеплен с X-хромосомой. Примерами таких мутантных генов, сцепленных с X-хромосомой и важных для иммунной системы, являются ген *foxP3*, мутация в котором может вызывать развитие синдрома иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (IPEX) [2], либо ген, кодирующий общую гамма цепь рецепторов цитокинов семейства IL-2, мутации в котором могут приводить к тяжелому комбинированному иммунодефициту (ТКИД) [3]. Вероятность гомозиготных мутаций значительно повышается у детей, рожденных от близкородственных родителей, или в результате инцеста.

Мощным ресурсом для выявления генов, связанных с заболеваниями, является полногеномный мутагенез в модельных животных, в первую очередь, в мышах. При таком подходе самцы поколения F0, получившие инъекции мутагена, скрещиваются с самками линейных мышей, а полученные самцы (F1) скрещиваются еще раз с самками линейных либо репортерных мышей. Затем самцы и самки поколения F2 (предположительно несущие мутации в гетерозиготном состоянии) скрещиваются между собой, что позволяет в поколении F3 получить особей с ожидаемыми гомозиготными мутациями. Именно с поколением F3 можно провести фенотипический скрининг на предрасположенность к спонтанному или, наоборот, устойчивость к индуцированному заболеванию.

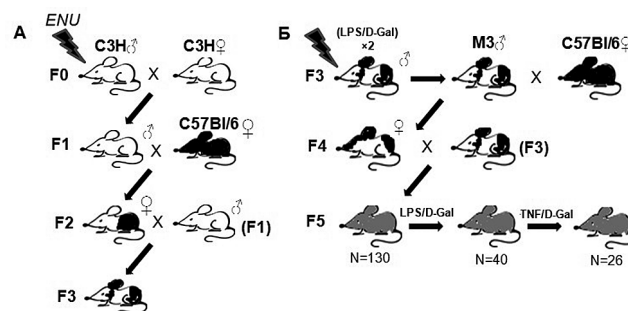
В настоящей работе после анализа 553 особей — потомков примерно 30 фаундеров, нами получено пять независимых мутантных линий (семей), которые обладали устойчивостью к острой летальной гепатотоксичности, вызванной инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС) и D-галактозамина (Д-гал). Классическим молекулярным медиатором в этой экспериментальной мышинной модели септического шока является провоспалительный цитокин — фактор некроза опухоли (TNF). Нами проведено первичное исследование одной такой мутантной линии, показавшее, что экспрессия TNF у этих мышей не нарушена, и, следовательно, затронут какой-то иной компонент сигнального каскада.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Мыши, мутагенез, модели септического шока.

В работе использовали мышей линий C3H и C57Bl/6. Мутагенез животных их разведение и содержание проводили в апатогенных (specific pathogen free) условиях на базе вивария ННГУ им. Н.И. Лобачевского (Нижний Новгород). Фенотипический скрининг проводили на животных возраста 6–7 недель.

Вкратце, самцов линии C3H подвергали действию ENU (N-этил-N-нитризомочевина, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) согласно протоколу описанному ранее [4, 5]. Для получения поколения F1, самцы F0 были скрещены с самками линии C3H. Далее самцы F1, скрещивали с самками линии C57Bl/6 (поколение F2), а затем для выявления рецессивных мутаций проводили возвратное скрещивание самок F2 с родительскими самцами F1. Самцы поколения F3 (n=553) были протестированы дважды с интервалом в 7 дней в тесте



**Рис. 1.** Схема скрещивания.

А — получение третьего поколения мышей после ENU-мутагенеза, для выявления рецессивных мутаций. Б — отбор мышей устойчивых к септическому шоку.

на устойчивость к ЛПС/Д-гал-индуцированной гепатотоксичности [6], при которой погибало около 99% мышей. Один из отобранных таким методом самцов оказался устойчивым к этой модели септического шока и стал основателем линии М3 (рис. 1А).

Для дальнейшего изучения предполагаемой мутации самец М3 поколения F3 был скрещен с самкой C57Bl/6. Далее было проведено возвратное скрещивание самок F4 с самцом М3 поколения F3. Фенотип поколения F5 анализировали в моделях ЛПС/Д-гал-индуцированной гепатотоксичности, а также в другой модели септического шока, индуцированного рекомбинантным TNF и Д-гал (рис. 1Б). В этом случае мышам вводили внутривенно рекомбинантный TNF человека (любезно предоставленный профессором Д. Маннел, Университет Регенсбурга, Германия) и Д-галактозамин (Sigma, кат. № G0500, США), из расчета 100 нг и 800 мкг на грамм веса животного, соответственно.

