

## КОНДИЦИОННЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НОКДАУН СОМАТИЧЕСКОГО ЦИТОХРОМА С МЫШИ В ЛИМФОМИЕЛОИДНЫХ КЛЕТКАХ

© 2013 г. Е.С. Шилов\*, И.А. Муфазалов\*, Ю.В. Шебзухов\*, Р.В. Зварцев\*\*,  
М.С. Друцкая\*,\*\*, С.А. Недоспасов\*,\*\*

\*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

\*\*Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Поступила: 16.09.2013. Принята: 30.09.2013

Белок цитохром с является жизненно необходимым компонентом системы окислительного фосфорилирования, при этом он также играет значительную роль в защите от активных форм кислорода, а также служит триггером для образования апоптосомы в ходе внутреннего (митохондриального) пути индукции апоптоза. По причине значимости и незаменимости цитохрома с, у людей не известны генетические нарушения его функций, а полный нокаут гена соматического цитохрома с *CytcS* в мышцах летален. Мы разработали новую генетическую мышиную модель, позволяющую значительно снижать экспрессию соматического цитохрома с *in vivo* в выбранной популяции клеток организма. С помощью этого подхода были получены и первично охарактеризованы две новые линии мышей: с генетическим нокаутом цитохрома с либо в Т-клетках, либо в макрофагах, которые оказались жизнеспособны и фертильны. Снижение экспрессии цитохрома с было опосредовано вырезанием LoxP-фланкированной алели дикого типа гена *CytcS* с помощью тканеспецифической активности рекомбиназы Cre. При этом убиквитарная экспрессия Cre приводила к эмбриональной летальности, так же как и в случае полного нокаута соматического цитохрома с. Суммарная экспрессия цитохрома с в лимфомиелоидных клетках была снижена приблизительно в 10 раз. Эта новая генетическая система позволит изучать гомеостаз клеток иммунной системы *in vivo* при различных физиологических воздействиях.

**Ключевые слова:** цитохром с, генетический нокаут, Cre-рекомбиназа, макрофаги, Т-клетки

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром с представляет собой небольшой гемсодержащий белок, являющийся переносчиком электронов в дыхательной цепи митохондрий. Этот белок был открыт дважды, первый раз в 1886 году под названием «гистогематин» британцем Ч. МакМанном [1], а второй раз в 1925 году под современным названием другим британцем, Д. Кейлиным. Именно Кейлин описал участие цитохрома с в процессе клеточного дыхания [2]. Несмотря на то, что цитохром с является одним из наиболее хорошо изученных клеточных белков, наши знания о нём далеко не полны. В настоящее

время известны три функции, выполняемые цитохромом с — транспорт электронов между комплексом III и комплексом IV дыхательной цепи в ходе окислительного фосфорилирования [3], участие в утилизации активных форм кислорода за счет обеспечения электронами цитохром с — пероксидазы [4], и активация белка Araf-1 в процессе запуска внутреннего пути апоптоза [5, 6]. Более подробно функции этого белка разобраны, например в работах В.П. Скулачева [7].

У мышей, как и у многих других млекопитающих, существуют две изоформы цитохрома с, соматическая и тестикулярная, каждая из которых синтезируется со своего собственного гена [8]. Тестикулярная форма экспрессируется только в созревающих мужских гаметях в ходе сперматогенеза, в то

время как соматическая форма экспрессируется во всех клетках в онтогенезе с момента активации генов эмбриона [9]. Ранее было показано, что полная делеция гена *CycS*, кодирующего соматический вариант цитохрома *c*, летальна еще на стадии E8-E11 эмбриогенеза [10], что в частности, указывает на то, что в силу рестриктированной экспрессии тестикулярная форма цитохрома не может компенсировать дисфункцию соматической формы. Описаны пациенты с точечными мутациями в гене соматического цитохрома *c* [11], однако людей с его полной дисфункцией, по-видимому, не существует. С помощью технологии эмбриональных стволовых клеток ранее были созданы модели генетического нокаута тестикулярного цитохрома *c* [12] и кондиционного генетического нокаута соматического цитохрома *c* [13]. Нокаут гена тестикулярного цитохрома *CycT* никак не влиял на сперматогенез и функциональное состояние мужских гамет, однако вызывал преждевременную атрофию семенников [12]. Тем не менее, тестикулярная изоформа цитохрома *c* может быть эквивалентной заменой соматической, поэтому в некоторых клеточных линиях с нарушенной экспрессией соматического цитохрома *c* может происходить компенсаторная экспрессия тестикулярного цитохрома *c* [13]. Интересно, что *in vitro* тестикулярный цитохром *c* более эффективен в процессах индукции апоптоза и утилизации активных форм кислорода, чем соматический [14].

В модели мышинных легочных фибробластов, в которых не экспрессировались ни тестикулярная, ни соматическая форма цитохрома *c*, в митохондриях отсутствовали нативные комплексы дыхательной цепи — цитохромоксидаза (комплекс IV) и, что интересно, NADH-оксидаза (комплекс I). При этом комплекс III присутствовал в бесцитохромных клетках, хотя и в меньшем количестве [15]. Эти данные позволяют считать, что цитохром *c* необходим для сборки комплексов дыхательной цепи из отдельных субъединиц, а также предположить, что этот белок может участвовать в образовании суперкомплексов дыхательной цепи, в том числе так называемой респирасомы. В последние несколько лет активно разрабатываются новые мышинные модели, затрагивающие цитохром *c*, включая, помимо генетических нокаутов, мутагенез *in vivo* (генетический «нокин») [16, 17]. Ожидается, что они будут полезны при изучении патогенеза различных заболеваний, связанных

с нарушением функций митохондрий, а также для изучения механизмов устойчивости опухолевых клеток к индукторам апоптоза. Учитывая все вышесказанное, представляет интерес получение модели глубокого генетического нокадауна, в которой количество цитохрома *c* было бы существенно ниже нормального, в особенности в индуцибельном варианте. Кроме того кондиционный нокадаун в конкретных типах клеток поможет изучать гомеостаз, в том числе клеток и органов иммунной системы. В этой работе мы описываем мышей с генетическим нокадауном цитохрома *c* в Т-клетках и линию мышей с генетическим нокадауном цитохрома *c* в макрофагах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Линии мышей

Получение мышей генотипа *cfKW/cfKW* было описано ранее [18, 19]. Специфическая делеция аллели дикого типа гена *CycS* осуществлялась с помощью системы loxP-Cre рекомбинации. Для получения мышей с делецией в Т-клетках использовали трансгенных мышей, продуцирующих рекомбиназу Cre под контролем промотора-энхансера CD4 (при этом на стадии двойных положительных Т-клеток удаление гена *CycS* происходило во всех Т-клетках), для получения мышей с  $\Delta$ сyt макрофагами использовали Cre-трансгенных мышей под контролем промотора гена макрофагального лизоцима *Mlys*, и для получения мышей с убиквитарной делецией *CycS* использовали Cre-трансгенных мышей с промотором цитомегаловируса CMV. Все использовавшиеся в работе линии были на генетической основе C57Bl6.

