

МОДЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ С ИНДУЦИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *POLG*

М. В. Кубекина¹✉, А. А. Калинина², Д. С. Коршунова¹, А. В. Брутер¹, Ю. Ю. Силаева¹

¹ Институт биологии гена, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

Митохондриальные дисфункции ответственны за развитие большого числа патологий различных органов и их систем у животных и человека. Наиболее часто они развиваются вследствие накопления мутаций в митохондриальном геноме. За репликацию и репарацию митохондриального генома отвечает продукт гена *Polg* фермент PolG- α . Целью данной работы было оценить влияние экспрессии мутантного гена *Polg* на развитие митохондриальных нарушений в *in vivo*- и *in vitro*-моделях. Исследование проводили на трансгенных животных и первичных культурах MEF с применением ПЦР-РВ, флуоресцентного окрашивания на проточном цитофлуориметре, тестов на функциональное состояние мышечной системы. Показано, что в эмбриональных фибробластах трансгенных животных с индуцируемой экспрессией мутантной формы гена *Polg*, созданных нами ранее, наблюдаются снижение митохондриального потенциала и увеличение уровня экспрессии маркеров митофагии по сравнению с контрольными эмбриональными фибробластами. Кроме того, в клетках организма этих животных развивается митохондриальная дисфункция, приводящая к снижению показателей выносливости животных и силы хвата, снижению экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов по сравнению с животными дикого типа. Экспрессия мутантной формы гена *Polg* приводит к снижению клеточности тимуса трансгенных животных, однако не меняет его субпопуляционный состав. Таким образом, трансгенные животные с индуцируемой экспрессией мутантной формы *Polg* могут служить релевантной моделью для изучения процесса развития митохондриальной дисфункции и разработки терапевтических подходов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, фермент PolG- α , трансгенные животные, митохондриальный мембранный потенциал, митофагия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-34-90073.

Вклад авторов: М. В. Кубекина — анализ литературы, проведение всех экспериментов, анализ и интерпретация результатов, подбор олигонуклеотидов, написание рукописи; А. А. Калинина, Д. С. Коршунова — проведение экспериментов; А. В. Брутер — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов; Ю. Ю. Силаева — анализ литературы, планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, научное редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № от 5 декабря 2021 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Владиславовна Кубекина
Бескудниковский бульвар, д. 32, корпус 1, г. Москва, 127474, Россия; marykumy@gmail.com

Статья получена: 14.04.2022 **Статья принята к печати:** 28.04.2022 **Опубликована онлайн:** 27.04.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.021

MODELS OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION WITH INDUCIBLE EXPRESSION OF *POLG* PATHOGENIC MUTANT VARIANT

Kubekina MV¹✉, Kalinina AA², Korshunova DS¹, Bruter AV¹, Silaeva YY¹

¹ Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

² Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Mitochondrial dysfunctions, which underlie many systemic diseases in animals and humans, may arise from accumulation of mutations in the mitochondrial genome. PolG-alpha enzyme encoded by *Polg* gene is crucial for replication and repair of the mitochondrial genome. The aim of this study was to assess the possible role of *Polg* mutations in mitochondrial dysfunctions using *in vitro* and *in vivo* animal models. The experiments involved transgenic mice with inducible expression of *Polg* mutant variant; the methods included cell culture, real time PCR assay, fluorescence flow cytometry, and skeletal muscle functional tests. The results indicate that mouse embryonic fibroblasts (MEFs) expressing *Polg* pathogenic mutant variant have decreased mitochondrial membrane potential and increased expression of mitophagy markers compared with control cultures. Transgenic animals with systemic expression of the pathogenic variant develop mitochondrial dysfunction which significantly affects muscular performance. In addition, systemic expression of mutated *Polg* in transgenic animals significantly inhibits expression of TCR subunit α and CD3 coreceptor complex subunits δ and ϵ in total splenocyte populations and significantly affects cellularity of the thymus without altering its CD4/CD8 subpopulation ratio. Thus, inducible expression of mutated *Polg* in transgenic animals provides a relevant model for studying mitochondrial dysfunction and its treatment *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: mitochondrial dysfunction, PolG-alpha enzyme, transgenic animals, genome editing, mitochondrial membrane potential, mitophagy

Funding: the study was supported by Russian Foundation for Basic Research, RFBR Project № 19-34-90073.

Author contribution: Kubekina MV — literature analysis, experimental research, data analysis and interpretation, oligo design, manuscript writing; Kalinina AA, Korshunova DS — experimental research; Bruter AV — literature analysis, research planning, data analysis and interpretation; Silaeva YY — literature analysis, research planning, data analysis and interpretation, scientific editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by Ethical Review board at the Institute of Gene Biology (Protocol of 05 December 2021) and carried out in strict compliance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina V. Kubekina
Beskudnikovsky bulvar, 32, korpus 1, Moscow, 127474, Russia; marykumy@gmail.com

Received: 14.04.2022 **Accepted:** 28.04.2022 **Published online:** 27.04.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.021

Митохондриальные дисфункции представляют собой группу разнообразных заболеваний, в том числе и наследственных, которые могут проявляться в любом возрасте и иметь широкий спектр клинических симптомов, что затрудняет их диагностику [1]. Часто развитие митохондриальных дисфункций обусловлено нарушениями в геноме митохондрий [2]. В ряде случаев мутации митохондриального генома вызваны экспрессией мутантной формы ядерного гена *Polg*, отвечающего за репликацию и репарацию мтДНК [3]. Известно, что мутация D257A гена *Polg* ведет к накоплению случайных мутаций в геноме митохондрий [4]. Митохондриальный геном в целом менее стабилен, чем ядерный, ввиду отсутствия гистонов, своеобразности репарационных механизмов и наличия свободных радикалов кислорода, которые являются побочными продуктами аэробного дыхания [5], поэтому в организме существуют механизмы поддержания гомеостаза митохондрий. Одним из них является митофагия [6] — процесс, направленный на элиминацию дисфункциональных митохондрий и являющийся частным случаем аутофагии [7].