Для подтверждения наследования изучаемой мутации мыши поколения F5, показавшие аномальный фенотип в модели септического шока, были скрещены с мышами линии C57Bl/6 (с получением поколения F6). Затем с помощью инбредного скрещивания между мышами поколения F6 и возвратного скрещивания мышей F6 с родительскими особями F5 были получены мыши поколения F7 (n=74).

*Получение и активация макрофагов костного мозга in vitro.* Первичную культуру макрофагов костного мозга (bone marrow derived macrophages, BMDM) получали путем дифференцировки клеток *in vitro* из костного мозга мутантных мышей. Для этого клетки культивировали в течение 10 дней в питательной среде по стандартному протоколу [7]. Среда для культивирования BMDM на основе DMEM («Gibco», США) с 2 мМ L-глутамина («HyClone», «Thermo Scientific», США) содержала 20%-ную лошадиную сыворотку («HyClone», «Thermo Scientific») и 30%-ую кондиционную среду от клеток L929 (источник M-CSF). Для измерения концентрации TNF в супернатантах первичные макрофаги костного мозга рассаживали в 96-луночные планшеты из расчета  $5 \times 10^4$  клеток на лунку. Затем добавляли среду DMEM без сыворотки, содержащую ЛПС в концентрации 100 нг/мл или без него, инкубировали в течение 4 часов в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С, потом переносили супернатант в 96-луночный планшет и хранили его при –80°.

*Стимулирование продукции TNF in vivo.* Для определения базового уровня TNF у мышей за сутки до эксперимента была отобрана кровь из щечной венозной пазухи. Через сутки мышам внутривенно вводили ЛПС (Sigma, кат. № L2630, США) в нелетальной дозе: 3мкг/г веса животного. Для анализа количества TNF в сыворотке периферической крови был осуществлен забор крови из щечной венозной пазухи через 4 часа после инъекции ЛПС.

*Иммуноферментный анализ TNF.* Количество продуцируемого TNF в первичной культуре макрофагов костного мозга и в сыворотке мышей в ответ на ЛПС определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора «Mouse TNFalpha ELISA ReadySETGo» («eBioscience», США) по протоколу изготовителя. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism с помощью U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия между группами при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Паттерн устойчивости к септическому шоку у мышей из семейства, несущего мутацию 3, согласуется с гипотезой о гомозиготной рецессивной мутации*

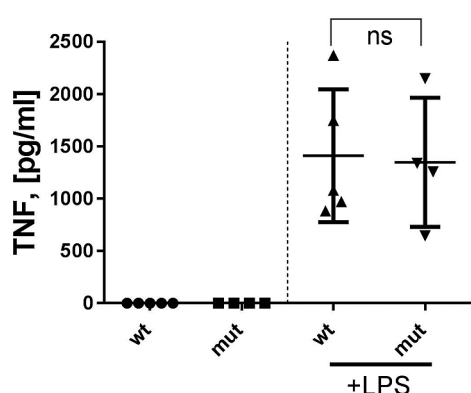
Из 130 мышей поколения F5 30,7% (40/130) выжили при введении им летальной дозы ЛПС/Д-гал. При этом выживаемость не зависела от пола животных: 31,4% (22/70) и 30% (18/60) среди самок и самцов, соответственно. В отличие от большинства тестируемых животных, которые в среднем погибали в интервале 7–10 часов после введения ЛПС/Д-гал, 6,1% (8/130) мышей прожили более 12 часов.

Схожий фенотип также проявлялся в поколении F7, 12,1% (9/74) оказались устойчивыми к летальной дозе ЛПС/Д-гал. Значительное снижение доли ЛПС/Д-гал устойчивых особей объясняется тем, что кроме возвратных скрещиваний с родительской ЛПС/Д-гал устойчивой особью, проводились также инбредные скрещивания между гетерозиготными сиблингами, при которых ожидаемая частота встречаемости рецессивного признака становится вдвое меньше. Одновременно все протестированные мыши промежуточных поколений (F4 и F6) оказались чувствительными к воздействию ЛПС/Д-гал (20/20), что подтверждает рецессивный харак-

тер мутации. Статистика по семьям, как в F5, так и после еще одного раунда выкращивания (F7), с большой уверенностью подтверждает, что речь идет о единственном генетическом локусе.

