

Аверина Ольга Александровна

**Изучение физиологической роли нового митохондриального белка
Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в Институте функциональной геномики и НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Научные
руководители**

- **Сергиев Пётр Владимирович**
доктор химических наук, член-корреспондент РАН
- Высоких Михаил Юрьевич**
кандидат биологических наук, доцент

**Официальные
оппоненты**

- **Животовский Борис Давидович**
доктор биологических наук, профессор,
руководитель и профессор лаборатории
исследования механизмов апоптоза факультета
фундаментальной медицины МГУ имени М.В.
Ломоносова.
- **Шахпаронов Михаил Иванович**
доктор химических наук, главный научный
сотрудник лаборатории мембранных
биоэнергетических систем Института
биоорганической химии имени академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.
- **Дейкин Алексей Васильевич**
кандидат биологических наук, директор
Объединенного центра генетических технологий
Белгородского государственного национального
исследовательского университета

Защита диссертации состоится «19» декабря 2023 года в 15 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.014.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: agapkina@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.2/2727>

Автореферат разослан «___» ноября 2023 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук

Агапкина Ю. Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Митохондриальные расстройства – крайне гетерогенная группа наследственных заболеваний, связанных с мутациями в генах, кодируемых митохондриальной (мтДНК) или ядерной (ядДНК) ДНК. В то время как патогенные мутации митохондриальных генов, кодируемых яДНК, затрагивают все митохондриальные процессы, физиологическое проявление мутаций в митохондриальной ДНК ограничено нарушениями дыхания и окислительного фосфорилирования, хотя почти всегда носит тяжелый характер. Данный спектр митопатологий характеризуется высокой вариабельностью и перекрывающимися клиническими проявлениями, что часто крайне затрудняет постановку диагноза. Поскольку многие из этих заболеваний проявляются уже в младенчестве или в раннем детском возрасте и приводят к летальному исходу, остро стоит задача фенотипирования митохондриальных мутаций и выявления механизмов, приводящих к их проявлению на уровне целого организма. Особенно важно описать мутации в генах, кодирующих неизвестные и/или малоизученные митохондриальные белки, для которых еще не была выявлена форма клинического проявления. Тогда, при обнаружении у пациента мутации в этом гене, уже будет известен спектр возможных физиологических изменений, которые можно будет диагностировать на ранних стадиях, что, как известно, часто определяет успешность терапии. Репрезентативным модельным животным объектом исследований генетических митопатологий считаются мыши с направленным изменением генома. Поэтому создание мышей с мутациями в генах, кодирующих новые малоизученные митохондриальные белки, и изучение их физиологической роли в развитии митопатологий является актуальной задачей как фундаментальных, так и прикладных исследований в области биомедицины.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является изучение физиологической роли нового митохондриального белка Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Сравнительный анализ и подбор оптимальных технологий и условий для создания мутантных мышей.
2. Подробное фенотипирование мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*.

Объект исследования

Объектом исследования в настоящей работе является белок Mtlн, кодируемый геном *1500011k16Rik*. Этот белок состоит из 56 аминокислот и локализован в межмембранном пространстве митохондрий, содержит один гидрофобный сегмент, предположительно трансмембранный, расположенный вблизи его N-конца и положительно заряженную C-концевую часть. Mtlн консервативен у позвоночных.

Предмет исследования

Предметом исследования данной работы является роль белка Mtlн в физиологии лабораторной мыши *Mus musculus*.

Степень разработанности темы

Исследуемый в данной работе митохондриальный белок Миторегулин (Mtlн) относится к недавно идентифицированному классу биологически активных молекул, кодируемых небольшими открытыми рамками считывания. В международных публикациях существует консенсус об участии Mtlн в контроле дыхания митохондрий, однако конкретные данные противоречивы. Представлен ряд возможных физиологических ролей Mtlн, а именно: i) участие в ассоциации дыхательных комплексов; ii) взаимодействие с цитохромом b5 редуктазой 3 (CYB5R3), влияющее на состав липидов; iii) активация β -окисления жирных кислот; iv) взаимодействие с АТР-синтазой. Такие фенотипические проявления нокаута по гену, кодирующего Mtlн, как изменение мышечной силы и выносливости, также носят разнонаправленный характер, как и в случае оценки массы тела и накопления жировой ткани. Поэтому в связи с неоднозначными данными по функциям Mtlн, была поставлена цель исследовать на мышинной модели фенотипические, физиологические и биохимические последствия нокаута гена *1500011k16Rik* (Mtlн), кодирующего митохондриальный белок Mtlн.

Научная новизна исследования

В данной работе впервые было показано, что на фоне высокожировой диеты в течение 19-недельного периода у мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*, кодирующего митохондриальный белок Mtlн, наблюдается чрезмерное увеличение массы тела за счет накопления жира. С учетом полученных данных по концентрации сывороточных ацилкарнитинов и жирных кислот, а также о значительном повышении в сыворотке крови уровня триглицеридов, можно судить о влиянии пептида Mtlн на бета-окисление жирных кислот.

Результаты гистопатологического анализа мышц и измерение параметров дыхания мышечных митохондрий подтвердили данные о зависимости нормального функционирования мышц от активности Mtlн.

Проведённые исследования связи уровня митохондриального липида кардиолипина, необходимого для функционирования дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы, с активностью белка *Mtln*, дают возможность предполагать прямое или опосредованное *Cyb5r3* участие *Mtln* в защите кардиолипина от повреждения.

В дополнение предыдущих исследований, указывающих на влияние белка *Mtln* на функционирование почек, в ходе данной работы было продемонстрировано, что снижение экспрессии гена *1500011k16Rik (Mtln)* вызывает возрастные патологические изменения в почках, представляющие угрозу жизни.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Использование животных моделей при анализе последствий мутаций в генах, кодирующих малоизученные митохондриальные белки позволяет получать не только новые фундаментальные знания о физиологической роли таких белков, но и важную информацию о механизмах митохондриальных нарушений у человека.

Хотя всего десять лет назад область генома, кодирующая митохондриальный пептид *Mtln*, рассматривались как некодирующая, сегодня стало понятно, что мутации в этом пептид-кодирующем гене приводят к митохондриальным расстройствам. В связи с этим, в настоящем исследовании был проведен анализ физиологических функций ядерно-кодируемого митохондриального белка *Mtln*.

Представленные в данной работе результаты исследования физиологических последствий инактивации гена *1500011k16Rik (Mtln)* на модели лабораторной мыши позволяют не только охарактеризовать функции нового малоизученного белка, но и предоставляют сценарий возможной клинической картины при мутации гена *LINC00116*, кодирующего данный белок у человека.

Методология диссертационного исследования

В настоящей работе был использован ряд современных методов и подходов, соответствующих мировым стандартам проведения подобного рода исследований. Все манипуляции с животными объектами проводились в соответствии с требованиями регламентирующей документации *FELASA Working Group, 2007* и были утверждены локальной комиссией по биоэтике.

Для решения задачи оптимизации технологии создания мутантных мышей были проанализированы современные технологии редактирования генома на основе *CRISPR/Cas*, а именно - гомологичная рекомбинация с использованием различных вариаций ДНК-матриц и технология праймированного редактирования второго поколения. Также был произведен анализ эффективности редактирования генома при использовании микроинъекции разных

форм генетических редакторов, таких как мРНК Cas9, мРНК Cas9-mSA или белка Cas9. Также в протокол подготовки эмбрионов для микроинъекций генетическими редакторами был введен недавно разработанный подход гормональной стимуляции самок-доноров зигот с использованием антител к ингибину.

В экспериментах с использованием животных были задействованы современные неинвазивные методы исследования, такие как миниатюрный флуоресцентный детектор для прижизненного анализа функциональной активности почек и магнитно-резонансная томография.

При патоморфологическом анализе органов использовались как классические методы (окрашивание срезов гематоксилином и эозином), так и инновационные подходы - такие как окрашивание трихромом по Гомори для выявления миофибрилл с признаками митохондриальных аномалий и метод окрашивания бета-галактозидазоположительных стареющих клеток.

Исследование метаболитов сыворотки крови мышей осуществляли методами биохимического и ЯМР анализа, тандемной масс-спектрометрии со стандартами, содержащими стабильные изотопы или газохроматографии/масс-спектрометрии, а для выделения жирных кислот использовали метод экстракции Фолча (Folch).

В работе было произведено разностороннее исследование выделенных митохондрий, включавшее: полярографический анализ дыхания, исследование липидного состава методом тонкослойной хроматографии, спектрофотометрическое определение активности креатинкиназы, определение соотношения октамер/димер креатинкиназы с использованием электрофореза в целлюлозо-полиацетатном геле. Так же в ходе выполнения задач исследования были задействованы технологии иммуноблоттинга и количественной ПЦР.

