

Санкт-Петербургский Государственный университет

Шишков Алексей Григорьевич

**Структурные изменения в митохондриях дофаминергических нейронов при
условном нокауте гена *Mfn2***

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки биология
основная образовательная программа 06.03.01

Работа выполнена в лаборатории биологии синапсов
Института трансляционной биомедицины СПбГУ.
Зав. лаб. – профессор Шупляков Олег Викторович

Научный руководитель:
к.б.н., профессор СПбГУ Шупляков Олег Викторович

Санкт-Петербург
2021

Оглавление

<u>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</u>	3
<u>ВВЕДЕНИЕ</u>	4
<u>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</u>	5
БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА: КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА И СОЦИАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ	5
ОРГАНИЗАЦИЯ ПРОЕКЦИЙ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ В СТРИАТУМ И ИХ ФУНКЦИИ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ	7
ЭТИОЛОГИЯ БП	8
МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ БП	9
ФУНКЦИИ MFN2 В РАБОТЕ МИТОХОНДРИЙ	10
СВЯЗЬ MFN2 С БП	11
<u>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</u>	12
МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА	13
ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ	14
ФИП-СЭМ МИКРОСКОПИЯ	17
ТРЕХМЕРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ И СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ	19
<u>РЕЗУЛЬТАТЫ</u>	19
НА РАННИХ СТАДИЯХ ПОСЛЕ ИНАКТИВАЦИИ MFN2 ИЗМЕНЯЕТСЯ ФОРМА МИТОХОНДРИЙ	19
ИНАКТИВАЦИЯ MFN2 ВЫЗЫВАЕТ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ВНУТРЕННЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ И, В КОНЕЧНОМ ИТОГЕ, ВЕДЕТ К НАРУШЕНИЮ ИХ ЦЕЛОСТНОСТИ.	25
<u>ОБСУЖДЕНИЕ</u>	28
<u>ВЫВОДЫ</u>	30
<u>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</u>	31

Список сокращений

АФК – активные формы кислорода

БП – болезнь Паркинсона

БШв – внутренний сегмент бледного шара

БШн – наружный сегмент бледного шара

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГТФ – гуанозинтрифосфат

мтДНК – митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

СТЯ – субталамическое ядро

ТЛ – тельце Леви

ТЭМ – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

ФИП-СЭМ – фокусируемый ионный пучок – сканирующий электронный микроскоп

ЧСк – компактный слой черной субстанции

ЧСр – ретикулятный (сетчатый) слой черной субстанции

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь митохондрий

ВАС – bacterial artificial chromosome (бактериальная искусственная хромосома)

CreERT – Cre-рекомбиназа, индуцируемая 4-гидрокситамоксифеном

ДАВ – диаминобензидин

HR – heptad repeat (гептапептидный повтор)

LRRK2 – leucine-rich repeat kinase 2 (обогащенная лейциновыми повторами киназа 2)

Mfn – mitofusin (митофузин)

OPA1 – динамин-подобный белок 120 кДа

PBS – фосфатный буфер

PINK1 – PTEN-induced kinase 1 (PTEN-индуцированная киназа 1)

ТМ – трансмембранный домен

Vps35 – vacuolar sorting protein 35 (сортировочный вакуолярный белок 35)

Введение

Черная субстанция – это одно из ядер среднего мозга, содержащее дофаминергические (DA) нейроны, проецирующиеся в стриатум и контролирующие программы произвольного и непроизвольного движения. Дегенерация этой популяции нейронов является причиной двигательных симптомов, обнаруживаемых у пациентов с болезнью Паркинсона (БП). Основной причиной БП является гибель дофаминергических нейронов черной субстанции и нарушение их проекций в стриатум [1]. Имеются экспериментальные доказательства того, что митохондрии необходимы для поддержания клеточных функций DA нейронов, таких как антероградный аксональный транспорт [2] и высвобождение дофамина нервными окончаниями на нейроны стриатума [3] и многих других функций. Делеция [4] или подавление экспрессии мтДНК [5] выборочно в DA нейронах среднего мозга у мышей приводит к появлению моторных проявлений и нейродегенерации, характерных для БП. Однако одним из недостатков этих экспериментов является то, что митохондриальные дефекты запускаются в нейронах уже на эмбриональной стадии, что свидетельствует о том, что наблюдаемые БП-подобные фенотипы могут быть результатом не только нейродегенеративных процессов, но и нарушения развития нервной системы. В данной работе проведено исследование митохондриальной структуры в DA нейронах у взрослых животных при условном выключении гена *Mfn2*. Этот подход позволил оценить развитие патологии в модели сформированной дофаминергической системой, как это бы происходило при развитии БП.