### Генотипирование мышей

Генотипирование проводили методом ПЦР с использованием материала биопсии тканей кончиков хвостов молодых мышей возраста P14 — P28, из которого выделяли ДНК. Для детекции генотипов *WT* и *cfKW* гена *CycS* использовали праймеры Cytex2 5'-AGAGATGCAGAGGTTAAGTG-3' и Cyt12 5'-TGACCTTGCCTTCTTCGG-3'. Для генотипа *fKW* гена *CycS* — праймеры Cyt12 и Neo-R<sub>DP</sub> 5'-GCCCATTCGACCACCAAGC-3'. Наличие Neo-кассеты проверяли праймерами PGK 5'-CAGAGGCCACTTGTGTAGCG-3' и Cytex2. Генотипирование рекомбиназы Cre проводили для CMV-Cre с помощью прайме-

ров Cre.3 5'-СААТТТАСТГАССГТАСАС-3' и Cre.4 5'-САТСГССАТСТТССАГСАГ-3', для Mlys-Cre с помощью праймеров Cre.8 5'-СССАГАААТГССАГАТТАСГ-3' и Mlys1 5'-СТТГГГСТГССАГААТТТСТС-3', для CD4-Cre с помощью праймеров CD4cre1 5'-АТСААГГТСТТГАГГААГ-3', CD4cre2 5'-АССТСАТСАСТС ГТТГСАТС-3' и CD4cre3 5'-СТАГГАГТТГТГСТГСАСАГ-3'. Амплификацию для всех пар праймеров проводили по программе: 94 °С, 3 мин; затем 32 цикла — 94 °С, 30 с; 58 °С, 30 с; 72 °С, 75 с; заключительная элонгация — 72 °С, 5 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле и визуализировали при помощи окрашивания бромистым этидием.

#### *Выделение и генотипирование мышечных эмбрионов*

Для получения датированной беременности самца и самку ссаживали в одну клетку, утром на следующий день у самки проверяли наличие копулятивной пробки. Момент обнаружения копулятивной пробки считали 0.5-м днем беременности. При достижении желаемого срока беременности мышью эвтаназируют, извлекали матку, выделяли эмбрионы и удаляли внезародышевые оболочки с помощью микрохирургических инструментов. При работе с ранними эмбрионами (E9.5) манипуляции проводили при помощи светового диссекционного микроскопа Leica Stereo Zoom 6 Photo. Из эмбрионов выделяли ДНК, генотипирование проводили таким же образом, как было описано в предыдущем разделе.

#### *Получение и культивирование костномозговых макрофагов*

Мышей возраста 6–8 недель эвтаназируют, препарировали, извлекали бедренные кости и выделяют из них костный мозг. Далее стимулировали дифференцировку клеток костного мозга в макрофаги по стандартному протоколу, описанному ранее [20], с модификацией — использовали 20% лошадиную сыворотку вместо смеси 5% лошадиной и 15% эмбриональной бычьей сывороток.

#### *Выделение лимфоцитов из тимуса и селезенки*

Для выделения лимфоцитов из тимуса и селезенки мышей в возрасте 6–8 недель эвтана-

зируют и препарировали. Тимус и селезенку отделяли от окружающих тканей и помещали в среду DMEM («HyClone») с 10% эмбриональной бычьей сыворотки («HyClone»). Для определения общей клеточности тимус и селезенку протирали через 70 мкм нейлонное сито («BD»). Полученную суспензию клеток разводили в среде с эмбриональной бычьей сывороткой и отбирали аликвоту 10 мкл, которую смешивали в соотношении 1:1 с раствором трипанового синего («Gibco») и помещали в камеру Горяева. При работе с селезенкой перед подсчетом клеточности клеточную суспензию выдерживали 5 минут в АСК буфере для лизиса эритроцитов («Gibco»). Подсчет клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100.

#### *Саузерн-блоттинг*

Саузерн-блоттинг проводили по протоколу, описанному ранее [21]. ДНК, выделенную из макрофагов, подвергали реакции рестрикции с помощью рестриктазы BamHI («Thermo Scientific») в течение 16 часов. В реакции использовали 10 мкг ДНК на пробу, рестриктазу брали в соотношении 5 ед.а/мкг ДНК. Далее продукты рестрикции разделяли в 0,8% агарозном геле и переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану Hybond™-N+ («Amersham Biosciences»). Пробы для блоттинга получали при помощи двухраундовой ПЦР с геномной ДНК, в которой использовали внешние праймеры Cys1intF 5'-GCGACGGGGATGCGGACC-3' и Cys1intR 5'-СТТСААТАГСАААТАСАТСАСС-3', и внутренние праймеры CysProbeF 5'-ССТААССТАСАААГССАТГС-3' и CysProbeR 5'-ТСААГАСАГГТССАТГССААГ-3'. Пробы метили изотопом <sup>32</sup>P с помощью набора Megaprime DNA Labeling System («Amersham Biosciences»). Для визуализации радиоактивной метки использовали рентгеновскую пленку («Kodak»).

#### *Выделение РНК и обратная транскрипция*

Суммарную РНК выделяли из Т-клеток и макрофагов по методу Хомчинского [22] с помощью реактива TRI-Reagent («Sigma-Aldrich»). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Nano Drop), качество образцов анализировали методом РНК-электрофореза в агарозном

геле. Реакцию обратной транскрипции проводили со случайными девятинуклеотидными праймерами с помощью набора Reverse Transcriptase SS III («Invitrogen») по протоколу производителя. Для каждого образца в реакции использовали по 400 нг суммарной РНК, прошедшей предварительную обработку ДНКазой I («Thermo Scientific») для удаления остаточной геномной ДНК.