Для исследования процессов развития митохондриальной дисфункции и патологических состояний, обусловленных ею, необходимо создание адекватных моделей. Один из наиболее простых способов моделирования развития митохондриальной дисфункции *in vivo* — создание трансгенных животных с экспрессией мутантной формы гена *Polg*, приводящей к нарушению процессов репарации митохондриального генома и накоплению мутаций. Для изучения развития процессов митохондриальной дисфункции в различных органах и тканях была создана универсальная модель — генетически модифицированные мыши с индуцируемой тканеспецифичной и системной экспрессией мутантного D257A варианта гена *Polg* [8]. Модель чрезвычайно удобна тем, что экспрессия мутантного варианта гена включается только после скрещивания трансгена с активаторной линией животных, что предотвращает спонтанное развитие дефектного фенотипа и передачу митондрий с мутантным геномом в ряду поколений.

Целью данного исследования было оценить возможность использования культуры трансгенных эмбриональных фибробластов мыши (mouse embryonic fibroblasts, MEF) *Polg**Cre-CMV (*Polg**B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J, далее *Polg**Cre-CMV) [https://www.jax.org/strain/006054] в качестве *in vitro* модели развития митохондриальной дисфункции, вызванной накоплением мутаций в митохондриальном геноме вследствие экспрессии мутантной формы гена *Polg*, а также оценить влияние системной экспрессии трансгена на мышечную систему животных и на процессы формирования пула периферических Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Первичные культуры MEF были получены на стадии E13.5 путем скрещивания самок линии *Polg* и самца линии Cre-CMV по протоколу, описанному ранее [9]. Все используемые в эксперименте культуры были прогенотипированы методом ПЦР с помощью праймеров P1 и P2 (STOP-кассета 292 п.н.), P3 и P4 (терминатор 417 п.н.), P5 и P6 (Internal control 324 п.н.), P7 и P8 (CMV 100 п.н.). Последовательности всех праймеров представлены в таблице.

Эмбриональные фибробласты культивировали 5 недель и провели 10 пассажей. Культуральная среда для MEF: DMEM

с глутамином 450 мл (Панэко; Россия), эмбриональная телячья сыворотка 50 мл (BioSera; Франция), пенициллин-стрептомицин, 100-кратный лиофилизированный (Панэко; Россия), аминокислоты, заменимые для MEM, 100-х раствор (Панэко; Россия) 5 мл. Для определения изменений функциональности митохондрий и уровня митофагии в исследуемых культурах MEF в зависимости от времени культивирования последовательно проводили серию измерений митохондриального мембранного потенциала (ММП) методом проточной цитометрии с использованием MitoTracker Orange (Thermo Fisher Scientific; США) и экспрессии маркеров митофагии методом ПЦР-РВ с интервалом в 7 дней. Для измерения ММП отбирали по 100 тыс. клеток каждой культуры, отмывали от среды в PBS (Панэко; Россия), инкубировали с 100 нм MitoTracker Orange (возбуждение/эмиссия — 550/580) при 37 °C в течение 30 мин. Далее клетки отмывали от красителя с помощью центрифугирования при 300 g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в свежем PBS, после чего производили измерение на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter; США). Полученные результаты наносили на гистограммы, а число событий нормировали.

Уровень экспрессии мутантного варианта гена *Polg* в культурах MEF был определен методом ПЦР в реальном времени с использованием qPCRMix-HS (Евроген; Россия) и с помощью праймеров P9 и P10, а также флуоресцентных

Таблица. Последовательности праймеров, используемых в работе

| Код | Последовательность 5→3' |
|-----|------------------------------------|
| P1 | GTTAGATCTGCTGCCACCGT |
| P2 | AGGTGGCAAGTGGTATTCGG |
| P3 | GCGAGTCCATGTCACTCAGG |
| P4 | GTGTTGCCCTTTGGAGCTTG |
| P5 | CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT |
| P6 | GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC |
| P7 | GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC |
| P8 | GTGAAACAGCATTGCTGCTCACTT |
| P9 | CGGCTGACCTAATCCCTTTGG |
| P10 | ATCGAGAAAACGCATCCGGG |
| P11 | FAM-TGTTTCCTTTGACCGAGCCCATATC-BHQ1 |
| P12 | ROX-TGTTTCCTTTGCTCGAGCCCATATC-BHQ2 |
| P13 | GCAGTACAGCCCCAAAATGG |
| P14 | GGTCCTTTTACCAGCAAGCT |
| P15 | CGACCGGCTTTCAAGCA |
| P16 | CACCTTGTAGCGCTCGAT |
| P17 | GTGCTTCTGTGTCTAGAGCGT |
| P18 | GGGCACAAGGAAGTTGTCTTCA |
| P19 | GTGGGACTCAGATGGCTGTC |
| P20 | CGCTCTACACTGGAGCTGTT |
| P21 | AGTGGTTGCTAAGCGACAGG |
| P22 | TGACTTCTCCTCCGTGGTCT |
| P23 | GTGGCGATTTACATGCAGC |
| P24 | TGAGGTCTGACTGACCCTGG |
| P25 | CAGGACATGAGACCGGAAGG |
| P26 | TTCCCTCCAAGACGGCTGTA |
| P27 | CCTCTAGCTGTTGGCACTT |
| P28 | ACTGTCTAGAGGGCACGTC |
| P29 | AGACAAGCTTCACTGCCAA |
| P30 | AGGAGGATTCGGAGTCCATA |