Целью работы являлось исследовать последовательные структурные изменения в митохондриях дофаминергических нейронов черной субстанции при выключении гена *Mfn2*.

В ходе исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. С помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) сравнить морфологию митохондриальных мембран контрольных мышей с мышами с условным нокаутом гена *Mfn2* в DA нейронах черной субстанции через 3, 6 и 9 недель после выключения гена.
2. Методом фокусируемого ионного пучка – сканирующего микроскопа (ФИП-СЭМ) выполнить трехмерную реконструкцию митохондрий и сравнить их форму и объём у контрольных и нокаутных мышей на ранних стадиях после выключения гена *Mfn2*.

Обзор литературы

Болезнь Паркинсона: клиническая картина и социальные аспекты.

Болезнь Паркинсона (БП) – неизлечимое на сегодняшний день, прогрессирующее хроническое заболевание центральной нервной системы, риск развития которого значительно повышается после 60 лет. Из-за постепенного старения населения, а также по ряду иных, не вполне изученных причин, заболеваемость БП в мире быстро растет последние два десятилетия [6]. В 2016 году в мире насчитывалось около 6,1 миллионов человек, страдающих БП [7]. Для общества болезнь Паркинсона становится всё большим социально-экономическим бременем.

По своей сути БП представляет собой нейродегенеративное заболевание, симптомы которого, в первую очередь, вызываются нарушениями работы проекций черной субстанции мозга в стриатум. Одной из основных причин этих нарушений является гибель дофаминергических нейронов компактного слоя черной субстанции (*лат. substantia nigra pars compacta*). Гибель нервных клеток несёт прогрессирующий характер, и в конечном итоге ведёт к нарушениям функций дофаминергической системы. Возникающий дефицит дофамина в базальных ганглиях вызывает наиболее яркие симптомы БП - двигательные расстройства. Однако БП также характеризуется многочисленными немоторными симптомами, часть которых проявляется за несколько лет до появления двигательных нарушений.

Классические моторные проявления БП были описаны Джеймсом Паркинсоном в 19 веке, а позже – Жан-Мартеном Шарко [8]. Этими симптомами являются брадикинезия (замедление активности и согласованности движений), мышечная ригидность (значительное повышение мышечного тонуса) и тремор покоя. Также выделяют нарушение осанки и походки (Рис.1). В общем, двигательное расстройство при БП можно описать одним термином – *дискинезия*, то есть патологические и непроизвольные движения, внезапно возникающие в мышцах организма.

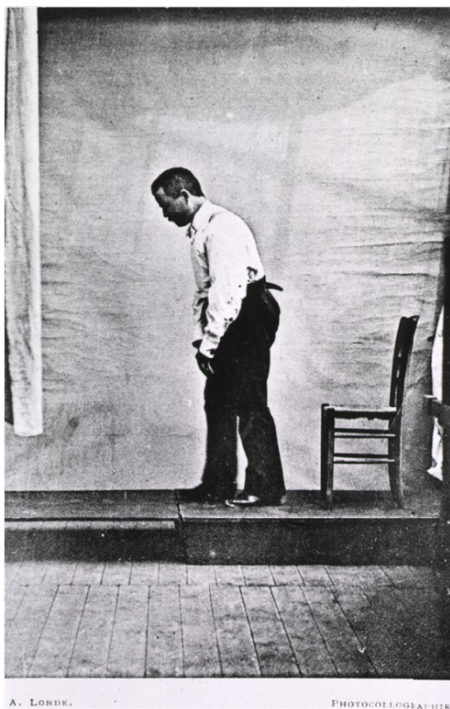


Рис.1. Нарушение походки пациента с диагностированной болезнью Паркинсона; источник: Nouvelle Iconographie de la Salpêtrière, vol. 5, 1892

Результаты клинических наблюдений позволяют выделить два основных подтипа БП. Первый из них – болезнь Паркинсона с преобладанием тремора и с относительным отсутствием других моторных симптомов. Второй подтип – болезнь Паркинсона с отсутствием тремора. Последний характеризуется акинетически-ригидными движениями (спастичностью) и постуральной неустойчивостью (нарушением равновесия). Этот подтип прогрессирует более быстрыми темпами и приводит к большей функциональной инвалидности, чем БП с преобладанием тремора [9]. Предполагается, что различные подтипы болезни Паркинсона имеют различную этиологию и патогенез [10].