### ПЦР в реальном времени

Относительную экспрессию и соотношение аллелей определяли с помощью метода  $\Delta\Delta C_t$ , описанном ранее [23], используя в качестве референсного гена ген бета-актина мышцы. Для аллели дикого типа использовали праймеры Cys-1exF 5'-CGTCTGTCTTCGAGTCCG-3' и CysLys-R 5'-TTCCAGGGATGTACTTTTG-3', для аллели K72W – праймеры Cys-1exF и CysTrp-R 5'-TTCCAGGGATGTACTTCCAT-3', для тестикулярной формы цитохрома с применяли праймеры CysT-F 5'-CAGGGCACGGCTGCTGTGAT-3' и CysT-R 5'-CCACCGTGTGGCACTGAGCA-3', для бета-актина использовали праймеры actin-longF 5'-CAGGGTGTGATGGTGGGAATG-3' и actin-longR 5'-CCAGAGGCATACAGGGACAGC-3'. Аллелеспецифичную амплификацию на геномной ДНК проводили при помощи общего прямого праймера Cys-2intF 5'-AGAACAAGGTAACGGGG-3' и специфических обратных праймеров CysLys-R и CysTrp-R. Полимеразную реакцию проводили на приборе CFX96 («BioRad») с использованием наборов реагентов для ПЦР в реальном времени с интеркалятором EvaGreen («Синтол»). Амплификацию для всех пар праймеров проводили по программе: 94 °С, 3 мин; затем 40 циклов – 94 °С, 20 с; 60 °С, 30 с; 72 °С, 30 с; заключительная элонгация – 72 °С, 5 мин, затем для ПЦР-продуктов строили кривую плавления от 50 °С до 95 °С.

### Проточная цитофлуориметрия и внутриклеточное окрашивание цитохрома с

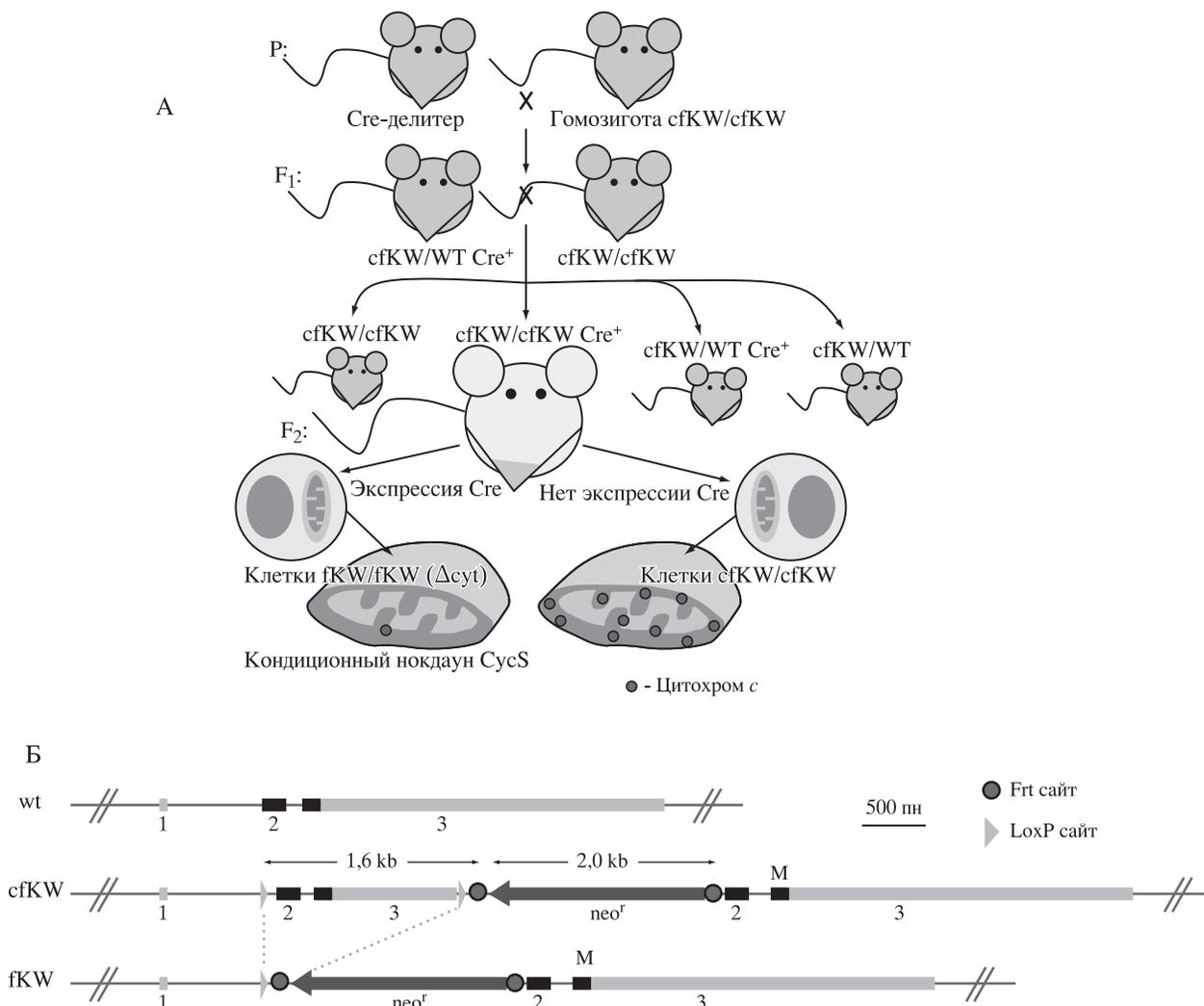
Для внутриклеточного окрашивания цитохрома с выделенные из тимуса и селезенки лимфоциты фиксировали 4% раствором параформальдегида, затем проводили их пермеабиллизацию 0,5% раствором тритона X-100 и окрашивали специфическими антителами по протоколам производителей. Пе-

ред окрашиванием Fc-рецепторы на клетках блокировали антителом 2.4G2 (10 мкг/мл). Для окрашивания цитохрома с использовали специфические моноклональные антитела мыши клона бН2.В4 («BD Pharmingen») и вторичные моноклональные анти-IgG1-антитела крысы клона М1-14D12 («eBioscience»), конъюгированные с фикоэритрином. Для выделения фракции CD4-позитивных клеток использовали анти-CD4 антитела крысы клона RM4-5 («eBioscience»), конъюгированные с флуоресцеинизотиоцианатом, для выделения фракции CD19-позитивных клеток использовали анти-CD4 антитела мыши клона MB19-1 («eBioscience»), конъюгированные с флуорофором Cy5. Измерения проводили на капиллярном проточном цитометре Guava 8HT («Millipore»).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Генетическое обоснование предлагаемой модели

На основании последовательности гена соматического цитохрома с мышцы *CysS* с помощью методов генетической инженерии и технологии эмбриональных стволовых клеток ранее были получены мыши с генотипом *cfKW*, у которых второй и третий экзоны аллели *CysS* дикого типа были фланкированы LoxP-сайтами. Процедура получения этих мышей описана в работах Муфазалова и коллег [18, 19]. При этом дизайн генетических конструкций позволял, кроме внесения точечной мутации в ген цитохрома с, получать еще одну полезную генетическую модель, которая и разрабатывалась в настоящем исследовании. При помощи рекомбиназы Cre у таких мышей *in vivo* можно удалить кодирующую часть аллели *CysS* дикого типа, получив тем самым генотип, обозначаемый *fKW*. Для этого нужно скрестить гомозиготу *cfKW/cfKW* с соответствующим Cre-делитером (трансгенной мышью, в которых рекомбиназа Cre экспрессирована под контролем тканеспецифичного или убиквитарного промотора), а затем скрестить гетерозигот из поколения F<sub>1</sub> между собой, как показано на рис. 1А. Кондиционные делитеры, экспрессирующие рекомбиназу Cre под тканеспецифическим промотором, будут давать в поколении F<sub>2</sub> химерных мышей, у которых в тех клетках, где Cre не работала, останется генотип *cfKW/cfKW*, а в клетках, подвергшихся действию Cre, будет генотип *fKW/fKW*, для краткости обозначаемый нами