Все полученные результаты прошли детальный статистический анализ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Оптимальным выбором технологии целевого редактирования генома мышей является подход eгРНК-направленного расщепления ДНК-мишени Cas9, при последующей гомологичной рекомбинации с использованием матрицы оцДНК.
2. Для получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом необходимо учитывать условия гормональной стимуляции самок-доноров эмбрионов для микроинъекции генетической конструкции, а также характеристики линий мышей самок-доноров эмбрионов и суррогатных матерей.
3. Патологические состояния почечной и мышечной тканей мышей, опосредованные дисфункцией митохондриального белка Mtlн, связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи.
4. Митохондриальный белок Mtlн у мышей влияет на бета-окисление жирных кислот, обеспечивает сохранность пула кардиолипина, необходимого для функционирования первого комплекса дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования подтверждается воспроизводимостью экспериментов и статистической обработкой данных. Все экспериментальные процедуры соответствуют поставленным целям и задачам. Результаты получены на современном научном оборудовании с использованием реактивов, произведенных ведущими российскими и мировыми компаниями.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на заседании ученого совета НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, на заседании кафедры химии природных соединений химического факультета и на заседании ученого совета Института функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора

Личный вклад автора в проведенное исследование заключается в сборе и анализе литературных данных, постановке задач, планировании и проведении основных экспериментальных процедур, анализе и оформлении полученных результатов, в написании научных публикаций по теме диссертации. Во всех работах по теме диссертации, опубликованных в соавторстве [1, 2, 3, 4, 5], основополагающий вклад принадлежит соискателю, а также анализ и статистический обсчет полученных данных, все манипуляции с лабораторными грызунами, в частности создание мутантных линий мышей, проведение поведенческих и физиологических тестов, взвешивание и оценка общего состояния животных, отбор биологических материалов, хирургические процедуры и некропсия были произведены лично Авериной Ольгой Александровной. В том числе в исследовании функционирования мышц мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik* [2], Ольга Александровна проводила оценку работоспособности изолированных мышц при электростимулированном сокращении *ex vivo*, а в исследовании функционирования почек мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik* – оценку клубочковой фильтрации с помощью трансдермального датчика [1]. Так же в данных двух работах [1, 2] Аверина О.А. осуществляла фракционирования митохондрий исследуемых органов, оценку митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, определение активности, количества и степени олигомеризации митохондриальной креатинкиназы, содержание кардиолипина и монолизокардиолипина в изолированных митохондриях. При сравнительном анализе эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей Ольга Александровна проводила все манипуляции с мышинными эмбрионами, описанные в публикации [4].

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 236 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы, список сокращений, библиографический список. Материал иллюстрирован 43 рисунками и 9 таблицами. Список литературы включает 646 процитированных работ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Сравнительный анализ эффективности редакторов генома на модели микроинъекции зигот мышей

Для сравнения эффективности технологии праймированного редактирования второго поколения (PE2) с эффективностью гомологичной рекомбинации (HR), определяемой одноцепочечным ДНК-олигонуклеотидом (оцОНК), была поставлена задача произвести замены оснований в зонах генома chr3:89314728G/A (1), chr3 :89310707T/A (2), chr2:140025881T/C (3), chr2:140044791-3GGT/TAA (4), chr5:66441024-6TGT/GCC (5) в мышинных зиготах (*Рисунок 1.*). Для каждой зоны редактирования был создан набор матриц егРНК и оцОНК для HR (*Рисунок 1.А,В,Д,Е,З.*) и *regRNA* для PE2 (*Рисунок 1.Б,Г,Е,Ж,И.*). Последовательности егРНК и *regРНК* были сконструированы таким образом, чтобы минимизировать расстояние между местами разрывов и предполагаемыми участками мутации, и при этом избежать повторного расщепления ДНК после успешного мутагенеза. Места расщепления и редактирования для зон 1 и 2 были разработаны таким образом, чтобы успешное редактирование приводило к замене одного основания в положении 3 и 2 относительно РАМ (мотив, примыкающий к протоспейсеру). Редактирование зоны 3 приводило к замене в положении 1 относительно РАМ. Зона редактирования 4 расположена непосредственно внутри РАМ, и, таким образом, успешное редактирование предотвратит повторное расщепление генома. Редактирование зоны 5 включает замену 3п.н. в положениях от 4 до 6, относительно РАМ, при HR редактировании, однако, та же зона разрыва не подходит для направленного редактирования PE2, поскольку зона редактирования должна быть расположена ниже относительно места расщепления, генерируемого PE2. Чтобы преодолеть эту проблему, была задействована другая зона расщепления и матрица егРНК, чтобы ввести дополнительную замену в зону РАМ.

В поисках наиболее подходящей матрицы для редактирования генома по пути HR, после расщепления ДНК Cas9, управляемого егРНК, был создан набор матриц для целевой области chr5: 66441024-6TGT/GCC. В дополнение к матрице оцДНК в 200н использовалась дцДНК матрица с тупым концом той же длины и вариантами 3'- или 5'- выступами длиной по 50н для микроинъекций в зиготы мышей вместе с мРНК Cas9 и егРНК.

Для оценки альтернативного варианта доставки Cas9 в клетки кроме соответствующей мРНК, в исследование был добавлен опыт по микроинъекции белка Cas9. С целью увеличения шансов на репарацию по HR-пути относительно NHEJ, был задействован новый метод, основанный на использовании гибрида Cas9 со стрептавидином (Cas9-mSA), который в итоге в формате мРНК, вместе с егРНК и с 5'-биотинилированной одноцепочечной ДНК (bio-оцДНК) инъецировали непосредственно в зиготы.

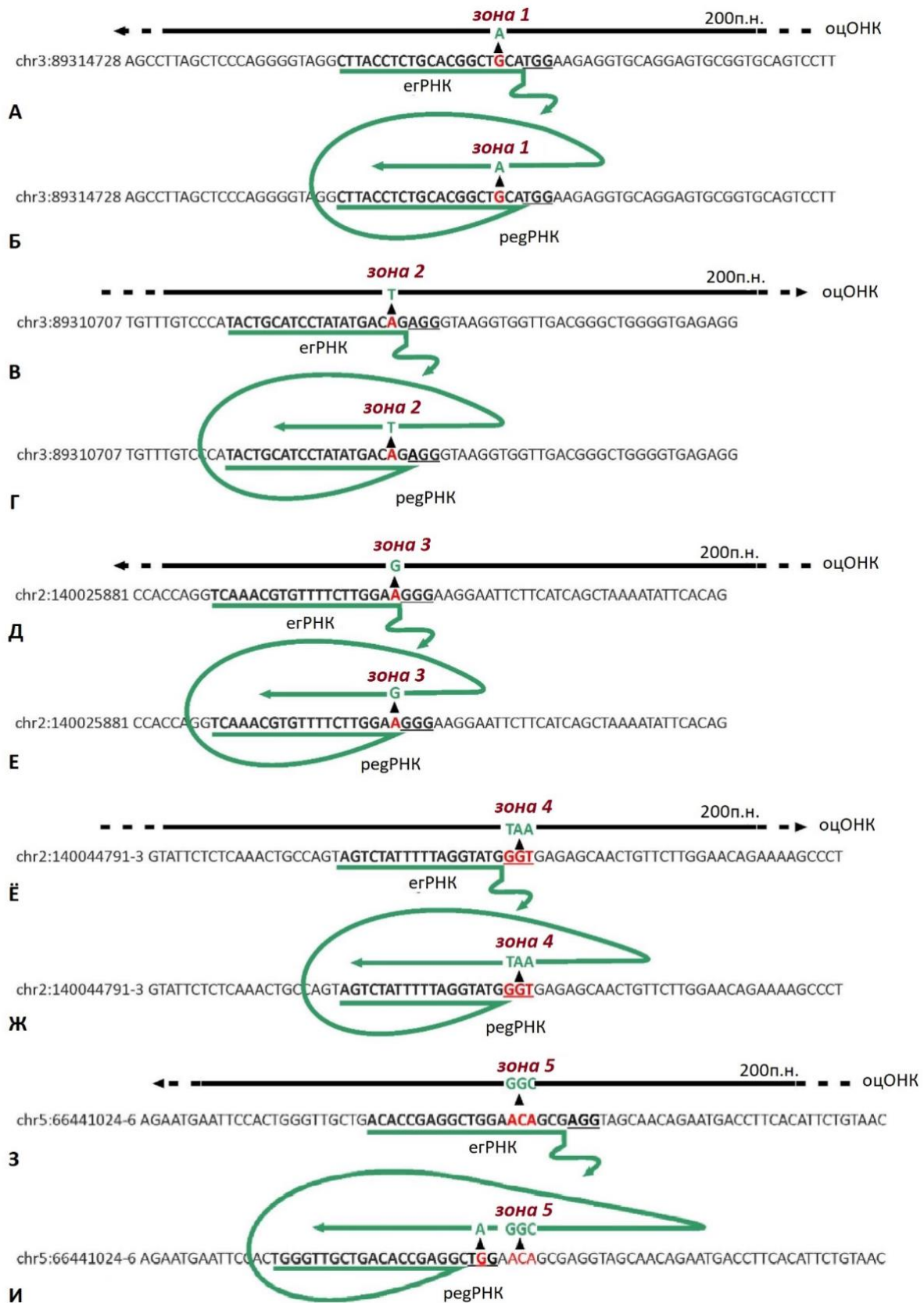


Рисунок 1. Схема erPHK или pegPHK (зеленые стрелки) для целевого (буквенный символ) расщепления и обратной транскрипции, а также матрицы ДНК (черные линии) для HR. Сайты PAM подчеркнуты. Нуклеотиды (буквенные обозначения красного и зеленого шрифта) обозначают соответственно дикий тип и отредактированные последовательности.