Среди немоторных проявлений БП выделяют потерю обоняния, когнитивные нарушения, психиатрические отклонения, нарушение сна, а также вегетативную дисфункцию и утомляемость [11]. Эти симптомы проявляются на ранних стадиях развития болезни и снижают качество жизни пациента [12]. Зачастую немоторные проявления БП предшествуют двигательным нарушениям, возникающим на более поздних стадиях болезни [13]. Предполагается, что в этом случае патологические процессы, вызывающие БП, запускаются именно во время премоторной фазы. Этот период болезни называют продромальным (*греч. prodromes – предвестник*). Продромальный период является временным промежутком, в течение которого может быть назначена терапия, способная изменить течение болезни [14].

Доступная сегодня симптоматическая терапия БП в основном направлена на восстановление физиологических концентраций дофамина в мозгу. Во врачебной практике применяют агонисты дофаминовых рецепторов, предшественники дофамина (L-Диоксифенилаланин, или L-DOPA) и препараты, препятствующие обратному захвату и метаболизму дофамина [15, 16], тем самым увеличивая концентрацию нейромедиатора в синаптической щели. Однако по мере развития болезни возникают осложнения, которые не поддаются терапии и представляют собой серьезную проблему для качества жизни больного [17]. Так, на поздних стадиях БП в полной мере проявляются постуральная неустойчивость, замирание походки, эпизоды падения в связи с потерей равновесия, дисфагия (расстройство акта глотания) и речевая дисфункция. Вегетативные симптомы, такие как недержание мочи, запоры с необходимостью ежедневного приема слабительных препаратов и постуральная гипотензия (снижение артериального давления при принятии вертикального положения), являются немоторными признаками на поздних стадиях БП [17, 18]. На завершающей стадии болезни распространенным симптомом является деменция: она встречается у 83% пациентов, страдающих болезнью Паркинсона в течение 20 лет [18].

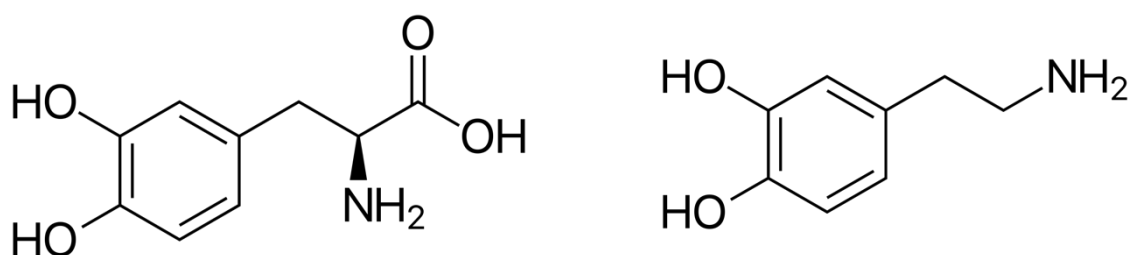


Рис.2. Химическая формула дофамина (справа) и его предшественника L-DOPA (слева);

источник: wikipedia.org

Многие клинические аспекты БП в настоящее время являются предметом исследований и дискуссий. Например, какие еще препараты могут быть более эффективными при симптоматической терапии? Какой диеты стоит придерживаться пациентам с диагностированной БП? Как замедлить прогрессирование заболевания? И, самое главное, как диагностировать и вылечить заболевание на ранних стадиях?

Обсуждение этих вопросов и более подробное описание клинической картины болезни Паркинсона с имеющимися на данный момент фактами можно почерпнуть в обзоре Bastiaan R Bloem, et al., 2021 [19].

Организация проекций черной субстанции в стриатум и их функции в норме и патологии

Черная субстанция представляет собой ядро среднего мозга, состоящее из двух слоев: компактного (pars compacta) и ретикулярного (pars reticulata). Эфферентные нейроны ретикулярного слоя являются ГАМКергическими. Они и обладают тормозным влиянием на ядра таламуса, хвостатое ядро и нейроны четверохолмия [20]. Компактный слой черной субстанции содержит преимущественно дофамин-продуцирующие (DA) нейроны, которые проецируются в стриатум. Эту систему проекций называют нигростриатным трактом.