**Рис. 1. А) Схема применявшихся в работе скрещиваний.**

**Б) Схема организации локуса *CytS* у мышей различных генотипов, использовавшихся в работе.** Тонкая линия на схеме соответствует межгенным спейсерам и интронам, прямоугольниками обозначены экзоны гена *CytS*, серым цветом обозначены нетранслируемые участки, черным цветом — кодирующая последовательность; черная стрелка обозначает *neo<sup>r</sup>*-кассету. Цифры под экзонами означают их порядковые номера. Генотип *fKW* получается из генотипа *cfKW* после вырезания LoxP-фланкированной аллели дикого типа с помощью рекомбиназы Cre. При этом первый и второй экзоны *CytS* разрушаются *neo<sup>r</sup>*-кассетой.

также  $\Delta$ cyt по причине сниженного количества цитохрома с в митохондриях таких клеток (см. ниже). Для повышения выхода мышей с  $\Delta$ cyt-клетками, гетерозигот из F<sub>1</sub> можно скрещивать на гомозигот *cfKW/cfKW*. Данный подход был применен нами для получения из линии *cfKW/cfKW* новых независимых линий: с полной делецией (она поддерживается в гетерозиготном состоянии), а также с кондиционной (индуцибельной или тканеспецифической) делецией аллели *CytS* дикого типа в Т-клетках и в макрофагах. Для этого нами были использованы делитеры CMV-Cre, CD4-Cre и Mlys-Cre, соответственно.

Ген *CytS* расположен на 6-й аутосоме и состоит из трёх экзонов — короткого некоди-

рующего первого (58 п.н.), второго экзона (178 п.н.), в котором начинается рамка считывания, и третьего экзона, в котором рамка считывания заканчивается. Размер этого экзона варьирует для разных мРНК в зависимости от положения 3'-конца транскрипта, и составляет не менее 289 п.н. В гене *CytS* присутствуют два интрона, первый размером 747 п.н. и второй размером 106 п.н. После третьего экзона аллели дикого типа в конструкции, использованной для получения *cfKW* мышей, располагается фланкированная Frt-сайтами *neo<sup>r</sup>* — кассета размером 1930 п.н., которая используется в технологии эмбриональных стволовых клеток для положительной селекции. Кассета представляет

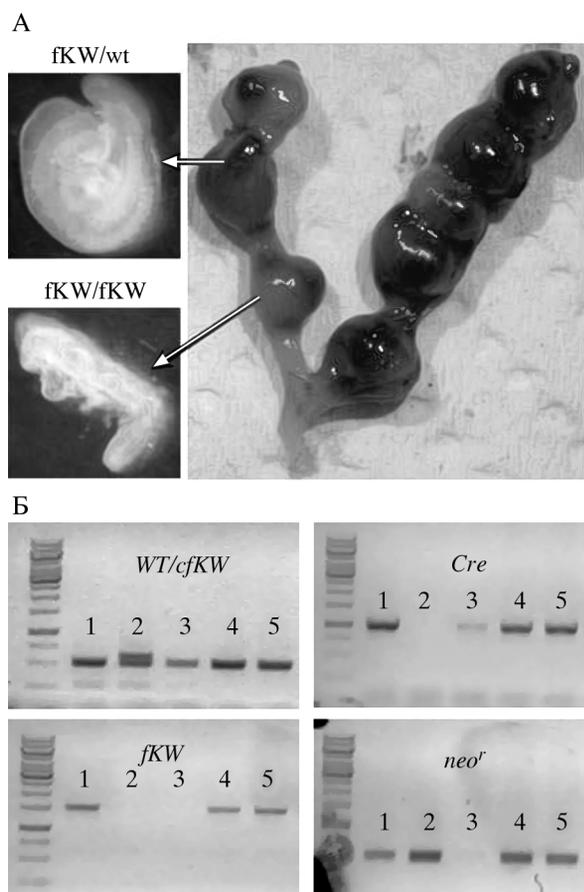


Рис. 2. А) Остановившийся в развитии эмбрион *fKW/fKW* и нормальный эмбрион *fKW/wt* в матке мыши.

Б) Генотипирование мышиных эмбрионов. Образцы 1, 4 и 5 имеют генотип — *wt/fKW Cre*, 2 — *wt/cfKW*, 3 — *wt/wt Cre*. ПЦР-продукт *wt* имеет размер 520 п.н., ПЦР-продукт *cfKW* имеет размер 609 п.н., ПЦР-продукт *neo<sup>r</sup>* имеет размер 540 п.н., ПЦР-продукт *fKW* имеет размер 1206 п.н., ПЦР-продукт *Cre* имеет размер 1025 п.н.

собой ген аминокликозидфосфотрансферазы, инактивирующей такие аминокликозидные антибиотики как неомицин и G418, ген находится под управлением конститутивного промотора фосфоглицераткиназы. После *neo<sup>r</sup>* — кассеты в конструкции находится последовательность мутантной аллели цитохрома *c*, в которой лизин в положении 72 заменён на триптофан (K72W). Данная замена не оказывает заметного влияния на дыхательную функцию цитохрома *c*, как описано в работе Муфазалова и соавторов [18]. Первый экзон *SuscS* у мышей *cfKW* является общим для «флоксированной» аллели дикого типа и для триптофановой мутантной аллели. Общая схема генотипов для *SuscS* дикого типа, а также *cfKW* и *fKW* приведена на рис. 1Б. Из-за наличия между первым и вторым экзонами у мутантной аллели достаточно длинной

последовательности размером 4373 п.н., в которой к тому же находятся второй и третий экзоны дикого типа, экспрессии мутантной аллели для генотипа *cfKW* не происходит. В то же время уровень экспрессии аллели дикого типа у *cfKW*-мышей соответствует уровню экспрессии цитохрома *c* у мышей линии В6 дикого типа. Нами было предположено, что удаление из цитохромного локуса двух флоксированных экзонов аллели дикого типа (генотип *fKW*) будет приводить к функциональной инактивации цитохрома *c*, поскольку между первым экзонам и вторым экзонам мутантной аллели помимо первого интрона остается протяженная *neo<sup>r</sup>* — кассета. В этом случае размер первого интрона за счёт *neo* — кассеты увеличивается с 747 п.н. до 2800 п.н., что негативно влияет на уровень экспрессии мутантной аллели K72W, приводя к образованию цитохром *c*-дефицитных клеток. Уровень такого дефицита *a priori* не был известен и должен был быть определен экспериментально.