А, В, Д, Е, З: схемы редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием erPHK и HR, определяемой оцОНК. Б, Г, Е, Ж, И: схемы редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием pegPHK и обратной транскрипции.

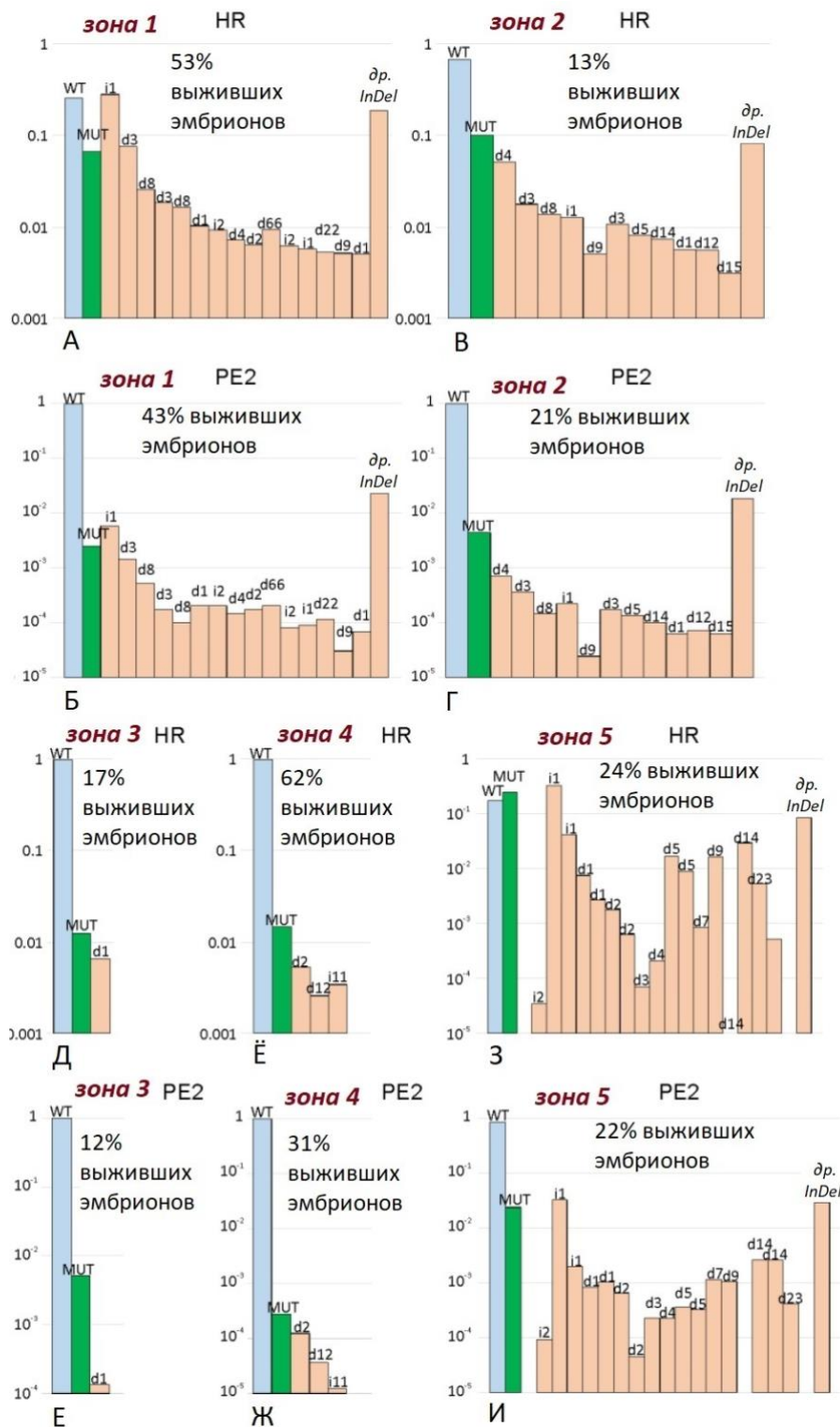


Рисунок 2. Сравнительный анализ эффективности редактирования генома в зонах 1–5 при HR, определяемой оцОНК и с задействованием технологии PE2. На диаграммах показаны частоты аллельных вариантов на логарифмической шкале, обнаруженных в бластоцистах, развившихся из зигот после микроинъекции. Для каждой конструкции над диаграммой указан процент зигот, развившихся до стадии бластоцисты или морулы.

А, В, Д, Е, З: результаты редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием егРНК и HR, определяемой оцОНК. Б, Г, Е, Ж, И: результаты редактирования участков генома в зонах с 1 по 5 с помощью технологии с задействованием регРНК и обратной транскрипции.

синие столбцы – дикий тип; зеленые столбцы – запрограммированные мутации; бежевые столбцы – вставки и делеции; для всех столбцов – аллельные варианты над столбцами.

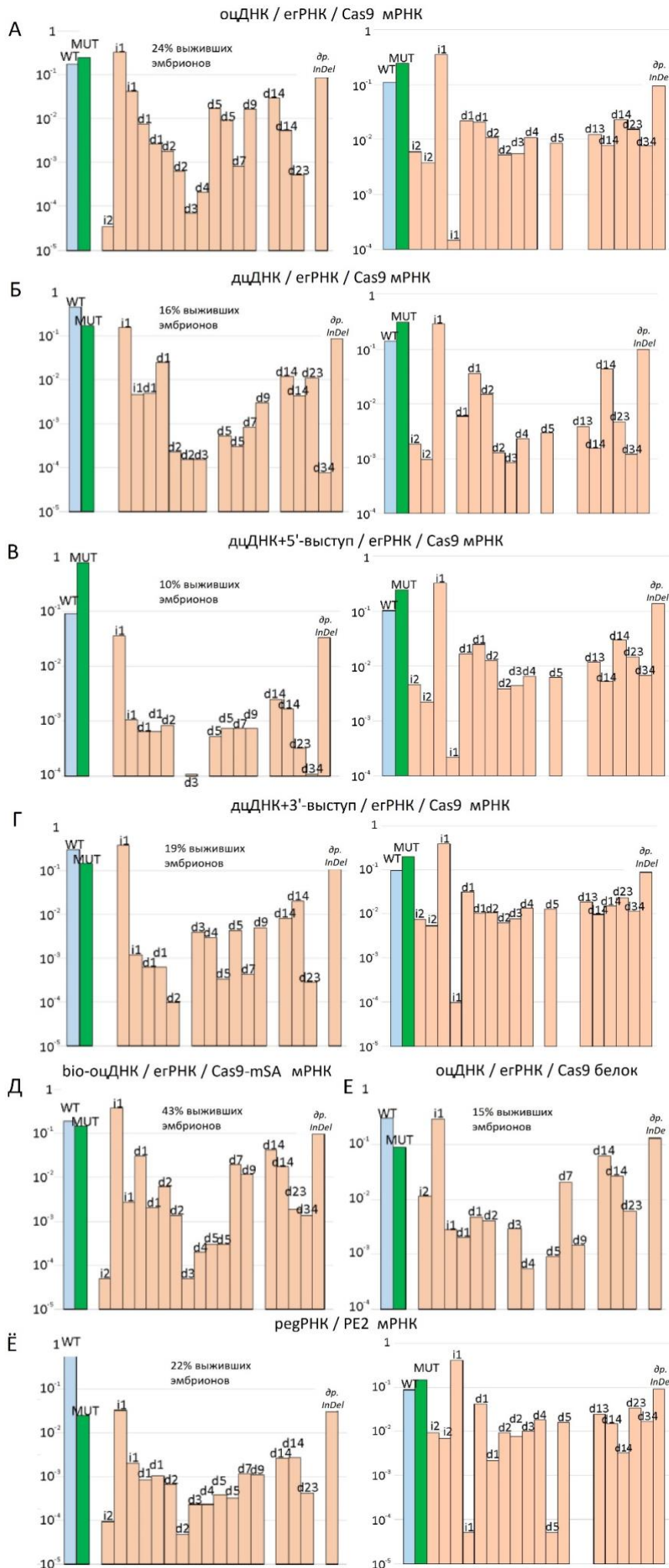


Рисунок 3. Сравнение эффективности редактирования генома по пути HR с использованием различных типов матриц, и альтернативными методами редактирования. На диаграммах показаны частоты аллельных вариантов на логарифмической шкале, обнаруженных в бластоцистах, развившихся из зигот после микроинъекции. Для каждой конструкции над диаграммой указан процент выживших эмбрионов.