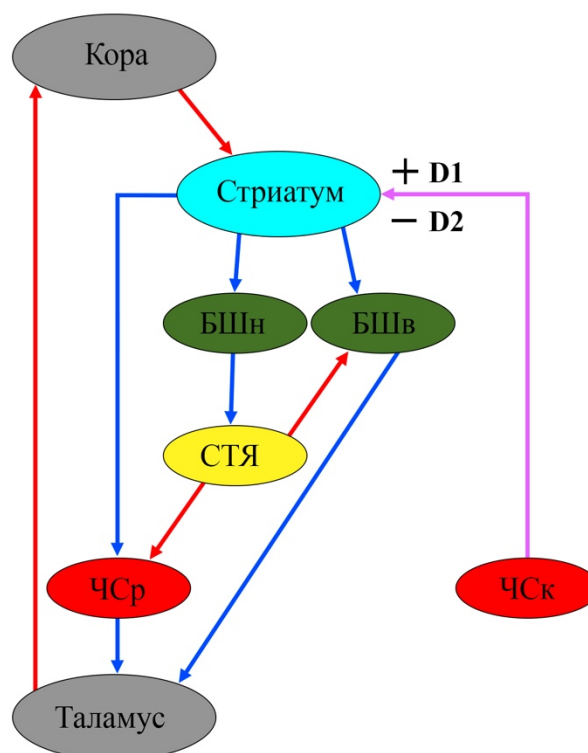


Рис.3. Схема связей базальных ядер. ЧСк – компактный слой черной субстанции; БШн – наружный и (БШв) внутренний сегменты бледного шара; СТЯ – субталамическое ядро; ЧСр – ретикулярный слой черной субстанции. Стрелки указывают возбуждающие (красные стрелки) и тормозные (синие стрелки) влияния отдельных ядер; фиолетовая стрелка – нигростриатный тракт, оказывающий возбуждающее (+) влияние на стриатум через D₁-рецепторы либо тормозное (-) через D₂-рецепторы.

Нигростриатный тракт участвует в подстройке **прямого** и **непрямого** путей запуска двигательных программ, реализуемых на уровне базальных ядер (Рис.3) [21]. Посредником модулирующего влияния нигростриатного тракта на систему базальных ядер является стриатум. Активность ГАМКергических нейронов стриатума поддерживается со стороны двигательной коры больших полушарий головного мозга и приводит к торможению нейронов бледного шара (БШн, БШв) и ретикулярного слоя черной субстанции (ЧСр). Подавление внутреннего сегмента бледного шара (БШв) и ЧСр снимает их ингибирующий эффект на таламус. Это вызывает возбуждение таламокортикальных путей и ведет к передаче сигналов двигательных нейронов в кору

головного мозга, запускает программу произвольного движения (wanted movement). Такой путь запуска движения называется **прямым**. Кроме того, стриатум оказывает тормозное влияние на наружный сегмент бледного шара (БШн), что способствует снятию его тормозного влияния на субталамическое ядро СТЯ (Рис.3). Это вызывает активацию возбуждающих влияний субталамического ядра на БШв и ЧСр. В результате возбуждения БШв и ЧСр оказывается тормозное влияние на таламус. Такой путь называется **непрямым**. По сравнению с прямым, он участвует в подавлении непроизвольных движений (unwanted movements). Таким образом, через прямой путь между моторной корой и базальными ядрами осуществляется положительная обратная связь, а через не прямой путь – отрицательная обратная связь. Проекция DA нейронов компактного слоя черной субстанции (ЧСк) в стриатум (Рис.3, фиолетовая стрелка) влияют на систему базальных ядер, оказывая модулирующее воздействие на двигательную программу. Связывание дофамина с D1-рецепторами ГАМКергических нейронов стриатума вызывает их возбуждение, результатом чего является стимуляция прямого пути активации движений. Связывание дофамина с D2-рецепторами ГАМКергических нейронов стриатума, наоборот, вызывает их торможение. В результате такого торможения работа системы базальных ядер оказывается направлена на подавление движений (обзор [22]).