#### Модель полного нокаута цитохрома *c*

Получение линии мышей с полным (убиквитарным) нокаутом гена *SuscS* на основе генотипа *cfKW/cfKW* было выполнено с использованием убиквитарных трансгенных делитеров CMV-Cre. Оказалось, что мыши с генотипами *cfKW/fKW* и *WT/fKW* полностью жизнеспособны и неотличимы по фенотипу от мышей дикого типа и мышей *cfKW/cfKW*. Однако получить новорожденных гомозиготных мышей *fKW/fKW* не удалось ни при скрещивании *WT/fKW* x *WT/fKW*, ни при скрещивании *WT/fKW CMV-Cre* x *cfKW/cfKW*. Вскрытие беременных самок и ПЦР типирование генотипа индивидуальных эмбрионов показало, что часть эмбрионов останавливается в развитии между E9,5-E11,5, редуцируется и затем погибает, причем этому процессу подвергаются все гомозиготные эмбрионы *fKW/fKW*. Пример остановившегося в развитии эмбриона и результаты генотипирования эмбрионов мышей показаны на рис. 2. Статистика по генотипам в потомстве на разных периодах онтогенеза приведена в табл. 1. В целом, летальность генотипа *fKW/fKW* ( $\Delta$ cyt) проявляется в ходе второй недели эмбрионального развития, что соответствует данным, описанным ранее для полного нокаута гена *SuscS* [10]. Таким образом, *neo<sup>r</sup>* — кассета в наших генетических конструкциях дей-

**Таблица 1.** Соотношение генотипов в потомстве мышей с полной делецией аллели дикого типа гена *CysS*

| Скращивание: <i>WT/fKW Cre+</i> x <i>WT/fKW Cre+</i> |              |                |               |                          |                          |
|--|--------------|----------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| Период: E9,5   | WT/WT<br>15  | WT/fKW<br>35   | fKW/fKW<br>11 | Пометов: 7<br>Особей: 61 |                          |
| Скращивание: <i>WT/fKW Cre+</i> x <i>cfKW/cfKW</i>   |              |                |               |                          |                          |
| Период: E13,5  | WT/fKW<br>37 | cfKW/fKW<br>19 | WT/cfKW<br>14 | fKW/fKW<br>0             | Пометов: 9<br>Особей: 70 |
| Скращивание: <i>WT/fKW Cre+</i> x <i>WT/fKW Cre+</i> |              |                |               |                          |                          |
| Период: P0-P10                                       | WT/WT<br>12  | WT/fKW<br>34   | fKW/fKW<br>0  | Пометов: 7<br>Особей: 46 |                          |

ствительно «нокаутирует» ген соматического цитохрома *c*, предположительно на уровне сплайсинга.

#### Модели кондиционного нокауна цитохрома *c*

Обе полученные с помощью *CD4-Cre* и *Mys-Cre* делиторов линии мышей с дефицитом цитохрома *c* в Т-клетках и макрофагах имели морфологически нормальный габитус. В отличие от мышей с полным нокаутом *CysS*, у мышей с макрофагальным и Т-клеточным  $\Delta$ сyt генотипами было нормальное эмбриональное и постнатальное развитие. При этом у Т-клеточных  $\Delta$ сyt мышей наблюдалась нормальная клеточность тимуса и селезенки. Культивирование и дифференцировка в макрофаги клеток костного мозга, полученных от макрофагальных  $\Delta$ сyt мышей, также шли в соответствии со стандартным протоколом культивирования [20]. Для уточнения фенотипа  $\Delta$ сyt клеток нами будут поставлены дополнительные эксперименты.

#### Определение эффективности удаления гена цитохрома с дикого типа в моделях кондиционного нокауна

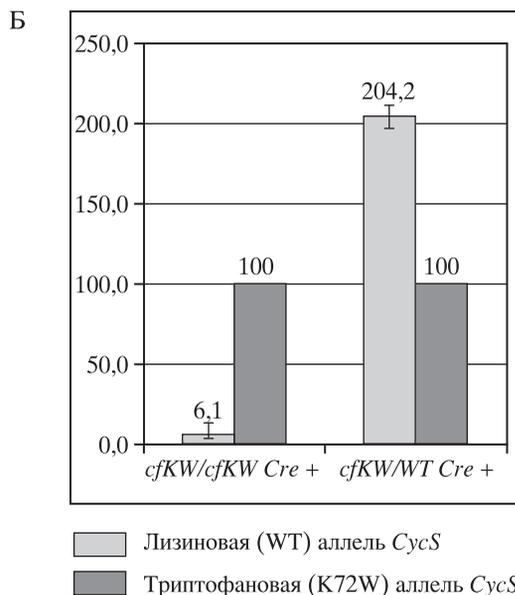
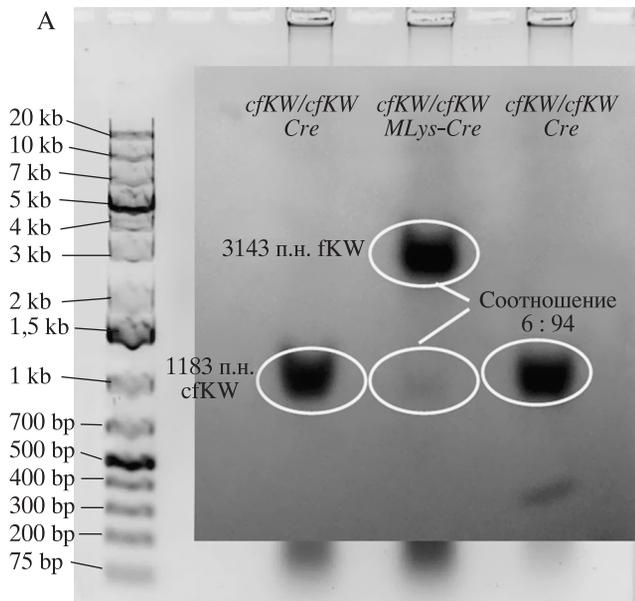
Эффективность вырезания Cre-рекомбиназой LoxP-фланкированной аллели дикого типа была определена для мышей с макрофагальным и Т-клеточным  $\Delta$ сyt генотипами. Для этого были использованы методы Саузерн-блоттинга с зондом на первый интрон гена *CysS* и аллель-специфической ПЦР в реальном времени, различающей аллели WT и K72W. Для нормального локуса *CysS* размер фрагмента, гибридизующегося с зондом, составляет 1090 п.н., для локуса *cfKW* за счет