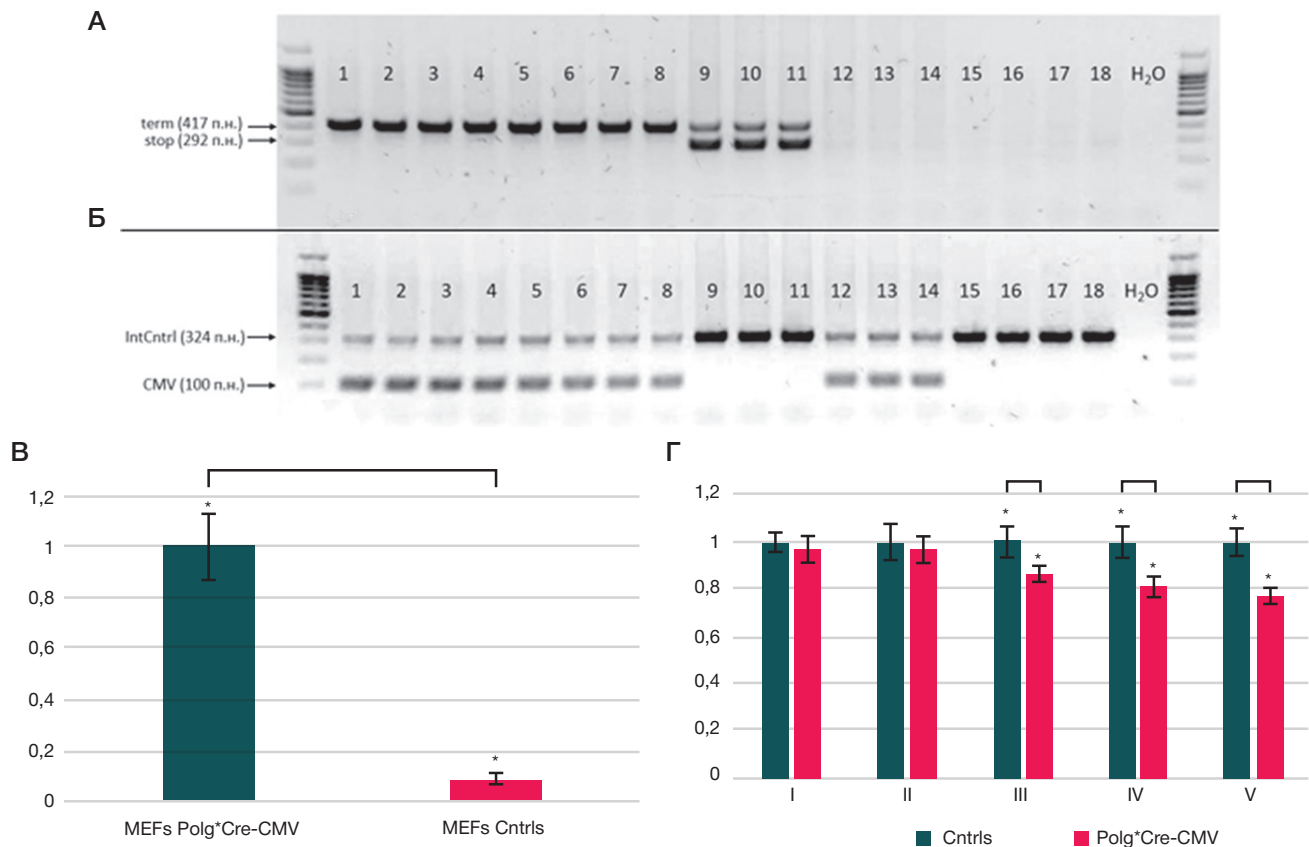


Рис. 1. Результаты генотипирования выбранных для экспериментов культур MEF, а также экспрессии мутантного гена *Polg* и определения ММП. **А.** Генотипирование на STOP-кассету (292 п.н.) и терминатор (417 п.н.). **Б.** Генотипирование на CMV (100 п.н.) и внутренний контроль (324 п.н.). **В.** Экспрессия мутантного гена *Polg* в культурах MEF Polg*Cre-CMV, Polg, CMV-Cre и WT. Измерения всех контрольных культур Polg, CMV-Cre и WT усреднены между собой. Экспрессия мутантного гена *Polg* в культурах Polg*Cre-CMV принята за единицу, относительно нее посчитана экспрессия в контрольных культурах. **Г.** Определение ММП в MEF в течение 5 недель. Измерения всех контрольных культур Polg, CMV-Cre и WT усреднены между собой и приняты за единицу, относительно нее посчитаны значения ММП экспериментальных культур Polg*Cre-CMV. * — различия достоверны

зондов P11 и P12, комплементарных нативному и мутантному вариантам гена соответственно.