Результаты редактирования генома с помощью технологий: *А*: HR с егРНК, оцДНК; Cas9 доставлена мРНК Cas9. *Б*: HR с егРНК, дцДНК; Cas9 доставлена мРНК Cas9. *В*: HR с егРНК, ДНК-матрицей с 5'-выступом; Cas9 доставлена мРНК Cas9. *Г*: HR с егРНК, ДНК-матрицей с 3'-выступом; Cas9 доставлена мРНК Cas9. *Д*: HR с егРНК, 5'-биотинилированной оцДНК; Cas9-mSA доставлена мРНК Cas9-mSA. *Е*: HR с егРНК, оцДНК; Cas9 доставлена белком Cas9. *Е*: редактирование генома путем регРНК-направленного расщепления и обратной транскрипции с помощью PE2. синие столбцы – дикий тип; зеленые столбцы – запрограммированные мутации; бежевые столбцы – вставки и делеции. ; для всех столбцов – аллельные варианты над столбцами

По результатам представленного на рисунках 2 и 3 сравнительного анализа эффективности редакторов генома мышей были сделаны следующие заключения:

- Технологии PE2 или Cas9-mSA не увеличивают частоту реализации целевых мутаций.
- Применение различных матриц для HR, таких как оцДНК, дцДНК или ДНК с 3'- и 5'-выступами, приводит к почти равновероятному возникновению целевой мутации.
- В то время как применение технологии PE2 в некоторых экспериментах повышает точность целевого мутагенеза, эффективность данного метода сопоставима с редактированием генома после расщепления ДНК, управляемого егРНК Cas9, по HR-пути с использованием одноцепочечной, двуцепочечной или с 3'- и 5'-выступами ДНК-матриц.

2. Сравнительный анализ стратегий получения крупных жизнеспособных помётов мышей с изменённым геномом

Для тестирования и внедрения новых подходов в схему получения мутантных мышей, было выделено свыше 10000 зигот из примерно 850 самок, проведены операции по имплантации эмбрионов более чем 300 мышам, у которых родилось около 380 мышат, прошедших процедуру редактирования генома. Были отобраны 34 линии мышей с направленным изменением 16 генов. Первой задачей усовершенствования стратегии создания мутантных мышей стало получение максимально возможного количества зигот от одной самки для микроинъекции генетической конструкции. Для этого анализировали продуктивность самок после классической гормональной стимуляции смесью ГСЖК и ХГЧ или комбинацией данных гормонов на фоне антисыворотки к ингибину. Вторым шагом подбирали линии мышей, самки которых производят зиготы, более устойчивые к проникновению микроинъекционной иглы и более подходящие для пронулеарных введений. На третьем этапе анализировали линии мышей для подсадки эмбрионов, по таким критериям, как хорошие репродуктивные характеристики и успешность проведения хирургических операций.

В итоге проведенных исследований были выдвинуты следующие заключения:

- Гормональная стимуляция с использованием антисыворотки ингибина примерно в 3 раза повышает продуктивность самок – доноров оплодотворенных яйцеклеток.
- В качестве доноров наиболее целесообразно использовать мышей линии FVB, зиготы которых имеют пронуклеусы с четкими границами, а эмбрионы обладают высокой выживаемостью после микроинъекции. У этой линии отсутствует необходимость обратного скрещивания с носителем инбредного генетического бэкграунда.
- Аутбредные самки CD1, выведенные непосредственно для хирургических операций, как и гибриды F1 C57Bl/6 × CBA, эффективны в качестве суррогатных матерей.

3. Исследование на мышинной модели фенотипических, физиологических и биохимических последствий нокаута гена 1500011k16Rik, кодирующего митохондриальный белок Mtlн

Для исследования функций пептида Mtlн была создана линия $\Delta Mtlн$ мышей несущих делецию из 82н., охватывающую промоторную область гена 1500011k16Rik (Mtlн) и начало кодирующей области. Анализ тканей, выделенных из ряда органов полученных $\Delta Mtlн$ мышей, подтвердил отсутствие Mtlн (Рисунок 4.).

мышь $\Delta Mtlн$: ген 1500011k16Rik отмечен желтым, серым показаны делеции нуклеотидов, жирным шрифтом с подчеркиванием – старт-кодон, красным – стоп-кодон:

CCTTTCCCTCGCGCAGACTCAGAGCGGGCCTCAAGCGAGCGCTGTGGCATCTGATCCTTG
CGCCAATCCGTAGCTCACTCTACTTTGTGCTGAGTGGTTGCAATGGCGGACGTGTCTGA
GAGGACGCTGCAGGTGTCCGTGCTAGTGGCTTTCGCCTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGC
AAGCGAATCGGCTGCGGAGGCGTTACCTAGACTGGAGGAAGCGGAGGCTGCAGGACAA
GCTGGCAACGACTCAGAAAAAGCTGGACCTGGCCTGAGCACGCG.

мышь дикого типа (WT): ген 1500011k16Rik отмечен желтым, жирным шрифтом с подчеркиванием — старт-кодон, красным — стоп-кодон:

GGTTGCAATGGCGGACGTGTCTGAGAGGACGCTGCAGGTGTCCGTGCTAGTGGCTTTCG
CCTCTGGAGTGGTCCTGGGCTGGCAAGCGAATCGGCTGCGGAGGCGTTACCTAGACTGG
AGGAAGCGGAGGCTGCAGGACAAGCTGGCAACGACTCAGAAAAAGCTGGACCTGGCC
TGAGCACGCGC.

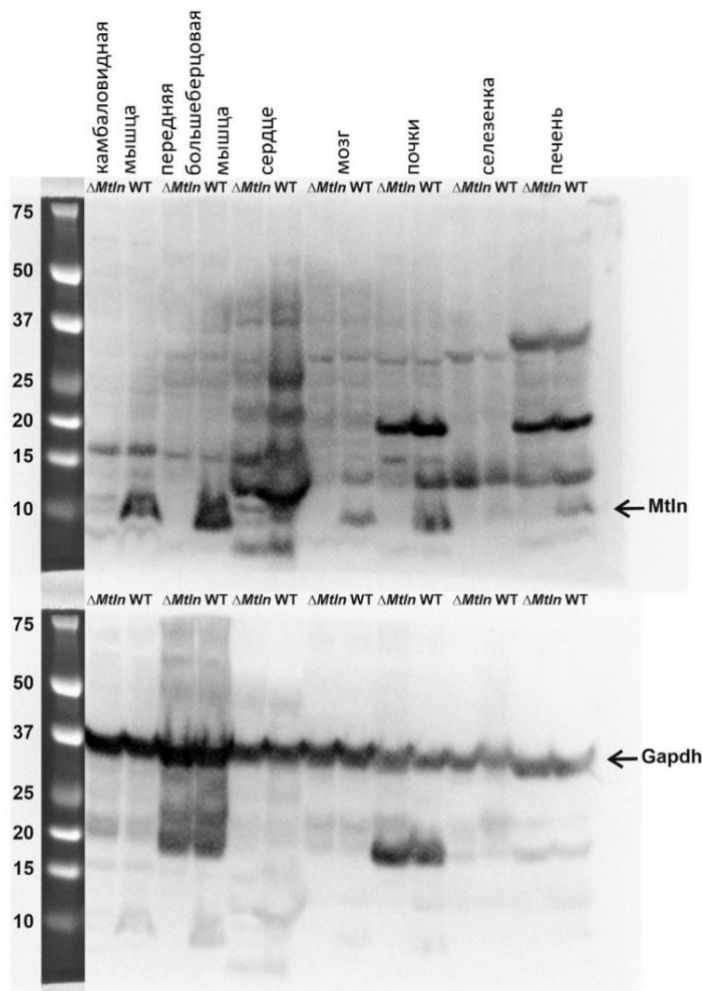


Рисунок 4. Тканевое распределение Mtlн. Органы представлены в порядке: камбаловидная и передняя большеберцовая мышцы, сердце, мозг, почки, селезенка и печень.

- правые дорожки в каждой паре – иммуноблоттинг органов мышей дикого типа (WT).
- левые дорожки в каждой паре – иммуноблоттинг органов нокаутных мышей ($\Delta Mtlн$).
- верхняя панель –anti-Mtlн.
- нижняя панель –anti-GAPDH, после удаления anti-Mtlн.
- стрелками обозначены полосы, соответствующие Mtlн и GAPDH.

Отталкиваясь от информации, что Mtlн взаимодействует с компонентами НАДНА и НАДНВ трифункционального белка, ответственного за окисление жирных кислот, и с Сyb5г3, участвующим в их образовании, а также о роли Mtlн в метаболизме триглицеридов, был произведен анализ мышей, находившихся на высокожировой диете на протяжении 19 недель. Для $\Delta Mtlн$ мышей по сравнению с WT было показано чрезмерное увеличение массы тела (Рисунок 5.А) за счет накопления жира (Рисунок 5.Б), а также повышенный уровень триглицеридов в сыворотке крови (Рисунок 5.Г), что вместе свидетельствует в пользу влияния Mtlн на бета-окисление жирных кислот.