добавления линкера и LoxP-сайта увеличивается до 1183 п.н., для локуса *fKW* за счет удаления сайта рестриктазы BamHI перед вторым экзоном аллели дикого типа размер фрагмента увеличивается до 3143 п.н. Количественное определение степени вырезания методом аллель-специфической ПЦР основана на том, что в генотипе *cfKW* обе аллели *CysS* находятся в равном соотношении, а в генотипе *fKW* присутствует только аллель K72W. Для ДНК из мышинных костномозговых макрофагов на 8-й день культивирования оба эти метода показали остаточное присутствие приблизительно 6% аллели дикого типа (вырезаемой) относительно 100% аллели K72W (невырезаемой), что говорит о примерно 94% эффективности действия рекомбиназы Cre в макрофагах (см. рис. 3). Неожиданно оказалось, что жизнеспособность клеток в условиях стандартного культивирования была одинаковой для нормальных и  $\Delta$ сyt макрофагов (данные не показаны).

Аналогично, для Т-клеток эффективность вырезания аллели дикого типа составляла 94 – 95% для фракции суммарных тимоцитов и около 97% для CD4<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных методом проточной цитофлуориметрии.

#### Определение степени снижения экспрессии цитохрома *c* на уровне белка

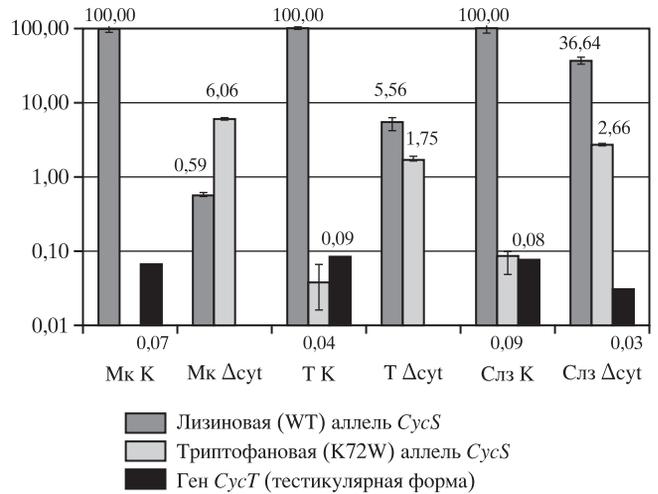
Механизм, за счет которого присутствие в генотипе *fKW* *neo<sup>r</sup>* – кассеты в интроне между первым и вторым экзоном снижает экспрессию аллели K72W, связан с нарушением сплайсинга первичного транскрипта гена *CysS* последовательностью *neo<sup>r</sup>* – кассеты (данные не показаны). Анализ данных по экспрессии аллелей K72W и WT гена *CysS* показал, что различия в количестве суммарного цитохрома *c* между клетками  $\Delta$ сyt и нормаль-



**Рис. 3. Определение эффективности вырезания лизиновой (WT) аллели *CysS* у макрофагов мышей *cfKW/cfKW Mlys-Cre+*.**

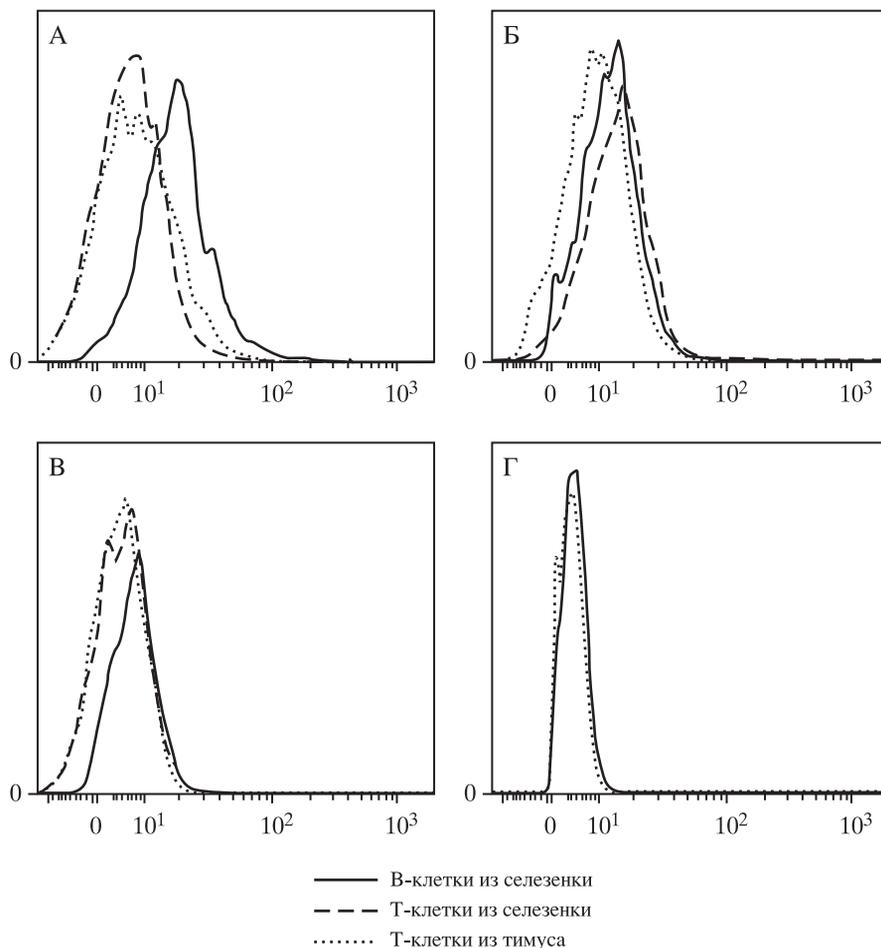
**А) Метод блот-гибридизации по Саузерну.** Геномную ДНК подвергали специфическому расщеплению рестриктазой *Bam*HI, электрофорезу, а затем гибридизовали с зондом, связывающим последовательность первого интрона *CysS*. Фрагмент размером 1183 п.н. соответствует аллели *cfKW*, фрагмент размером 3143 п.н. — аллели *fKW*. Соотношение этих фрагментов для макрофагов *cfKW/cfKW Mlys-Cre+* составляет 6:94. Боковые дорожки соответствуют отрицательному контролю — макрофагам *cfKW/cfKW Mlys-Cre-*.

**Б) Метод аллель-специфической ПЦР в реальном времени.** Амплификацию последовательностей *WT* и *K72W* проводили на геномной ДНК методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени, их количественное соотношение определяли методом  $\Delta\Delta C_T$ . Для контрольного генотипа *cfKW/WT Mlys-Cre-* соотношение аллелей *WT* : *K72W* составляет 2 : 1, для генотипа *cfKW/cfKW Mlys-Cre+* — зависит от эффективности вырезания *WT* с помощью *Cre*.