В ходе культивирования MEF часть клеток (около 200 тыс.) каждой культуры еженедельно отбирали для выделения РНК реагентом ExtractRNA (Евроген; Россия), проведения реакции обратной транскрипции набором для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген; Россия) и последующего определения экспрессии маркеров митохондрии с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген; Россия). В качестве маркеров митохондрии были выбраны *Map1lc3a*, *Lamp2*, *Pink1*, *Parkin* и *Nix* [10]. Измерение проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров на референсный ген *Hprt* (P13 и P14) и на гены каждого маркера митохондрии: *Map1lc3a* (P15 и P16), *Lamp2* (P17 и P18), *Pink1* (P19 и P20), *Parkin* (P21 и P22) и *Nix* (P23 и P24) (см. табл.). Все манипуляции с клеточными лизатами, РНК и кДНК проводили в соответствии с протоколами фирмы-производителя (Евроген; Россия). Экспрессию генов в каждой отдельной экспериментальной точке сравнивали с экспрессией референсного гена *Hprt*. Величину экспрессии считали по формуле $2^{-\Delta Ct}$, где *Ct* (cycle threshold) — это цикл амплификации, на котором флуоресценция достигает порогового значения; $\Delta Ct = Ct(\text{референсного гена } Hprt) - Ct(\text{исследуемого гена})$. Величину экспрессии каждого гена интереса в контрольных клетках в каждой экспериментальной точке принимали за единицу, далее рассчитывали относительную экспрессию каждого гена интереса во всех образцах культур Polg*Cre-CMV [11].

Далее оценивали влияние экспрессии мутантной формы гена *Polg* на функциональное состояние мышечной

системы животных с системной экспрессией трансгена. В работе использованы гибридные мыши (CBA X C57BL/6) линии Polg*Cre-CMV, полученные нами ранее [8], а также гибридные мыши (CBA X C57BL/6) дикого типа (питомник «Столбовая»), по 5 мышей на группу, возраст — 3 месяца. Вес мышей линии Polg*Cre-CMV в среднем составлял $19,9 \pm 2,2$ г, мышей дикого типа — $22,7 \pm 2,5$ г. В эксперименте участвовали только самки. В процессе экспериментальной работы мышей содержали в виварии ЦКП ИБГ РАН в условиях постоянного доступа к воде и корму. Световой цикл — 12/12, температура воздуха — 23 ± 1 °C, влажность — $42 \pm 5\%$. С животными обеих групп проводили тест «Натянутая проволока» и тесты на силу хвата. Тест «Натянутая проволока» проводили согласно протоколу [12] с модификациями (общее время на 10 попыток было ограничено и составило 300 с). Тест на силу хвата — согласно протоколу [13] с модификациями (вместо перекладки использовали решетку). Все животные были выведены из данных экспериментов методом цервикальной дислокации, их селезенка и тимус были исследованы в следующих экспериментах.

Далее была проведена косвенная оценка функционального состояния периферических Т-лимфоцитов путем измерения уровня экспрессии генов субъединиц ϵ и δ комплекса CD3, локализованного на поверхности лимфоцитов и участвующего в проведении сигнала от Т-клеточного рецептора, и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов мышей Polg*Cre-CMV по сравнению с животными дикого типа. Была также оценена субпопуляция двойных негативных, двойных