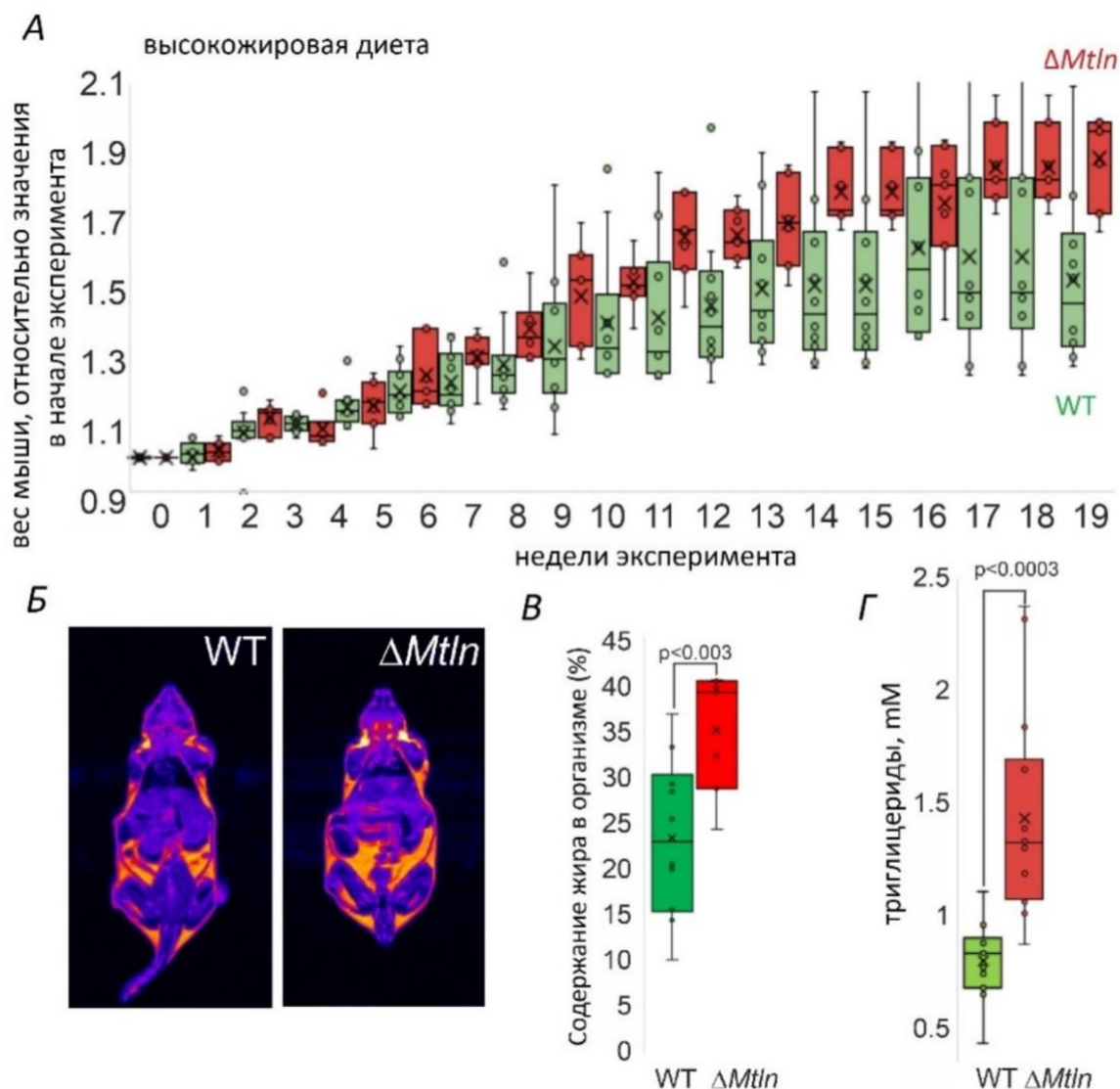


Рисунок 5. Влияние Mtlн на метаболизм мышей.

А: Ежедневная прибавка массы тела самок, содержащихся на высокожировой диете, относительно значений в начале эксперимента. Б: Магнитно-резонансное изображение жировых отложений (ярко-желтый цвет) у самок через 19 недель содержания на высокожировой диете. В: Содержание жира в организме (%) самок, содержащихся 19 недель на высокожировой диете. Г: Уровень (mM) триглицеридов в сыворотке крови самок мышей. зеленые столбцы – дикий тип (WT); красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ($\Delta Mtlн$). Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

Исследуя противоречивые данные о роли белка Mtn в формировании и функционировании мышечной ткани, было произведено тестирование мышечной активности ΔMtn мышей. В результате ΔMtn мыши продемонстрировали снижение силы хвата передних конечностей по сравнению с WT, на фоне 24-часовой пищевой депривации (Рисунок 6.А). В то же время гистологический анализ выявил у ΔMtn мышей незначительную дегенерацию мышц (Рисунок 6.Б), а митохондриальное дыхание (Рисунок 7) и состояние креатинового челнока (Рисунок 8.А;Б) продемонстрировало значительную зависимость от активности Mtn, что может частично объяснить более низкую силу хвата.

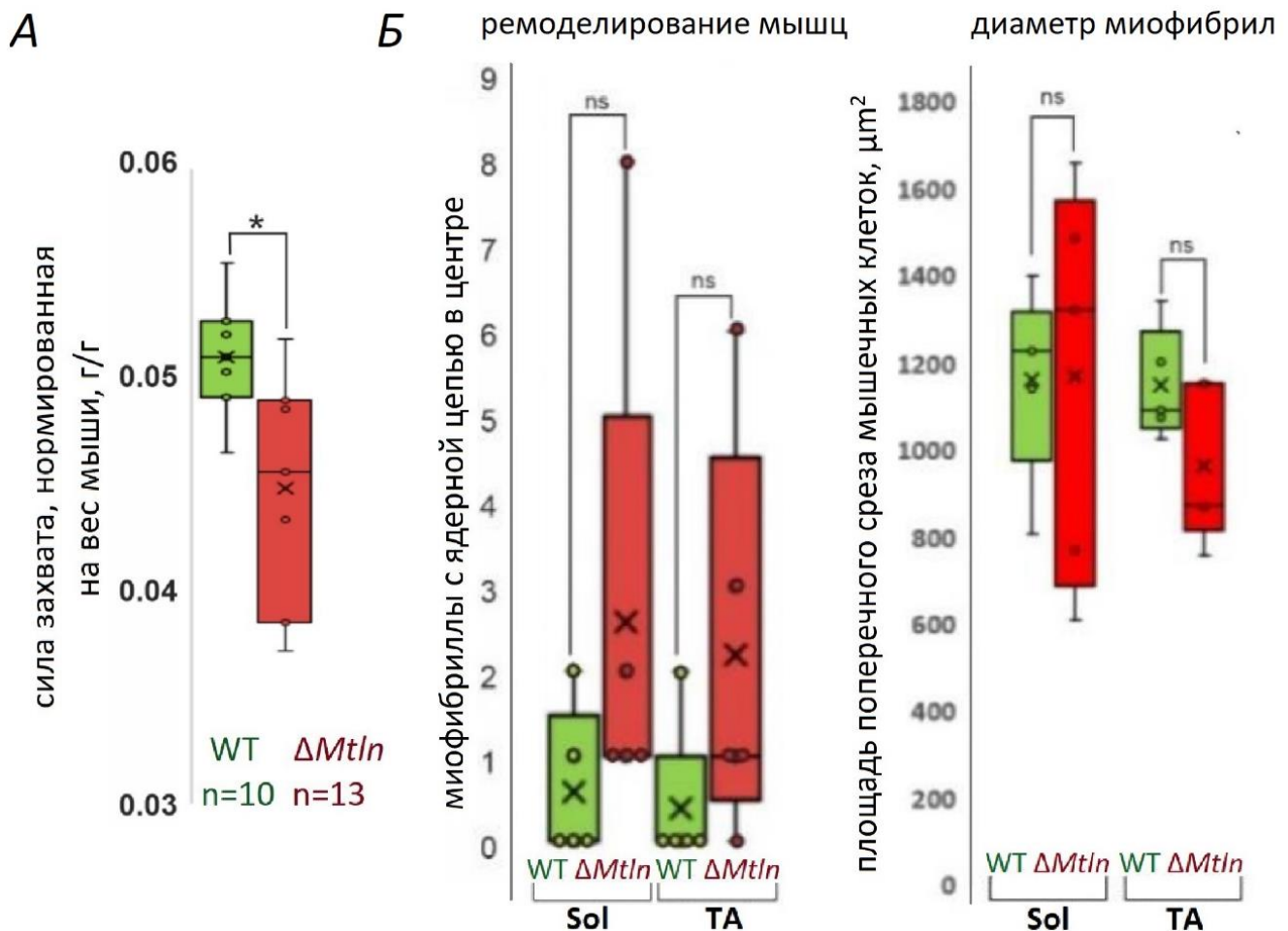


Рисунок 6. Влияние Mtn на мышечную активность мышей и гистопатологический анализ камбаловидной (Sol) и передней большеберцовой (TA) мышц.

А: Максимальная сила захвата передних конечностей, нормированная на вес мыши.