**Рис. 4. Экспрессия гена *CysS* в макрофагах мышей *cfKW/cfKW Mlys-Cre+* и лимфоцитах мышей *cfKW/cfKW CD4-Cre+* на уровне мРНК.** Амплификацию последовательностей *WT* и *K72W* проводили на кДНК из макрофагов и лимфоцитов методом аллель-специфической ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использовали  $\beta$ -актин мыши. Количественное значение уровня экспрессии определяли методом  $\Delta\Delta C_T$ . В качестве контроля к  $\Delta$ сyt-клеткам *cfKW/cfKW Cre+* использовали клетки *cfKW/cfKW Cre-*. Далее, для каждой пары образцов (*Cre+* и *Cre-*) экспрессию всех изоформ цитохрома *c* нормировали на экспрессию лизиновой аллели в контрольном образце, которую принимали за 100 единиц. Гистограмма построена в логарифмической шкале. Значения относительной экспрессии ниже 0,1 близки к порогу чувствительности метода и не являются достоверными. **Мк** обозначает костномозговые макрофаги, **Т** — лимфоциты тимуса (тимоциты), **Слз** — суммарную фракцию лейкоцитов селезенки (спленоциты).

ными клетками для макрофагов и тимоцитов проявляются как на уровне мРНК (рис. 4), так и на уровне белка (рис. 5). Отметим, что для спленоцитов мышей из линии с Т-клеточным нокадауном (для суммарной фракции всех лейкоцитов, выделяемых из селезенки) такого различия нет, поскольку разница в количестве цитохрома *c* в других типах лейкоцитов. Для контрольных *WT/WT* и *cfKW/cfKW Cre-* мышей экспрессия мутантной (триптофановой) аллели в лейкоцитах либо вообще не детектируется при помощи РТ-ПЦР, либо детектируется на пороге чувствительности метода как минимум на три порядка слабее уровня экспрессии аллели дикого типа. В популяциях суммарных  $\Delta$ сyt макрофагов и Т-клеток частично сохраняется и детектируется экспрессия аллели дикого типа, за счет неполной делеции (даже при эффективности действия рекомбиназы *Cre* в диапазоне 94–97%). Экс-



**Рис. 5.** Анализ внутриклеточного содержания цитохрома с в лимфоцитах мышей *cfKW/cfKW CD4-Cre+* и *cfKW/cfKW CD4-Cre-* методом проточной цитофлуориметрии. CD4<sup>+</sup> и В-лимфоциты были окрашены флуоресцентными конъюгатами антител анти-CD4-FITC и анти-CD19-Су5 соответственно (**А**, **Б**, **В**), а также моноклональными мышинными антителами к цитохрому с и вторичными антителами, конъюгированными с фикоэритрином (**А**, **Б**). Клетки были разделены по размеру, гранулярности и маркерам CD4 и CD19. На графиках **А**, **Б** и **В** клетки CD19<sup>+</sup>, взятые из селезёнки, обозначены сплошной черной линией, клетки CD4<sup>+</sup> из селезёнки – пунктирной светло-серой линией, клетки CD4<sup>+</sup> из тимуса – линией темно-серых точек. На графике **Г** черная сплошная линия обозначает неокрашенные спленоциты, а линия темно-серых точек обозначает неокрашенные тимоциты.  
**А)** Лимфоциты мыши *cfKW/cfKW CD4-Cre+*. Большая часть CD4<sup>+</sup> клеток как из тимуса, так и из селезенки, имеет сниженное содержание цитохрома с.  
**Б)** Лимфоциты мыши *cfKW/cfKW CD4-Cre-*. Все клетки имеют приблизительно одинаковое содержание цитохрома с.  
**В)** Лимфоциты мыши *cfKW/cfKW CD4-Cre+*, которые были окрашены на CD4 и CD19, но не были окрашены на цитохром с.  
**Г)** Неокрашенные тимоциты и спленоциты мыши *cfKW/cfKW CD4-Cre+*.

прессия мутантной аллели K72W в популяции  $\Delta$ сyt клеток сопоставима с экспрессией аллели дикого типа или даже несколько превышает ее. Таким образом, суммарная экспрессия мРНК цитохрома с в  $\Delta$ сyt клетках в нашей модели варьирует вокруг уровня примерно в 10% от ее нормального количества и немного отличается от эксперимента к эксперименту. Важно, что ни в контрольных, ни в цитохром с-дефицитных клетках не наблюдается компенсаторной экспрессии тестикулярного цитохрома. Данные анализа внутриклеточного количества цитохрома с методом проточ-

ной цитофлуориметрии (**рис. 5А**) указывают на меньшее содержание этого белка в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах CD4-Cre  $\Delta$ сyt мышей, изолированных как из тимуса, так и из селезенки, по сравнению с В-лимфоцитами. В то же время и Т-, и В-лимфоциты контрольных мышей *cfKW/cfKW* имеют примерно одинаковое внутриклеточное содержание цитохрома с (**рис. 5Б**). Распределение клеток по количеству цитохрома с для  $\Delta$ сyt CD4<sup>+</sup> Т-лифоцитов показало один пик максимума, что указывало на равномерное присутствие имеющегося количества этого белка в популяции