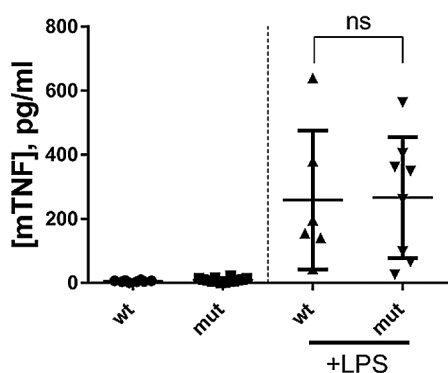
*Макрофаги из мышей семейства мутанта 3 производят нормальное количество TNF в ответ на стимуляцию ЛПС in vitro*

Поскольку TNF является основным медиатором ЛПС/Д-гал-гепатотоксичности [8], а макрофаги – его главным источником в ответ на ЛПС [6], были получены первичные культуры макрофагов костного мозга от мышей мутантной линии и контрольной группы мышей



**Рис. 2.** Продукция TNF *in vitro* макрофагами, полученными из мутантных мышей, не отличается от макрофагальных культур мышей дикого типа.

Концентрация TNF в пг/мл в первичных культурах макрофагов костного мозга мышей дикого типа (wt, n = 5) и мышей мутантной линии (mut, n = 4) до стимуляции ЛПС и через 4 часа после добавления 100 нг/мл ЛПС (+LPS).



**Рис. 3.** Уровень продукции TNF в сыворотке мышей из семейства мутанта 3 не отличается от мышей дикого типа.

Концентрация TNF в пг/мл в сыворотке мышей дикого типа (wt, n = 8) и мышей мутантной линии (mut, n = 8) до введения ЛПС и через 4 часа после введения ЛПС (+LPS; wt, n = 6; mut, n = 8).

дикого типа и проведена сравнительная оценка продукции TNF в ответ на ЛПС в этих культурах. Так, в отсутствии ЛПС в культурах, не активированных макрофагов контрольных и мутантных мышей продукцию TNF в культуральной среде не детектировали, в то время как через 4 часа после добавления ЛПС из расчета 100 нг/мл наблюдали значительное увеличение в продукции TNF как контрольных культурах, так и в мутантных культурах (рис. 2).

Статистически значимой разницы в продукции TNF активированными макрофагами обнаружено не было, что может свидетельствовать об отсутствии дефектов, связанных с активацией TNF и его продукцией макрофагами в ответ на ЛПС у мышей мутантной линии.

*В сыворотке крови мышей из семейства мутанта 3 детектируется высокий, но при этом сравнимый с мышами дикого типа, уровень TNF в ответ на стимуляцию ЛПС in vivo*

При введении ЛПС у мышей из семейства мутанта 3 отмечалось резкое повышение концентрации TNF в сыворотке крови через 4 часа (рис. 3).

Важно отметить, что реакция на ЛПС практически не отличалась у мутантных мышей и мышей «дикого» типа ( $p > 0,05$ ). Этот результат был неожиданным, так как именно TNF является медиатором летальной токсичности в этой модели септического шока [9].

*Мыши, устойчивые к ЛПС/Дгал токсичности, также устойчивы и к TNF/Дгал токсичности*

Несмотря на то, что результаты ИФА свидетельствовали о нормальном уровне продукции TNF у мутантных мышей, нельзя было абсолютно исключить, что мутация затронула ген и белок самого цитокина. Действительно, в проведенном ранее аналогичном исследовании была выявлена доминантно-негативная мутация в гене TNF, делающая белковый продукт этого гена биологически неактивным [6]. Поэтому мутантные мыши из нашего скрининга были проверены на чувствительность к рекомбинантному TNF человека в комбинации с Д-гал. Если бы мутантные мыши продуцировали неактивный TNF, то инъекция рекомбинантного белка вызывала бы каскад реакций, приводящий к летальной токсичности. Однако оказалось, что около 60% мышей устойчивых к ЛПС/Д-гал характеризуются нечувствительностью к воздействию летальной дозы TNF/Д-гал: 60% (24/40) и 66,6% (6/9) поко-



ления F5 и F7, соответственно. Таким образом, мы установили, что полученный нами мутант не имеет дефектов в сигнальных каскадах, предшествующих активации продукции TNF.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей статье мы сообщаем о первых результатах по поиску «иммунологического фенотипа» при полногеномном мутагенезе на мышах, впервые предпринятом в Российской Федерации.