Б: Количественное определение мышечных волокон с ядерной цепью в центре (n = 150 клеток на мышь) – слева, и площади поперечного среза клеток мышц (n=50 клеток на мышь) – справа. зеленые столбцы – дикий тип (WT);

красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* (ΔMtn).

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

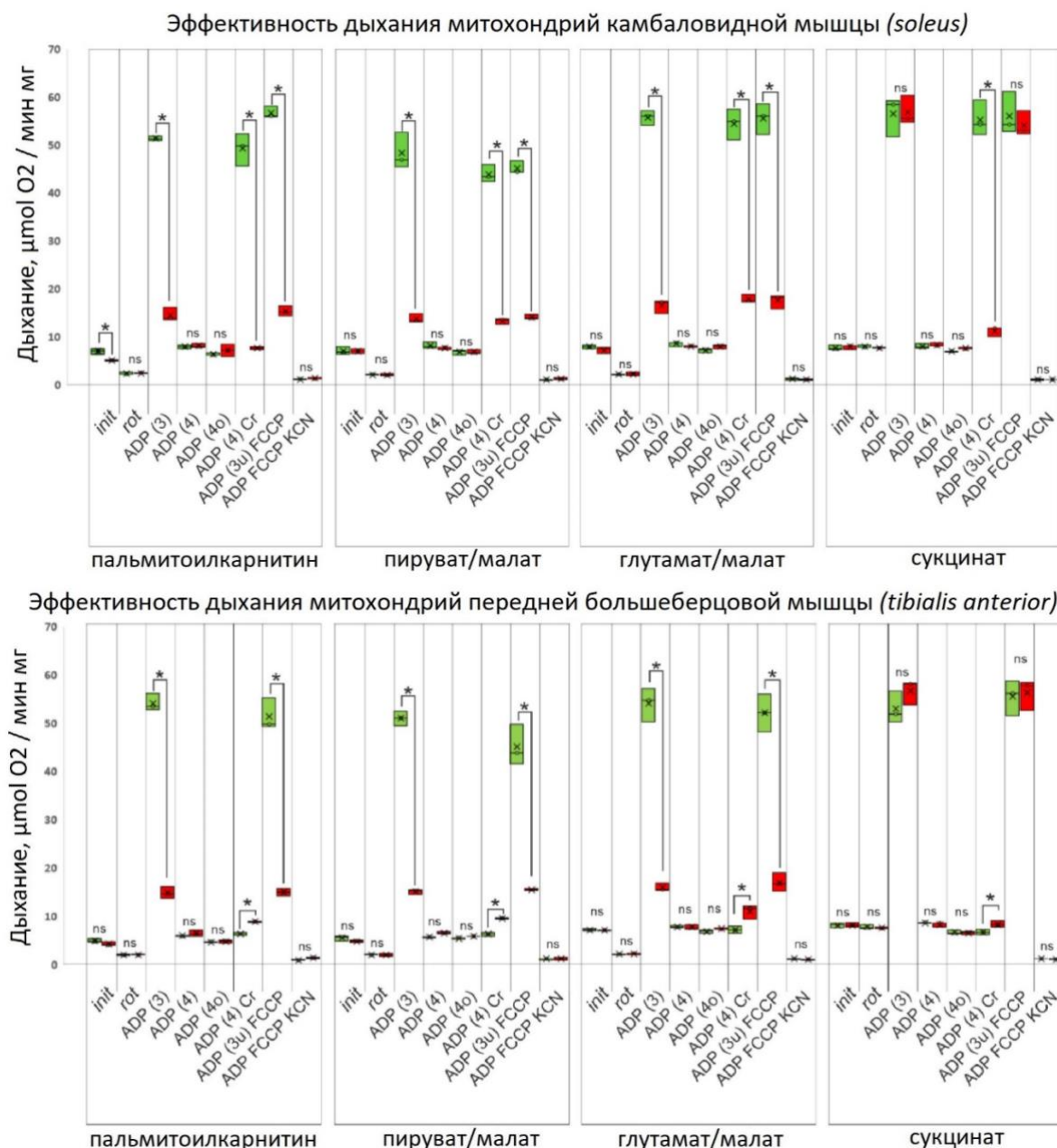


Рисунок 7. Дыхание митохондрий камбаловидной и передней большеберцовой мышц. зеленые столбцы – дикий тип (WT); красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ($\Delta MtlN$); в каждой группе 3 технических повтора от каждой из 3 исследуемых мышей. Группы столбцов соответствуют дыханию на пальмитоил-карнитине (активность CI + CII + ETF), пируват/малате (активность CI), глутамат/малате (активность CI) и сукцинате (активность CII). Измеряемыми экспериментальными точками являются:

отдельно окисляемый субстрат - *init*

init + ротенон (ингибитор комплекса I) - *rot*

init + АДФ (состояние 3) - $ADP_{(3)}$

init после истощения добавленного АДФ (состояние 4) - $ADP_{(4)}$

init + ингибитор АТФ-синтазы, олигомицин (состояние 4o) - $ADP_{(4o)}$,

init + креатин (регенерация АДФ зависит от состояния креатинкиназы) - $ADP_{(4)Cr}$

init + олигомицин + разобщитель FCCP (состояние 3u) - $ADP_{(3u)FCCP}$

init + олигомицин + разобщитель FCCP + цианид (ингибитор комплекса IV) - $ADP FCCP KCN$

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

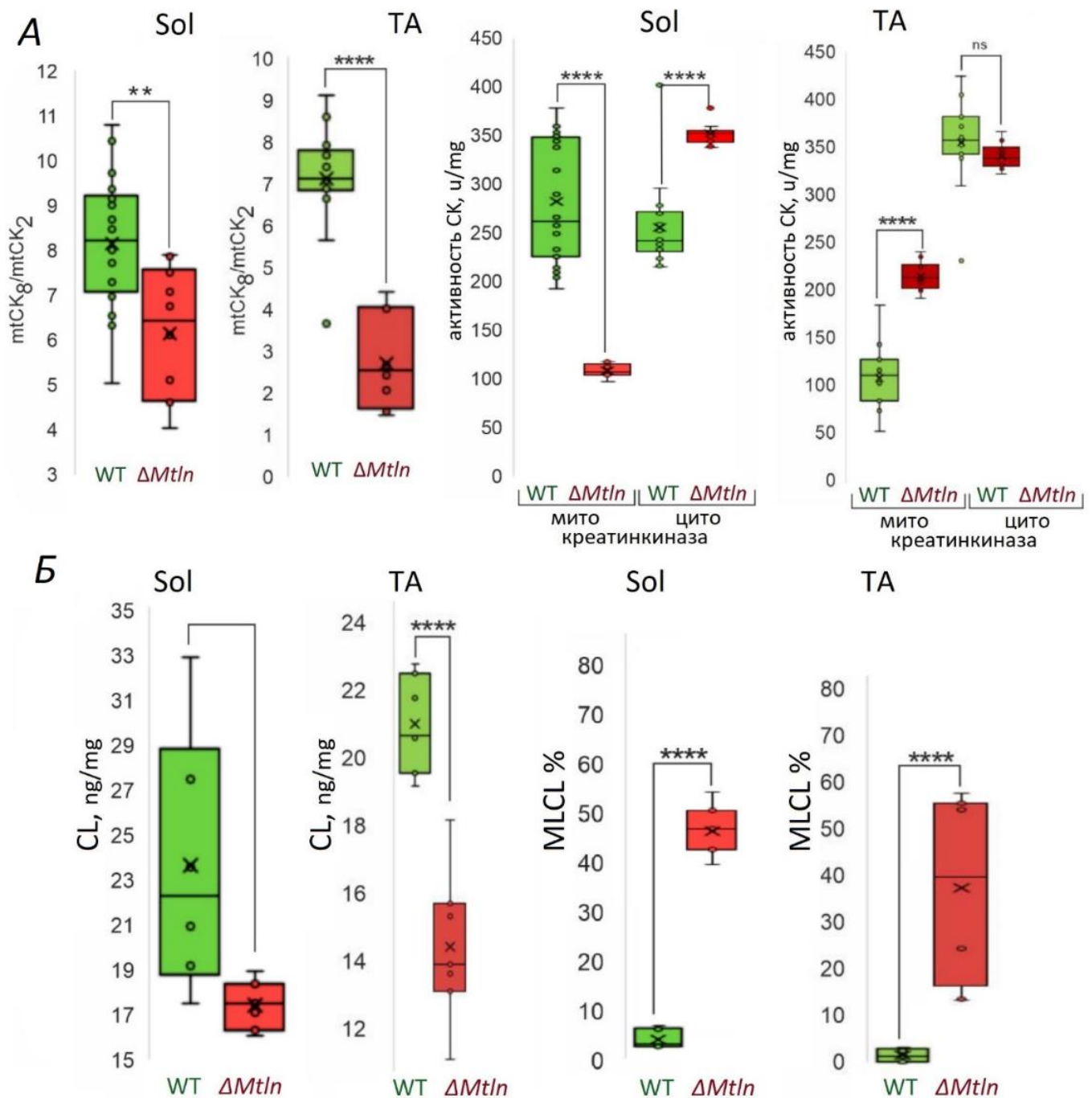


Рисунок 8. Функционирование кардиолипина и креатинкиназы митохондрий камбаловидной (Sol) и передней большеберцовой (ТА) мышц.