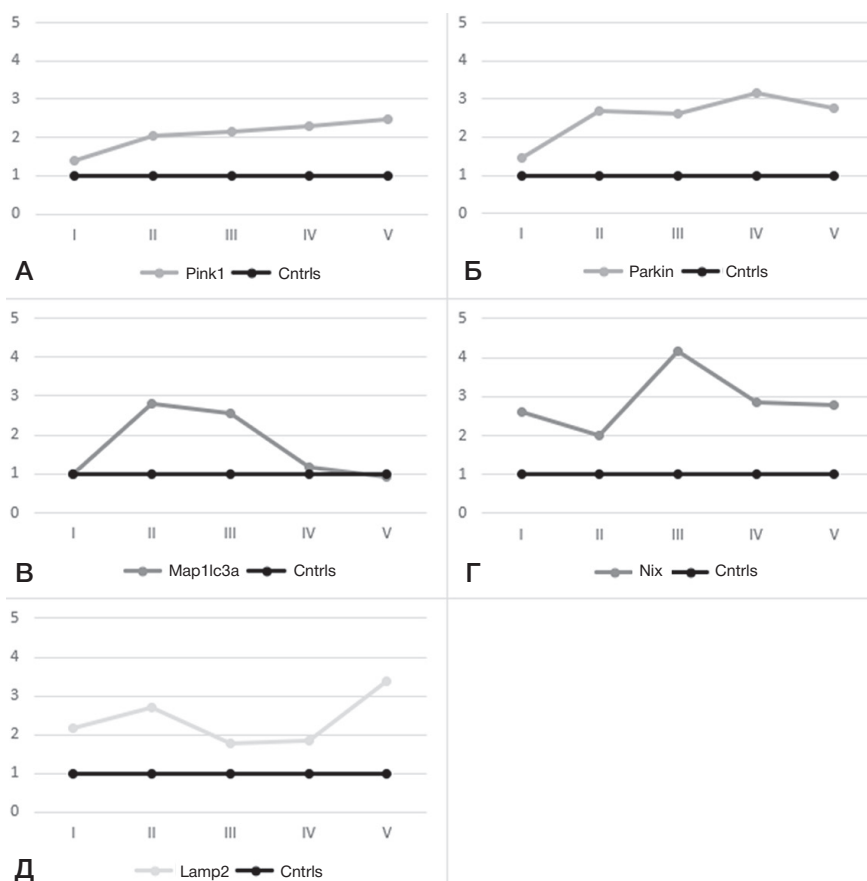


Рис. 2. Экспрессия генов *Pink1* (А), *Parkin* (Б), *Map1lc3a* (В), *Nix* (Г) и *Lamp2* (Д) в течение 5 недель культивирования MEF

позитивных и однопозитивных CD4⁺- и CD8⁺-клеток тимуса и его абсолютная клеточность. Экспериментальных и контрольных мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, ножницами разрезали брюшную стенку. Аккуратно вырезали селезенку и тимус, тщательно гомогенизировали ткани. Клетки селезенки лизировали, затем выделяли РНК, проводили реакцию обратной транскрипции с использованием реактивов и протоколов, описанных выше. Измерение уровня экспрессии генов *Cd3δ*, *Cd3ε* и *Tcr-α* проводили методом ПЦР в реальном времени с помощью праймеров на референсный ген *Hprt* (P13 и P14) и на каждый маркер митофагии: *Cd3δ* (P25 и P26), *Cd3ε* (P27 и P28) и *Tcr-α* (P29 и P30). Относительную экспрессию рассчитывали по методике, приведенной выше. Одиночные клетки тимуса анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии в соответствии с протоколом [14]. Подсчет клеток тимуса осуществляли в камере Горяева.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программных пакетов Excel (Microsoft; США) и Statistica (Statsoft; Россия). Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Значимость полученных результатов оценивали с применением непараметрического однофакторного двухвыборочного анализа. Для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все полученные культуры эмбриональных фибробластов были прогенотипированы (рис. 1А, Б). В двойных

трансгенах *Polg*Cre-CMV* благодаря системной активации Cre-рекомбиназы происходит вырезание кассеты STOP. Благодаря этому двойные трансгены *Polg*Cre-CMV*, помимо контрольного фрагмента, имеют в геноме только терминатор и фрагмент CMV. По результатам генотипирования были сформированы экспериментальная группа культур с генотипом *Polg*Cre-CMV* (восемь вариантов) и контрольная группа, представленная культурами с генотипами *Polg* (три варианта), *Cre-CMV* (три варианта) и дикого типа (четыре варианта) (далее — MEF Cntrls).

Во всех вариантах культур был определен уровень экспрессии мутантного варианта гена *Polg* (рис. 1В). Показано, что мутантный вариант гена *Polg* экспрессируется только в клеточных линиях *Polg*Cre-CMV*. Различия в экспрессии мутантного варианта гена *Polg* между культурами *Polg*Cre-CMV* и контрольными культурами достоверны ($p \leq 0,05$).

Результаты определения ММП в культурах MEF представлены на рис. 1Г. Согласно графику, ММП *Polg*Cre-CMV* достоверно снижается, начиная с 3-й недели культивирования, по сравнению с контрольными клетками ($p \leq 0,05$).

Исследование профилей экспрессии различных маркеров митофагии в контрольных и экспериментальных культурах MEF продемонстрировало значительные различия между ними (рис. 2А–Д).

1. Экспрессия генов *Pink1/Parkin*, хорошо известных маркеров митофагии, постепенно повышается с течением времени (рис. 2А, Б), что коррелирует с предположением о росте количества дисфункциональных митохондрий [15].

2. Накопление случайных мутаций в геноме митохондрий, а вместе с тем нарушение окислительного фосфорилирования

сопровождается гипоксией, которая в свою очередь ведет к повышению экспрессии гена *Nix* [16]. Экспрессия гена *Nix* резко повышается на третьей неделе культивирования, что может соответствовать накоплению продуктов нарушения энергетических процессов (рис. 2В). В процессе митохондриальной дисфункции продукт гена *Map1lc3a* связывается с белком *Nix*, заякоренным во внешней мембране митохондрий, тем самым связывая ее с аутофагосомой. Кроме этого, он тоже выступает инициатором аутофагии [17]. Этим можно объяснить его резкий подъем на второй неделе культивирования и дальнейшую корреляцию с экспрессией гена *Nix* (рис. 2Г). Не вполне понятно, однако, снижение экспрессии маркеров *Nix* и *Map1lc3a* на четвертой и пятой неделях культивирования трансгенных МЕФ. По всей видимости, это связано с невозможностью элиминации значительного процента митохондрий в клетке (несмотря на их дефектность) из-за потери жизнеспособности в этом случае.

3. Белок *Lamp2* является структурным компонентом лизосомной мембраны [18]. Экспрессия гена *Lamp2* в экспериментальных культурах *Polg*Cre-CMV* превосходит его экспрессию в контрольных культурах в 2 раза уже на первой неделе культивирования и остается повышенной на протяжении всех оставшихся недель, что может говорить о повышенном количестве лизосом, необходимых для эффективной аутофагии (рис. 2Д).