Нарушение работы проекций компактного слоя черной субстанции в стриатум делает невозможным модулирующее влияние нигростриатного тракта на систему базальных ядер. В связи с этим, выбор программы движения может быть затруднен. Может возникать дискинезия. Действительно, нарушение работы проекций ЧСк в стриатум – важнейшее патологическое проявление БП, причиной которого может быть как уменьшение числа или гибель DA нейронов, так и различные нарушения работы их синаптических проекций в стриатум. Результаты исследований [23] показали, что потеря дофаминергических нейронов в ЧСк является причиной таких моторных проявлений БП, как брадикинезия и мышечная ригидность. Причем, гибель DA нейронов отмечают уже на ранней, премоторной фазе развития болезни [24]. Важно отметить, что гибель DA нейронов часто сопровождается нейродегенерацией и за пределами дофаминергической системы [25]. Нейродегенерацию обнаруживают в коре головного мозга, обонятельной луковице и вегетативной нервной системе. Дегенерация структур гиппокампа способствует деменции, наблюдаемой на поздних стадиях БП, особенно у пожилых людей.

Этиология БП

В большинстве случаев БП наблюдается прогрессирующая гибель DA нейронов. Характерным патологическим признаком при этом является появление в них внутриклеточных включений, называемых тельцами Леви (ТЛ), которые считаются одним из гистологических маркеров заболевания. Образование ТЛ обнаруживают в нейронах, использующих и другие медиаторы, однако погибают преимущественно дофаминергические нейроны. Причины этого до конца не выяснены. Следует отметить, что в некоторых случаях БП ТЛ отсутствуют [26].

Существует множество факторов, влияние которых ведет к гибели DA нейронов. Среди них выделяют патологии, связанные с нарушением метаболизма α -синуклеина, нарушение процессов аутофагии и протеасомной деградации, нейровоспаление, митохондриальную дисфункцию и окислительный стресс.

На данный момент обнаружен целый ряд генов, мутации в которых приводят к наследственной форме БП. Среди них выделяют ген α -синуклеина (*SNCA*), *LRRK2*, *UCHL1*, *DJ-1*, *ATP13A2*, *PINK1*, *Parkin*, *GBA1* и *VPS35* [27, 28]. Мутации гена α -синуклеина вызывают наследственные формы БП, способствуя образованию телец Леви. Такая патология вызывает серьезные повреждения ЧСк и двигательные нарушения у

грызунов [29]. Известно, что при одной из таких мутаций (A53T) нарушаются процессы аутофагии в ЦНС, что вызывает токсический эффект из-за накопления α -синуклеина [30].

Lrrk2 – это киназа, богатая лейциновыми повторами. Этот белок в своей структуре содержит домен, обладающий ГТФазной активностью, и генетические мутации, меняющие его активность, также связаны с БП [31]. В норме Lrrk2 стабилизирует морфологию митохондрий и участвует в аутофагии. Мутация *LRRK2* G2019S, например, вызывает изменение динамики митохондрий в глиальных клетках, а лизаты головного мозга таких грызунов демонстрируют более высокие уровни провоспалительных факторов TNF- α и Drp1, таким образом отражая влияние Lrrk2 на нейровоспаление [32]. Кроме того, мутация в *LRRK2* вызывает синаптическую дисфункцию в дофаминергических нейронах человека посредством фосфорилирования белка ауксиллина [33].

Гены *PINK1* и *Parkin* играют важную роль в контроле качества митохондрий. Этот процесс заключается в избирательном рекрутировании PINK1 к поврежденным митохондриям и последующей активации E3 убиквитин-лигазы Parkin для запуска аутофагии [34]. Мутации *PINK1* и *Parkin* нарушают этот процесс избирательной аутофагии при БП [35].

Мутации в гене белка вакуолярной сортировки *Vps35* также связывают с БП. *Vps35* регулирует сортировку белков между эндосомами и аппаратом Гольджи. Однако интересно то, что мутация D620N в *Vps35* вызывает фрагментацию и дисфункцию митохондрий за счет патологического взаимодействия с динамин-подобным белком (DLP1) [36].

Таким образом, влияние генетических мутаций на развитие БП показывает тесную связь нейродегенерации с митохондриальной дисфункцией и нарушением аутофагии. Важно добавить, что мутации, приводящие к БП, обнаружены не только в ядерной, но и митохондриальной ДНК [37, 38].