Нами была выбрана модель ЛПС/Д-гал-зависимого летального септического шока, так как она, во-первых, связана с продукцией провоспалительных цитокинов, во-вторых, является быстрой и не очень трудоемкой, и в-третьих, удобно сочеталась с другими скринингами на поведенческие фенотипы, проводимые в ННГУ. В результате, проанализировав всего немногим более 500 мышей поколения F3, нам удалось отобрать 5 семейств мутантов, которые отличались устойчивостью к летальной дозе ЛПС в комбинации с Д-галактозамином.

На основании классических работ Бойтлера и Церрами [10] мы ожидали, что у устойчивых к ЛПС/Дгал мышей будет нарушена продукция TNF, так как именно этот цитокин *невырожденным* образом служит молекулярным медиатором данного вида септического шока. Действительно, перенос моноклональных антител к TNF [11] или введение препаратов на основе растворимой формы рецептора TNF [12, 13] способны полностью защитить мышей от такой летальной токсичности. Неожиданно оказалось, что как *in vitro*, так и *in vivo* ЛПС вызывал нормальную продукцию TNF в устойчивых мышах семейства мутанта 3 (рис. 2, 3).

Ранее в лаборатории Бойтлера [14] в ходе работ по мутагенезу была идентифицирована доминантно-негативная мутация в гене, кодирующем TNF. Такой мутантный TNF был биологически неактивен, и даже в гетерозиготной конфигурации эта мутации могла бы защитить мышей от септического шока. Для того, чтобы ответить на вопрос, не связан ли наблюдаемый фенотип с неактивной формой TNF, нами были поставлены эксперименты с другой моделью септического шока — комбинации рекомбинантного hTNF с Д-галактозамином. Известно, что TNF человека нормально сигнализирует через TNFR1 в мышах, а именно этот рецептор связан с развитием летальной токсичности [15, 16]. Оказалось, что мыши из семейства мутанта 3, которые

устойчивы к ЛПС/Дгал, устойчивы и к TNF/Дгал (рис. 1Б). Таким образом, дефектный ген, структура или регуляция которого затронута мутацией 3, находится в каскаде «ниже» TNFR1. Возможность мутации в самом гене TNFR1 можно исключить на основании Пейровых бляшек, которые нормально развиваются у мутантов семейства 3 (данные не показаны), хотя они отсутствуют у мышей, полностью дефектных по TNFR1 и TNF [17, 18].

В настоящее время, используя широкий арсенал молекулярно-генетических методов, мы пытаемся определить, какой конкретно ген (или его регуляция) может быть затронута мутацией 3. Отметим, что продукт этого гена может представлять собой потенциальную мишень при профилактике или терапии септического шока.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа авторов поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных Исследований № 17–00–00327 и в рамках государственного задания ФАНО России № 01201363822.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Erickson R.P., Mitchison N.A. The low frequency of recessive disease: insights from ENU mutagenesis, severity of disease phenotype, GWAS associations, and demography: an analytical review. *Journal of Applied Genetics* 2014, 55(3), 319–327.
2. Bin Dhuban K., Piccirillo C.A. The immunological and genetic basis of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2015, 15(6), 525–532.
3. Perryman L.E. Molecular Pathology of Severe Combined Immunodeficiency in Mice, Horses, and Dogs. *Veterinary Pathology* 2004, 41(2), 95–100.
4. Russell L.B., Montgomery C.S. Supermutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse spot test: Comparisons with methylnitrosourea and ethylnitrosourethane. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1982, 92(1), 193–204.
5. Hitotsumachi S., Carpenter D.A., Russell W.L. Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985, 82(19), 6619.
6. Efimov G.A., Kruglov A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V., Nedospasov S.A. Cell-type—restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016, 113(11), 3006–3011.
7. Shakhov A.N., Collart M.A., Vassalli P., Nedospasov S.A., Jongeneel C.V. Kappa B-type enhancers are involved in

- lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990, 171(1), 35–47.
8. Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zahringer U., Seydel U., Di Padova F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994, 8(2), 217–225.
  9. Kuhla A., Eipel C., Siebert N., Abshagen K., Menger M. D., Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF $\alpha$ -dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis* 2008, 13(12), 1427–1438.
  10. Beutler B., Milsark I. W., Cerami A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985, 229(4716), 869–871.
  11. Tracey K. J., Fong Y., Hesse D. G., Manogue K. R., Lee A. T., Kuo G. C., Lowry S. F., Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987, 330(6149), 662–664.
  12. Mohler K. M., Torrance D. S., Smith C. A., Goodwin R. G., Stremler K. E., Fung V. P., Madani H., Widmer M. B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993, 151(3), 1548–1561.
  13. Ashkenazi A., Marsters S. A., Capon D. J., Chamow S. M., Figari I. S., Pennica D., Goeddel D. V., Palladino M. A., Smith D. H. Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoconjugate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88(23), 10535–10539.
  14. Rutschmann S., Hoebe K., Zalevsky J., Du X., Mann N., Dahiyat B. I., Steed P., Beutler B. PanR1, a dominant negative missense allele of the gene encoding TNF-alpha (Tnf), does not impair lymphoid development. *J Immunol* 2006, 176(12), 7525–7532.
  15. Pfeffer K., Matsuyama T., Kundig T. M., Wakeham A., Kishihara K., Shahinian A., Wiegmann K., Ohashi P. S., Kronke M., Mak T. W. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993, 73(3), 457–467.
  16. Rothe J., Lesslauer W., Lotscher H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., Bluethmann H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993, 364(6440), 798–802.
  17. Neumann B., Luz A., Pfeffer K., Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1996, 184(1), 259–264.
  18. Kuprash D. V., Tumanov A., Liepinsh D. J., Koroleva E. P., Drutskaya M. S., Kruglov A. A., Shakhov A. N., Southon E., Murphy W. J., Tessarollo L., Grivennikov S. I., Nedospasov S. A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *European Journal of Immunology* 2005, 35(5), 1592–1600.

## IN SEARCH FOR THE GENES ASSOCIATED WITH SEPTIC SHOCK USING DIRECT GENETIC APPROACH

© 2018 I. V. Astrakhantseva<sup>1</sup>, E. A. Vasilenko<sup>1</sup>, A. A. Babaev<sup>2</sup>,  
E. O. Gubernatorova<sup>3,4</sup>, E. A. Gorshkova<sup>3,4</sup>, M. S. Drutskaya<sup>3,4</sup>, V. G. Krut<sup>2</sup>,  
V. S. Tarabykin<sup>2,5</sup>, S. A. Nedospasov<sup>1,3,4,\*</sup>

\*E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

<sup>1</sup>Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

<sup>3</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

<sup>5</sup>Institute of Cell and Neurobiology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Germany

**Received:** 05.09.2018. **Accepted:** 10.09.2018

Most of the known genes linked to hereditary diseases carry recessive mutations and, therefore, pathological phenotype requires for a mutation to be present in homozygous state. If the mutation is linked to the X chromosome, then only the males are affected. The main source of new information about such mutations in humans is the genetic analysis of the families. An alternative approach to search for mutated genes is full genome mutagenesis with subsequent phenotypic selection of the animals with susceptibility or resistance to the chosen type of experimentally induced pathology. Following mutagenesis by N-ethyl-N-nitrosourea, we selected several strains of mice resistant to lethal toxicity caused by lipopolysaccharide and D-galactosamine. The characterization of one such new mouse strain is provided in this work.

**Key words:** full genomic mutagenesis in mice, cytokines, tumor necrosis factor, inflammation, septic shock

**Authors:**

**Astrakhantseva I. V.**, PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunology, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

**Vasilenko E. A.**, Junior Researcher, Laboratory of Experimental Immunology, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

**Babaev A. A.**, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Brain Development Genetics, Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

**Gubernatorova E. O.**, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Gorshkova E. A.**, Laboratory Assistant-researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Drutskaya M. S.**, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

**Krut V. G.**, Laboratory Worker, Laboratory of Brain Development Genetics, Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia;

**Tarabykin V. S.**, PhD, MD, Professor, Head of Laboratory of Brain Development Genetics, Institute of Neuroscience, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia; Institute of Cell and Neurobiology, Charité -Universitätsmedizin Berlin, Germany;

**Nedospasov S. A.**, ✉ MD, Professor, Academician, Head of the Laboratory of Experimental Immunology, Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russia; Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; Head of the Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

119991, Russia, Moscow, ul. Vavilova, 32. Phone: +74991352311 (off.). **E-mail:** sergei.nedospasov@gmail.com.