Для проверки гипотезы о влиянии развития митохондриальной дисфункции на мышечную систему трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* были проведены эксперименты по определению мышечной выносливости и силы хвата трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* в возрасте 3 месяцев по сравнению с животными дикого типа. Результаты теста «Натянутая проволока» представлены на рис. 3А. Мыши дикого типа удерживались на проволоке в течение всего времени эксперимента и потеряли максимум 4 балла. При этом у мышей линии *Polg*Cre-CMV* происходило снижение времени удерживания на проволоке, мыши выбывали из эксперимента в среднем за 199 с. В эксперименте на силу хвата показано, что мыши линии *Polg*Cre-CMV* демонстрируют худший результат по сравнению с мышами дикого типа (рис. 3Б) и эти различия достоверны ($p \leq 0,05$).

Для определения влияния экспрессии трансгена на жизнедеятельность периферических Т-лимфоцитов был установлен уровень экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора в тотальной популяции спленоцитов трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа. Оказалось, что экспрессия субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора снижены у трансгенов *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа ($p \leq 0,05$) (рис. 4). Цитофлуориметрический анализ живых одиночных клеток тимуса не выявил изменений в относительном количестве субпопуляций двойных негативных, двойных позитивных и однопозитивных CD4⁺- и CD8⁺-клеток тимуса (рис. 5А, Б), однако его абсолютная клеточность оказалась достоверно сниженной у трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* по сравнению с животными дикого типа ($p \leq 0,05$) (рис. 5В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Процесс развития митохондриальной дисфункции вследствие возникновения и накопления мутаций в митохондриальном геноме затрагивает практически

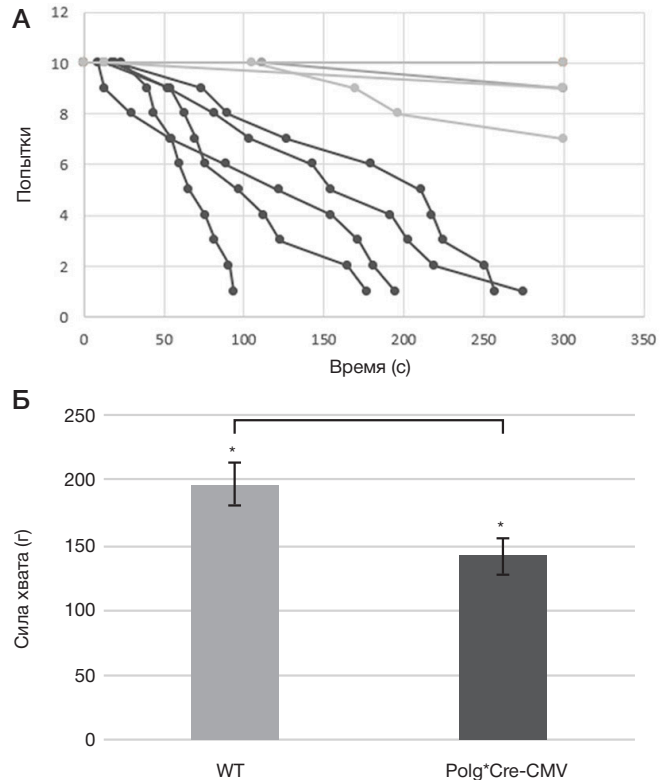


Рис. 3. Результаты тестов на выносливость мышей линии *Polg*Cre-CMV* (обозначены темно-серым цветом) и дикого типа (обозначены светло-серым цветом). **А.** Тест «Натянутая проволока». **Б.** Тест на силу хвата. * — различия достоверны

все ткани и органы. Изменения в тканях, вызванные митохондриальными мутациями, начинают происходить уже во время эмбриогенеза. Мы показали, что в первичной культуре трансгенных эмбриональных фибробластов с генотипом *Polg*Cre-CMV* происходит развитие митохондриальной дисфункции на фоне экспрессии мутантной формы гена *Polg* в течение первых трех недель культивирования *in vitro*. При этом клетки контрольных культур не демонстрируют признаков развития патологии. Таким образом, можно заключить, что культуры МЕФ *Polg*Cre-CMV* представляют собой удобную *in vitro* модель для изучения митохондриальной дисфункции, вызванной накоплением мутаций в митохондриальном геноме вследствие экспрессии мутантной формы гена *Polg*.

Для нормального функционирования тканей и систем органов необходима эффективная работа митохондрий. Это актуально для иммунной системы и в особенности для мышечной [19, 20]. В нашей работе показано, что экспрессия мутантной формы гена *Polg* оказывает крайне негативное влияние на функциональное состояние мышечной системы животных с системной экспрессией трансгена, животные *Polg*Cre-CMV* демонстрируют значительное снижение мышечной выносливости и силы хвата по сравнению с контролем. Кроме того, экспрессия трансгена оказывает негативное влияние и на иммунную систему животных *Polg*Cre-CMV*: снижение уровня экспрессии субъединиц ϵ и δ комплекса CD3 и α -цепи Т-клеточного рецептора косвенно свидетельствует о сниженной функциональности Т-лимфоцитов трансгенных животных. Результаты, полученные при исследовании тимуса трансгенных животных, позволяют сделать вывод об ускоренной инволюции этого органа без нарушения его основных функций. Эти результаты соотносятся с представлениями о влиянии накопления мутаций