Митохондриальная дисфункция при БП

Гистологические исследования постмортальных препаратов головного мозга пациентов с БП выявили в нейронах компактного слоя черной субстанции признаки митохондриальной дисфункции. Действительно, признаки окислительного стресса, вызванного повышением внутриклеточных концентраций активных форм кислорода (АФК или ROS), часто обнаруживаются при болезни Паркинсона как посмертно, так и прижизненно [39, 40]. Основными центрами производства АФК в клетках млекопитающих являются митохондрии [41]. Появление АФК инициируется утечкой электронов, в первую очередь, в комплексе I электрон-транспортной цепи. Нарушение работы комплекса приводит к избытку электронов. Это влечет за собой более интенсивное восстановления молекулярного кислорода (O_2) до супероксид-радикала ($O_2^{\bullet-}$). В норме, супероксид-радикал подвергается превращению в пероксид водорода (H_2O_2) супероксиддисмутазой 2 и впоследствии расщепляется каталазой до H_2O и O_2 . Такая последовательность химических реакций обеспечивает гомеостаз активных форм кислорода и обеспечивает защиту клеток от окислительного стресса [42]. Однако избыток $O_2^{\bullet-}$ при митохондриальной дисфункции запускает иной каскад реакций, в результате которого образуются более нестабильные АФК, что влечет за собой окислительный стресс. Количественная оценка компонентов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий у больных БП показывает 34% утрату 8 кДа субъединицы комплекса I (НАДН-дегидрогеназы), в то время как другие комплексы ЭТЦ в головном мозге остаются неизменными [43]. Накопление АФК в связи с нарушением работы ЭТЦ митохондрий вызывает обширное повреждение клеточных компонентов, что является критическим для клеток организма, в том числе для дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона

[44]. Эти данные чётко указывают на связь митохондриальной дисфункции с патогенезом БП.

Динамика митохондрий также интенсивно исследуется в контексте болезни Паркинсона. Митохондрии подвергаются процессам слияния, деления и транспортировки. Клетки сортируют популяции поврежденных митохондрий и направляют их по пути митофагии – процесса селективного разрушения митохондрий в аутофагосомах [45]. Как было описано выше, митофагия регулируется активностью киназы PINK1 и E3 убиквитин-ликазы Parkin. Генетические мутации, вызывающие дисфункции этих ферментов, ведут к нарушениям в работе системы контроля качества митохондрий, что приводит к патологии [46].

Динамика митохондрий и митофагия являются взаимосвязанными процессами. Эта связь достигается за счет белков, участвующих в обоих процессах. Одним из таких связующих компонентов является белок митофузин 2 (Mfn2). Анализ последствий выключения гена, кодирующего Mfn2 в дофаминергических нейронах, на организацию митохондриального пула и структуру митохондрий и посвящена данная работа.

Функции Mfn2 в работе митохондрий

Митофузины (Mfn1 и Mfn2) – это белки, участвующие в процессе слияния внешних мембран митохондрий. Эти белки являются ГТФазами, которые дважды пронизывают внешнюю митохондриальную мембрану, причем N- и С- концы белка