CD4<sup>+</sup> клеток. В то же время, кривая распределения для CD4<sup>+</sup> Δсyt клеток имеет пологий участок справа, который соответствует условно нормальному количеству цитохрома с. Этот участок, вероятно, соответствует тем Т-клеткам, в которых рекомбиназа Sre не сработала, и они сохранили аллель дикого типа.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В этой и предыдущих работах [18, 19] нами разработан и обоснован подход, позволяющий получать линии мышей со сниженной экспрессией соматического цитохрома с в выбранном типе клеток-мишеней. В результате получены новые линии мышей с полным (летален в гомозиготе) или кондиционным (Т-клеточным и макрофагальным) генетическим нокдауном *CysC*, позволяющим снизить количество соматического цитохрома с в клетках приблизительно на порядок. Валидность и эффективность полученной системы была подтверждена нами несколькими независимыми способами. В ближайшее время подобным образом могут быть получены и другие линии мышей с недостаточностью цитохрома с в других типах клеток, а также в системах с индуцибельным снижением экспрессии, после инъекций тамоксифена [24]. Интересно, что, несмотря на летальность гомозигот по полному нокдауну *CysC* во время второй недели эмбрионального развития (что является доказательством глубокого дефицита экспрессии цитохрома с в каких-то типах клеток, критичных для эмбрионального развития), костномозговые макрофаги мышей, гомозиготных по кондиционному нокдауну, обладали в стандартных условиях культивирования такой же жизнеспособностью, как и макрофаги дикого типа. Это дало нам возможность в дальнейшем использовать их в экспериментах *in vitro*, позволяющих определить критические пороги для количества цитохрома с, необходимого для процессов окислительного фосфорилирования, защиты от АФК и индукции апоптоза. Другой неожиданный результат этой работы заключается в отсутствии явных дефектов у наивных мышей с нокдауном цитохрома с в Т лимфоцитах. В будущих экспериментах такие мыши будут использованы в экспериментах, при которых Т клеточный компартмент иммунной системы будет подвергнут физиологическому стрессу.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность В.Г. Гогвадзе и А.Ю. Сазыкину за методическую помощь, Д.В. Купрашу и Д.Н. Пенькову за дизайн генетической конструкции *cfKW*, Б.Д. Животовскому и В.П. Скулачеву за ценные обсуждения, а также С.В. Бозровой и И.В. Кислякову за помощь в получении и культивировании макрофагов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 11-04-02100-а.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacMunn C.A. Researches on Myohaematin and the Histoematin. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 1886, 177, 267–298.
2. Keilin D. On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants. Proc. R. Soc. Lond., Ser B. 1925, 98, 312–339.
3. Cooper C., Lehninger A.L. Oxidative phosphorylation by an enzyme complex from extracts of mitochondria. III. The span cytochrome c to oxygen. J. Biol. Chem. 1956, 219(1), 519–529.
4. Yonetani T., Ray G.S. Studies on cytochrome c peroxidase. I. Purification and some properties. J. Biol. Chem. 1965, 240(11), 4503–4508.
5. Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 1996, 86, 147–157.
6. Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T., Doskeland S.O. Injected cytochrome c induces apoptosis. Nature 1998, 391, 449–450.
7. Skulachev V.P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. FEBS Lett. 1998, 423(3), 275–280.
8. Hake L.E., Kuemmerle N., Hecht N.B., Kozak C.A., Wang X. et al. The genes encoding the somatic and testis-specific isoforms of the mouse cytochrome c genes map to paralogous regions of chromosomes 6 and 2. Genomics 1994, 20, 503–505.
9. Hennig B. Change of cytochrome c structure during development of the mouse. Eur J. Biochem. 1975, 55(1), 167–183.
10. Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Williams R.S. et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. Cell 2000, 101, 389–399.
11. Liptak M.D., Fagerlund R.D., Ledgerwood E.C., Wilbanks S.M., Bren K.L. The proapoptotic G41S mutation to human cytochrome c alters the heme electronic structure and increases the electron self-exchange rate. J Am Chem Soc. 2011, 133(5), 1153–1155.
12. Narisawa S., Hecht N.B., Goldberg E., Boatright K.M., Millán J.L. et al. Testis-specific cytochrome

- c*-null mice produce functional sperm but undergo early testicular atrophy. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22(15), 5554-5562.
13. *Vempati U.D., Diaz F., Barrientos A., Narisawa S., Moraes C.T. et al.* Role of cytochrome C in apoptosis: increased sensitivity to tumor necrosis factor alpha is associated with respiratory defects but not with lack of cytochrome C release. *Mol. Cell Biol.* 2007, 27(5), 1771 – 1783.
  14. *Vempati U.D., Han X., Moraes C.T.* Lack of cytochrome *c* in mouse fibroblasts disrupts assembly/stability of respiratory complexes I and IV. *J Biol Chem.* 2009, 284(7), 4383 – 4391.
  15. *Liu Z., Lin H., Ye S., Liu Q.Y., Liu X.J. et al.* Remarkably high activities of testicular cytochrome *c* in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 8965 – 8970.
  16. *Vempati U.D., Torraco A., Moraes C.T.* Mouse models of oxidative phosphorylation dysfunction and disease. *Methods* 2008, 46(4), 241 – 247.
  17. *Kulikov A.V., Shilov E.S., Mufazalov I.A., Gogvadze V., Nedospasov S.A., Zhivotovsky B.* Cytochrome *c*: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 2012, 69(11), 1787 – 1797.
  18. *Муфазалов И.А., Пеньков Д.Н., Черняк Б.В., Плетюшкина О.Ю., Негоспасов С.А. и др.* Эмбриональные фибробласты мыши с мутацией K72W в гене соматического цитохрома С: получение и характеристика. *Молекулярная биология* 2009, 43(4), 648 – 656.
  19. *Муфазалов И.А., Круглов А.А., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Негоспасов С.А. и др.* Эффекты мутации в гене цитохрома С и блокаторов активных форм кислорода на ускоренную инволюцию тимуса в мышах, трансгенных по локусу ФНО/ЛТ. *Российский иммунологический журнал* 2011, 5(14), № 2, 112 – 120.
  20. *Boltz-Nitulescu G., Wiltshcke C., Holzinger C., Fellinger A. et al.* Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J. Leukoc. Biol.* 1987, 41(1), 83 – 91.
  21. *Brown T.* Southern blotting. 1993. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Suppl.* 21, 2.9.1 – 2.9.14.
  22. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162(1), 156 – 159.
  23. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C<sub>T</sub> Method. *Methods* 2001, 25(4), 402 – 408.
  24. *Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P.* Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92(15), 6991 – 6995.

## CONDITIONED GENETIC KNOCKDOWN OF SOMATIC CYTOCHROME IN LYMPHOID CELLS OF MICE

**E.S. Shilov\*, I.A. Mufazalov\*, Yu.V. Shebzuhov\*, R.V. Zvartse\*\*,  
M.S. Drutskay\*, \*\*, S.A. Nedospasov\*, \*\***

\**Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

\*\**Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow*

Protein cytochrome *c* is an essential component of mitochondrial OXPHOS system. It also plays an important role in the defense against reactive oxygen species and serves as the trigger for the formation of apoptosome in the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis induction. Due to functional significance and non-redundancy of cytochrome *c* genetic defects in humans leading to loss of functions are unknown, and the complete knockout of the somatic cytochrome *c* gene *CycS* is lethal in mice. We have developed a novel genetic model in mice, which permits to dramatically reduce the expression level of somatic cytochrome *c* in selected cell populations *in vivo*. Using this approach we obtained and characterized two novel strains of mice with genetic knockdown of cytochrome *c* in T cells or macrophages. Both strains are viable and fertile. A decrease in the expression of cytochrome *c* was mediated by excision of *LoxP*-flanked wild-type allele of the gene *CycS* by tissue-specific Cre-recombinase. Similarly made complete *CycS* gene knockdown is lethal at embryonic stage, as reported for complete cytochrome *c* knockout. The expression level of cytochrome *c* in lymphocytes and macrophages cells was reduced approximately tenfold. This novel genetic system allows to study the homeostasis of immune cells *in vivo* under different physiological conditions.