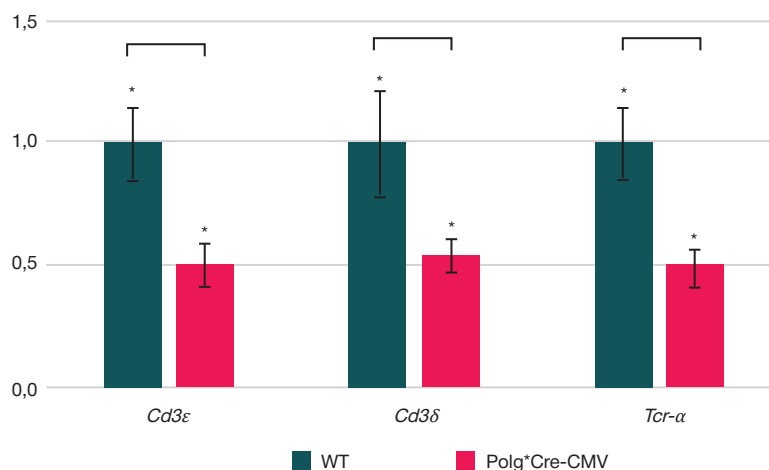


Рис. 4. Снижение экспрессии генов *Cd3ε*, *Cd3δ* и *Tcr-α* в смешанной культуре спленцитов мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с мышами дикого типа. * — различия достоверны

в митохондриальном геноме на развитие ускоренного прогероидного фенотипа [4]. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что трансгенные мыши линии *Polg*Cre-CMV* с экспрессией трансгена тоже являются релевантной моделью для изучения развития митохондриальной дисфункции и ее последствий *in vivo*.

Выводы

Экспрессия мутантного варианта гена *Polg* приводит к увеличению уровня экспрессии маркеров митофагии и снижению уровня митохондриального мембранного потенциала в культуре эмбриональных фибробластов мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с культурой эмбриональных фибробластов контрольных мышей.

Мышечная выносливость при проведении тестов «Натянутая проволока» и «Сила хвата» значительно снижена у мышей *Polg*Cre-CMV* по сравнению с контрольными животными. Экспрессия мутантного варианта гена *Polg* приводит к сниженной функциональности Т-лимфоцитов трансгенных животных линии *Polg*Cre-CMV*, а также к уменьшению клеточности тимуса, однако не влияет на его субпопуляционный состав. Можно заключить, что цель данного исследования достигнута в полном объеме, однако дальнейшая работа по изучению влияния экспрессии мутантного варианта гена *Polg* на другие органы и их системы еще не закончена. Полученные модели *in vitro* и *in vivo* приблизят нас к лучшему пониманию патогенеза митохондриальных дисфункций и позволят разработать подходы к терапии данных патологий, что является предметом дальнейших исследований.

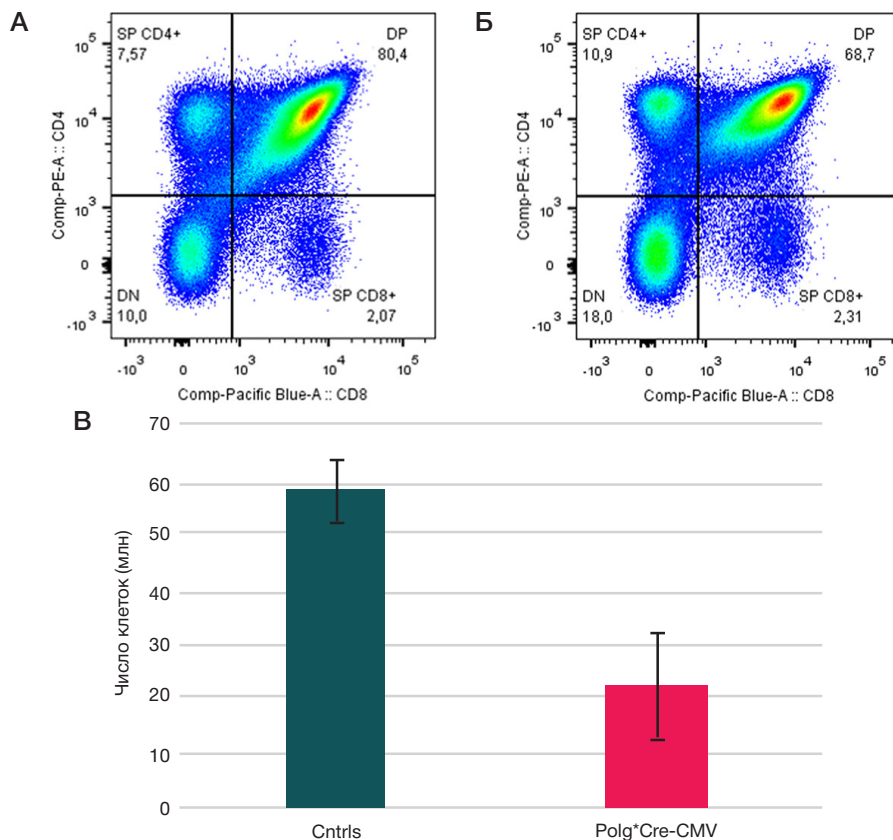


Рис. 5. Профиль экспрессии маркеров CD4 и CD8 живыми одиночными клетками тимуса трансгенных животных *Polg*Cre-CMV* (Б) по сравнению с животными дикого типа (А), а также подсчет клеток тимуса (Б). * — различия достоверны