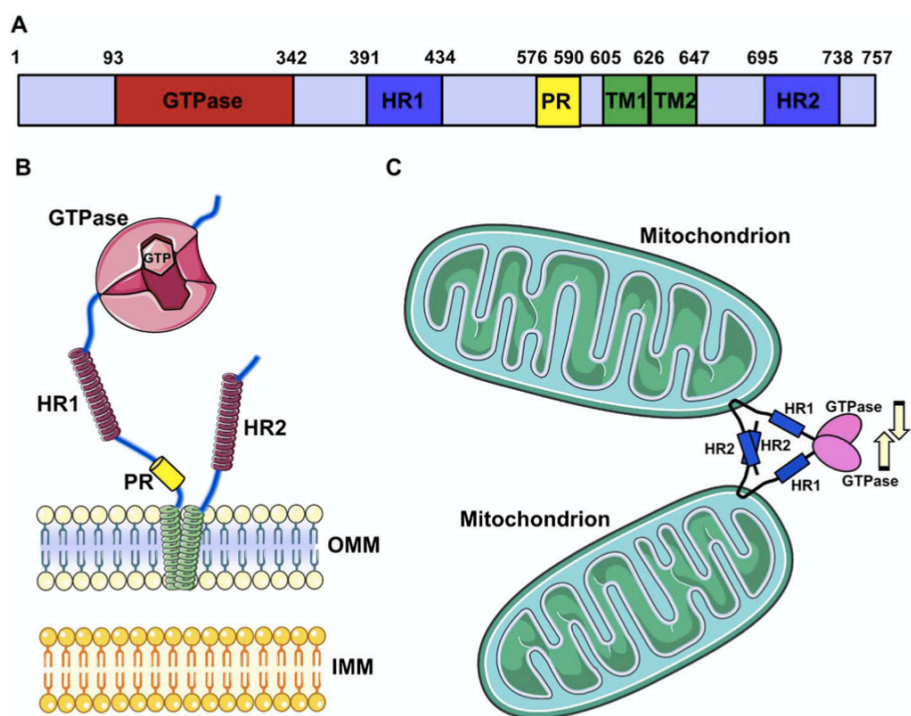


Рис.4. Структура Mfn2. А Линейная структура Mfn2. Стоит обратить внимание на большой N-концевой ГТФазный домен, за которым следует HR1 домен, пролин-богатая последовательность PR, два трансмембранных домена TM1/2 и С-концевой HR2 домен. Цифры указывают номера начальной и конечной аминокислоты соответствующих доменов. В Топология Mfn2, закреплённого во внешней митохондриальной мембране двумя трансмембранными доменами, (зеленые спирали). С Схема слияния митохондрий. Процесс опосредуется взаимодействием HR2 доменов митофузинов соседних органелл. Для завершения слияния необходим гидролиз ГТФ на ГТФазных доменах белка. HR1/2 – семичленный повтор; PR – пролин-богатая последовательность; TM1/2 – трансмембранный домен; OMM – наружная и (IMM) внутренняя митохондриальные мембраны.

Источник: Filadi, R., Pendin, D. & Pizzo, P. Mitofusin 2: from functions to disease. Cell Death Dis (2018)

обращены в цитоплазму [47]. Митофузины образуют как гомодимерные (Mfn1-Mfn1 или Mfn2-Mfn2), так и гетеродимерные (Mfn1-Mfn2) комплексы с белками соседних митохондрий [48-50]. Как только митофузины соседних митохондрий связываются, гидролиз ГТФ делает возможным слияние внешних мембран органелл [51]

Mfn1 и Mfn2 млекопитающих имеют схожие аминокислотные последовательности (на 80% идентичны у людей), и состоят из 737 и 757 аминокислот соответственно. Их структура включает большой цитоплазматический N-концевой домен, обладающий ГТФазной активностью; за ним по порядку следует первый спейсерный участок, HR1 домен, второй спейсерный участок, два трансмембранных домена (TM1/2), пронизывающих внешнюю мембрану митохондрий (ОММ), и третий спейсер (Рис.4). С-концевой участок молекулы содержит HR2 домен. Примечательно, что между доменами HR1 и TM находится пролин-богатая последовательность (PR), характерная только для Mfn2. Вероятно, этот участок отвечает за специфические взаимодействия с другими белками [52, 53].

Электронная микроскопия показала, что митофузины накапливаются в областях контакта между соседними митохондриями. Предполагается, что они участвуют в слиянии этих органелл [48, 52]. Хотя молекулярные механизмы, посредством которых Mfn осуществляет этот процесс, все еще не полностью раскрыты, известно, что митофузины двух соседних митохондрий физически взаимодействуют путем образования антипараллельных димеров между их HR2 доменами [53]. Однако это взаимодействие, которое связывает две митохондрии, является недостаточным для завершения процесса слияния. Имеющиеся на данный момент сведения позволяют утверждать, что димеризация ГТФазных доменов Mfn соседних митохондрий (Рис.4) является критически важной для завершения слияния, поскольку при гидролизе ГТФ конформационное изменение (power stroke) именно димерной конструкции сближает мембраны органелл до критического расстояния [54].

В дополнение к бесспорной роли митофузинов в митохондриальном слиянии, Mfn2, как полагают, является ключевым компонентом в регуляции контактов митохондрий с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР). Хотя его точная функция во взаимодействии между органеллами все еще остается предметом дискуссий, существуют исследования, подтверждающие участие Mfn2 в этом процессе. В отличие от Mfn1, небольшая фракция Mfn2 обнаруживается на мембранах ЭР, особенно на мембранах, ассоциированных с митохондриями (МАМ), то есть в областях ЭР, расположенных рядом с внешней мембраной митохондрий [55]. Основываясь на его функции в слиянии соседних митохондрий, Mfn2, как предполагается, опосредует связывание ЭР и митохондрий [56]. После этого исследования было показано, что несколько процессов, которые, как известно, регулируются или происходят непосредственно в зоне МАМ, такие как образование аутофагосом, модулируются Mfn2 [57, 58].