А: Отношение содержания октамерной (mtCK₈) и димерной форм (mtCK₂) митохондриальной креатинкиназы; митохондриальная и цитозольная активность СК. **Б:** Определение в митохондриях мышц уровня кардиолипина (CL) и уровня монолизокардиолипина (MLCL) по отношению к общему количеству CL и MLCL (MLCL+CL).

зеленые столбцы – дикий тип (WT); красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* (ΔMtn). Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

Ранее было показано влияние инактивации *Mtln* на увеличение продукции АФК, а также взаимодействие *Mtln* с NADH-зависимой дегидрогеназой *Cyb5r3*, участвующей в метаболизме жирных кислот, в предотвращении окислительного повреждения липидов и усилении функционирования дыхательного комплекса. На основании результатов, представленных на рисунке 8, предполагается, что наблюдаемое снижение концентрации кардиолипина (CL), необходимого для функционирования комплекса I и являющегося мишенью АФК-митохондриального липида, может быть объяснено его чрезмерным окислительным повреждением, вызванным ослаблением защитной функции, зависимой от взаимодействия *Mtln* и *Cyb5r3*. Помимо *Cyb5r3*-опосредованной защиты CL, невозможно исключить непосредственную защиту CL со стороны *Mtln*, которая может быть обусловлена взаимодействием этих молекул, а прямое участие НАДНА-субъединицы трифункционального белка в ремоделировании кардиолипина может представлять еще одну возможную связь между *Mtln* и гомеостазом кардиолипина.

В крови Δ *Mtln* мышей наблюдалось умеренное, хотя и статистически значимое повышение соотношения ацилкарнитинов C3/C0, C3/C2, C8/C10 и уровня сукцинилацетонацилкарнитина, характерное для пропионовой ацидемии, специфической MCAD недостаточности и тирозинемии (II синдром Рихнера-Ханхарта). Анализ уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови Δ *Mtln* мышей выявил заметное снижение насыщенных жирных кислот C16:0, C18:0 и C20:0, сопровождающееся увеличением уровня полиненасыщенной докозагексаеновой (C22:6) жирной кислоты (ДНА), что соответствует изменениям ДНА-содержащих триглицеридов в лишенной *Mtln* клетке. Известно, что насыщенные жирные кислоты мало используются в репарации CL и преимущественно включаются в состав CL во время его биогенеза, в то время как содержание ДНА увеличивается в CL с возрастом и при проблемах с ожирением, что негативно влияет на дыхание митохондрий. Молекулярные механизмы, связывающие функцию *Mtln* в защите CL и β -окислении жирных кислот, и наблюдаемый дисбаланс жирных кислот могут стать предметом дальнейшего изучения.

Помимо комплекса I, CL влияет на олигомеризацию митохондриальной креатинкиназы (mtCK). В соответствии с этим в текущем исследовании показан распад октамера mtCK на димеры, что приводит, в случае оксидативных мышц, к снижению активности mtCK и эффективности креатинового челнока, и является следствием снижения концентрации CL, т.к. известно, что данное явление характерно для мышечной ткани с дефицитом креатинкиназы (Рисунок 8.).

Так как CL является вездесущим митохондриально-специфическим липидом, присутствующим в органеллах всех тканей и достигающим 20% от всех липидов митохондрий,

был проанализирован и второй наиболее потребляющий кислород орган – почки. Полученные результаты по дыханию митохондрий почек, оценки уровней CL и MLCL, функционированию креатинкиназы при инактивации *Mtln* полностью согласуется с представленными выше результатами анализа митохондрий мышц.

Помимо исследования почечных митохондрий, был произведен гистопатологический (Рисунок 9.А;Б) и неинвазивный (*трансдермальный датчик оценки клубочковой фильтрации*) (Рисунок 9.В;Г) анализ почек и биохимический анализ крови (Рисунок 9.Д). Показаны две зависящие от возраста и пола патологии почек, связанные с потерей функции *Mtln*: вакуолярная дегенерация проксимальных каналов почек у старых самцов и замедление клубочковой фильтрации у старых самок. У более молодых мышей эти патологии не проявляются, что вероятно, связано с возрастным накоплением деструктивного эффекта потери *Mtln* на митохондрии и общим снижением энергопродукции, а также доступности свободной энергии в почках. В целом, проявляемые симптомы у Δ *Mtln* мышей, такие как поражение почек, повышенная концентрация лактата и триглицеридов в сыворотке крови на фоне описанного выше увеличения массы тела, могут свидетельствовать о развитии диабета II типа, симптомы которого часто встречаются при митохондриальных патологиях. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы раскрыть молекулярные механизмы патологий почек у Δ *Mtln* мышей.

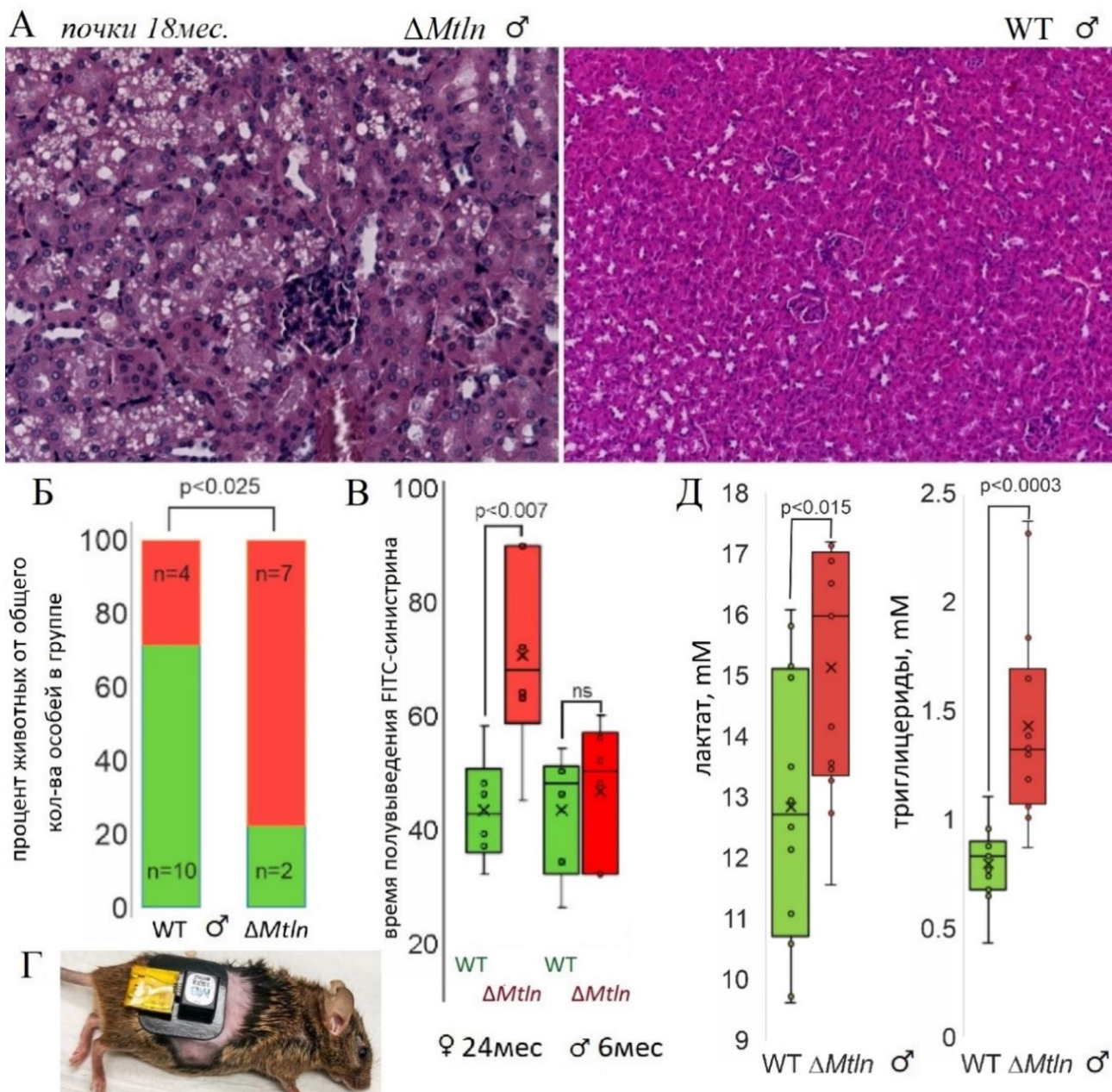


Рисунок 9. Влияние *Mtl n* на функционирование почек мышей.