Литература

- Davis RL, Liang C, Sue CM. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018; 147: 125–41. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5.
- Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017 Jan; 241 (2): 236–50. DOI: 10.1002/path.4809.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27; 429 (6990): 417–23. DOI: 10.1038/nature02517.
- Kukat A, Trifunovic A. Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*. 2009; 44 (1–2): 101–5. DOI: 10.1016/j.exger.2008.05.006.
- McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Jun; 6 (2): 52–61. DOI: 10.1007/s40142-018-0137-x.
- Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (40): 5597–612. DOI: 10.2174/0929867324666170616101741.
- Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016 Aug; 27 (7–8): 381–95. DOI: 10.1007/s00335-016-9651-x.
- Kubekina MV, Silaeva Y Yu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–39. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.72784.
- Tan YS, Lei YL. Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1960: 85–91. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_7.
- Giorgi C, Bouhamida E, Danese A, Previati M, Pinton P, Patergnani S. Relevance of Autophagy and Mitophagy Dynamics and Markers in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Feb 4; 9 (2): 149. DOI: 10.3390/biomedicines9020149.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^{-(delta CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug; 3 (3): 71–85.
- The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/dmd-DMD_M.2.1.004.pdf.
- Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/MDX-DMD_M.2.2.001-42.pdf.
- Калинина А. А., Хромых Л. М., Казанский Д. Б., Дейкин А. В., Силаева Ю. Ю. Адоптивный перенос сингенных спленоцитов подавляет иммунный ответ сублетально облученных мышей. *Acta Naturae*. 2021; 13 (1): 116–26.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (1): 378–83. DOI: 10.1073/pnas.0911187107.
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*. 2007; 27 (17): 6229–42. DOI: 10.1128/MCB.02246-06.
- Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol*. 2020; 219 (11): e202004029. DOI: 10.1083/jcb.202004029.
- Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell*. 2002; 13 (9): 3355–68. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0114.
- López-Lluch G. Essential role of mitochondrial dynamics in muscle physiology. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017; 219 (1): 20–21. DOI: 10.1111/apha.12750.
- Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*. 2015; 42 (3): 406–17. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.

References

- Davis RL, Liang C, Sue CM. Mitochondrial diseases. *Handb Clin Neurol*. 2018; 147: 125–41. doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00010-5.
- Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017 Jan; 241 (2): 236–50. DOI: 10.1002/path.4809.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27; 429 (6990): 417–23. DOI: 10.1038/nature02517.
- Kukat A, Trifunovic A. Somatic mtDNA mutations and aging--facts and fancies. *Exp Gerontol*. 2009; 44 (1–2): 101–5. DOI: 10.1016/j.exger.2008.05.006.
- McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Jun; 6 (2): 52–61. DOI: 10.1007/s40142-018-0137-x.
- Dombi E, Mortiboys H, Poulton J. Modulating Mitophagy in Mitochondrial Disease. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (40): 5597–612. DOI: 10.2174/0929867324666170616101741.
- Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome*. 2016 Aug; 27 (7–8): 381–95. DOI: 10.1007/s00335-016-9651-x.
- Kubekina MV, Silaeva Y Yu, Bruter AV, Korshunova DS, Ilchuk LA, Okulova YD, et al. Transgenic mice Cre-dependently expressing mutant polymerase-gamma: novel test-system for pharmacological study of mitoprotective drugs. *Research Results in Pharmacology*. 2021; 7 (3): 33–39. DOI: 10.3897/rpharmacology.7.72784.
- Tan YS, Lei YL. Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1960: 85–91. DOI: 10.1007/978-1-4939-9167-9_7.
- Giorgi C, Bouhamida E, Danese A, Previati M, Pinton P, Patergnani S. Relevance of Autophagy and Mitophagy Dynamics and Markers in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Feb 4; 9 (2): 149. DOI: 10.3390/biomedicines9020149.
- Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the 2^{-(delta CT)} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 2013 Aug; 3 (3): 71–85.
- The use of hanging wire tests to monitor muscle strength and condition over time: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/dmd-DMD_M.2.1.004.pdf.
- Use of grip strength meter to assess the limb strength of mdx mice: Treat-nmd neuromuscular network. Available from: https://treat-nmd.org/wp-content/uploads/2016/08/MDX-DMD_M.2.2.001-42.pdf.
- Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Dejkin AV, Silaeva Yu Yu. Adoptivnyj perenos singennyx splenocitov podavlyaet immunnyj otvet subletal'no obluchennyx myshej. *Acta Naturae*. 2021; 13 (1): 116–26. Russian.
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (1): 378–83. DOI: 10.1073/pnas.0911187107.
- Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*. 2007; 27 (17): 6229–42. DOI: 10.1128/MCB.02246-06.
- Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE. Mitophagy pathways in

- health and disease. *J Cell Biol.* 2020; 219 (11): e202004029. DOI: 10.1083/jcb.202004029.
18. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmann G, Blanz J, Von Figura K, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 2002; 13 (9): 3355–68. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0114.
 19. López-Lluch G. Essential role of mitochondrial dynamics in muscle physiology. *Acta Physiol (Oxf).* 2017; 219 (1): 20–21. DOI: 10.1111/apha.12750.
 20. Weinberg SE, Sena LA, Chandel NS. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity.* 2015; 42 (3): 406–17. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002.