А: Гистопатологический анализ структуры почек. Окрашивание гематоксилином/эозином образцов почек 18-мес. самцов мышей дикого типа (WT) и нокаутов по гену *1500011k16Rik* ($\Delta Mtl n$), демонстрирующих возрастные патологические признаки. Для образцов $\Delta Mtl n$ показана вакуолярная дегенерация проксимальных канальцев по сравнению с WT. **Б:** Частота проявления дегенерации проксимальных канальцев почек у 12-месячных самцов мышей.

красная зона – процент животных с вакуолярной дегенерации проксимальных канальцев, от общего количества особей в группе; зеленая зона – процент животных без патологии почек, от общего количества особей в группе.

В: Скорость клубочковой фильтрации, представленная в значениях времени полувыведения FITC-синистрина из кровотока. **Д:** Уровень (mM) сывороточных триглицеридов.

зеленые столбцы – дикий тип (WT); красные столбцы – нокауты по гену *1500011k16Rik* ($\Delta Mtl n$).

Г: Прижизненное исследование функциональной активности почек с помощью миниатюрного флуоресцентного детектора, прикрепляемого к очищенной от шерсти коже на спине мыши.

Данные представлены в формате ящиков с разбросами, с отметкой медиан (горизонтальная линия) и средних (крестик). Показан уровень значимости, рассчитанный по критерию Стьюдента.

Несмотря на то, что молекулярные механизмы, связывающие пептид Mtlн с фенотипическими проявлениями нокаута кодирующего его гена, все еще остаются малоизученными, текущее исследование способствует пониманию этого процесса, схематично представленного ниже (Рисунок 10.).

Схема модели функционирования Mtlн

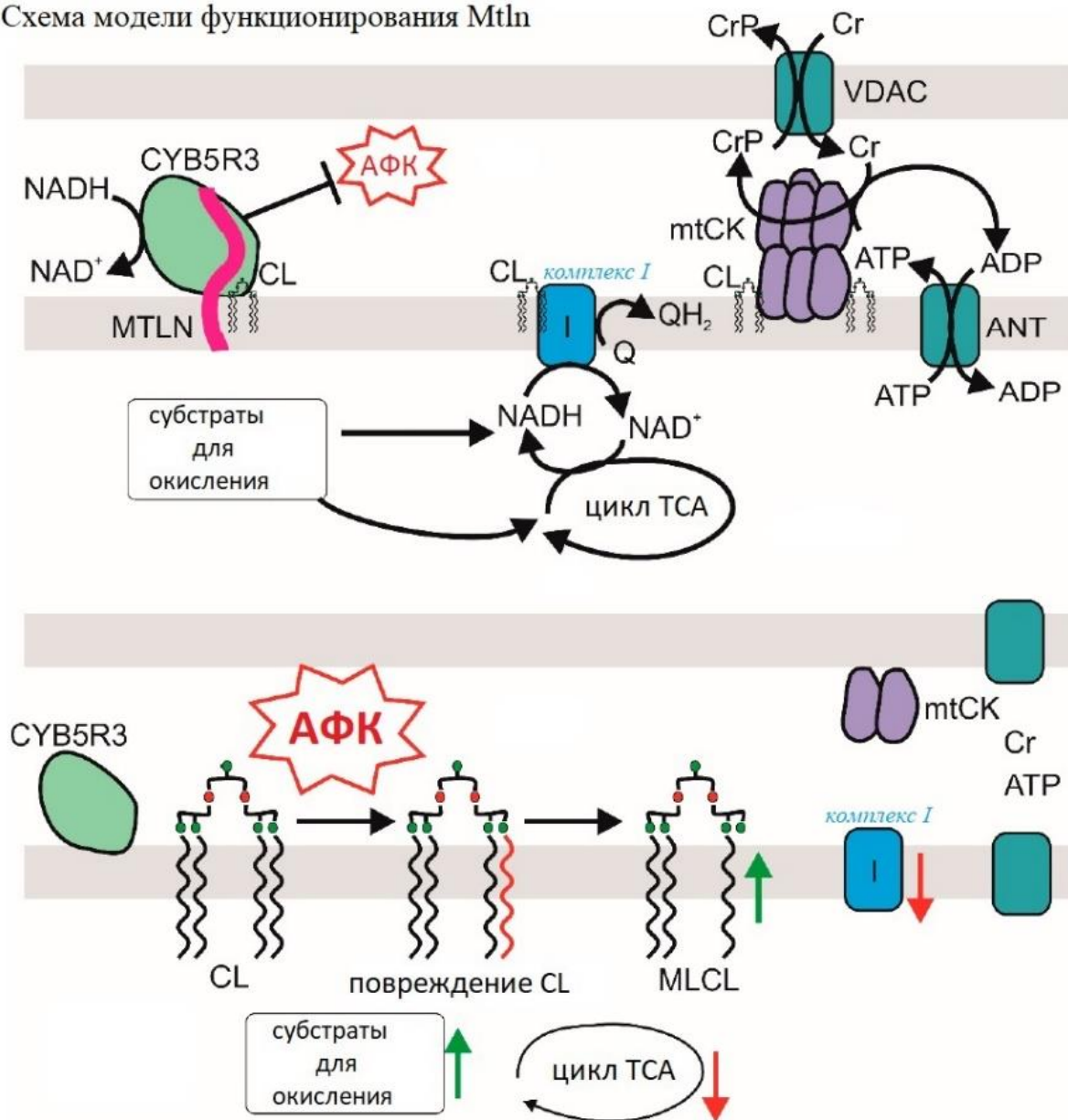


Рисунок 10. Модель функционирования Mtlн как медиатора окисления жирных кислот, активности комплекса I и креатинового челкнока как функции ремоделинга кардиолипина

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе был произведён разносторонний анализ современных подходов оптимизации создания мышей с измененным геномом, необходимых для изучения новых белков, что является актуальной задачей как для фундаментальных, так и прикладных исследований. В частности, в данной работе были дополнены ранее показанные и раскрыты новые аспекты физиологической роли митохондриального белка Миторегулина (Mtlн).

ВЫВОДЫ

1. Технология egРНК-направленного расщепления ДНК-мишени Cas9, при последующей гомологичной рекомбинации с использованием матрицы оцДНК, остается оптимальным выбором для создания мышей с целевым изменением генома.
2. При разработке протокола создания мутантных мышей необходимо учитывать оптимизацию абсолютно каждого этапа для получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом.
3. Опосредованные дисфункцией белка Mtlн патологические состояния мышей связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи.
4. Инактивация Mtlн у мышей приводит к зависящим от возраста и пола патологиям почек, представляющим угрозу жизни.
5. Митохондриальный белок Mtlн влияет на бета-окисление жирных кислот у мышей.
6. Нормальное функционирование мышечной ткани у мышей зависит от активности белка Mtlн.
7. Белок Mtlн обеспечивает сохранность пула кардиолипина, необходимого для функционирования первого комплекса дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2 по специальности 1.5.3. Молекулярная биология (химические науки):

[1] **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Guseva EA, Grigoryeva OO, Lovat ML, Egorova AE, Grinchenko AV, Kumeiko VV, Marey MV, Manskikh VN, Dontsova OA, Vysokikh MY, Sergiev PV. Kidney-Related Function of Mitochondrial Protein Mitoregulin. // International journal of molecular sciences, 2023. Vol. 24, № 10. P. 9106. **IF 5.6** (Web of Science), doi: 10.3390/ijms24109106.

[2] **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Grigoryeva OO, Lovat ML, Egorova AE, Grinchenko AV, Kumeiko VV, Marey MV, Manskikh VN, Dontsova OA, Vysokikh MY, Sergiev PV. Mitoregulin Contributes to Creatine Shuttling and Cardiolipin Protection in Mice Muscle. // International journal of molecular sciences, 2023. Vol. 24, № 8. P. 7589. **IF 5.6** (Web of Science), doi: 10.3390/ijms24087589.

[3] **Averina OA**, Permyakov OA, Emelianova MA, Grigoryeva OO, Gulyaev MV, Pavlova OS, Mariasina SS, Frolova OY, Kurkina MV, Baydakova GV, Zakharova EY, Marey MV, Tsarev DA, Tashlitsky VN, Popov VS, Lovat ML, Polshakov VI, Vysokikh MY, Sergiev PV. Mitochondrial peptide Mtl α contributes to oxidative metabolism in mice. // Biochimie, 2023. Vol. 204. P. 136-139. **IF 3.9** (Web of Science), doi: 10.1016/j.biochi.2022.09.009.

[4] **Averina OA**, Permyakov OA, Grigorieva OO, Starshin AS, Mazur AM, Prokhortchouk EB, Dontsova OA, Sergiev PV. Comparative Analysis of Genome Editors Efficiency on a Model of Mice Zygotes Microinjection. // International journal of molecular sciences, 2021. Vol. 22, № 19. P. 10221. **IF 5.6** (Web of Science), doi: 10.3390/ijms221910221.

[5] **Averina OA**, Vysokikh MY, Permyakov OA, Sergiev PV. Simple Recommendations for Improving Efficiency in Generating Genome-Edited Mice. // Acta Naturae, 2020. Vol. 12, № 1. P. 42-50. **IF 2** (Web of Science), doi: 10.32607/actanaturae.10937.