Функции Mfn2 не ограничиваются мембранными процессами. Mfn2 является ключевым участником запуска PINK1-Parkin индуцируемой митофагии. Кроме того, Mfn2 необходим для аксонального транспорта митохондрий: его взаимодействие с Miro/Milton комплексом (молекулярный комплекс, связывающий митохондрии с моторными белками – кинезинами) регулирует транспорт митохондрий [59]. Таким образом, хотя данная работа сфокусирована на исследовании морфологии митохондрий при условном нокауте Mfn2, существует множество других характеристик митохондриальной системы, на которые может повлиять выключение этого гена.

Связь Mfn2 с БП

Приведенные выше данные ясно свидетельствуют о том, что Mfn2 необходим для нормальной работы DA нейронов черной субстанции [60], а митохондриальная дисфункция – один из ключевых аспектов, связанных с БП. Мутации в двух

митохондриальных генах, *PINK1* и *Parkin*, являются причиной болезни Паркинсона, связывая митохондриальную дисфункцию с этим заболеванием [61, 62]. Показано, что *Mfn2* является ключевой мишенью для убиквитин-лигазы *Parkin* [63]. При этом, *Parkin* также опосредует экспрессию *PGC-1 α* [64], который, в свою очередь, контролирует экспрессию *Mfn2* при стрессовых условиях [65]. В связи с этим было предположено, что в нормальных условиях *Parkin* защищает дофаминергические нейроны, способствуя митохондриальному гомеостазу через *PGC-1 α* [66]. Кроме того, *Mfn2* участвует в функционировании белка вакуолярной сортировки *Vps35*, мутации которого связаны с БП [67, 68]. Делеция гена *Vps35* у мышей вызывает фрагментацию митохондрий в результате повышенной активности митохондриальной убиквитин-лигазы и, как следствие, деградации *Mfn2* [69]. Важно отметить, что стабилизация уровня *Mfn2* в модели нарушения функции *Vps35* может предотвратить гибель дофаминергических нейронов [69].

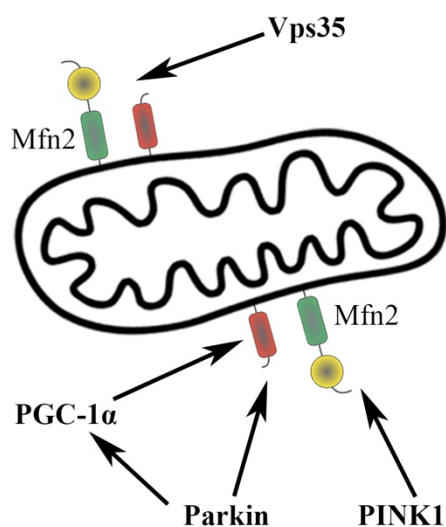


Рис.5. Связь БП-ассоциированных белков с *Mfn2*.

Хотя эти данные обеспечивают значительную связь между регуляцией *Mfn2* и БП, непосредственный причинный вклад *Mfn2* в развитие этой патологии до настоящего времени остается неясным. Для того, чтобы исследовать этот вопрос, была создана генетическая модельная система на мышах, в которой выключение гена *Mfn2* может вызываться селективно в дофаминергических нейронах у животных со сформированными проекциями DA нейронов черной субстанции в стриатум.

Целью работы являлось исследовать последовательные структурные изменения в митохондриях дофаминергических нейронов черной субстанции при выключении гена *Mfn2*.

Материалы и методы исследования

В ходе исследования были поставлены **задачи**:

1. С помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) сравнить морфологию митохондриальных мембран контрольных мышей с мышами с условным нокаутом гена *Mfn2* в DA нейронах черной субстанции через 3, 6 и 9 недель после выключения гена.

2. Методом фокусируемого ионного пучка – сканирующего микроскопа (ФИП-СЭМ) выполнить трехмерную реконструкцию митохондрий и сравнить их форму и объём у контрольных и нокаутных мышей на ранних этапах после выключения гена *Mfn2*.

Модельная система

Для создания модельной системы использовали метод тамоксифен-индуцируемой Cre-*loxP* рекомбинации. Суть Cre-*loxP* рекомбинации заключается в инактивации гена, фланкированного с двух сторон *loxP* сайтами, Cre-рекомбиназой (Рис. 6).

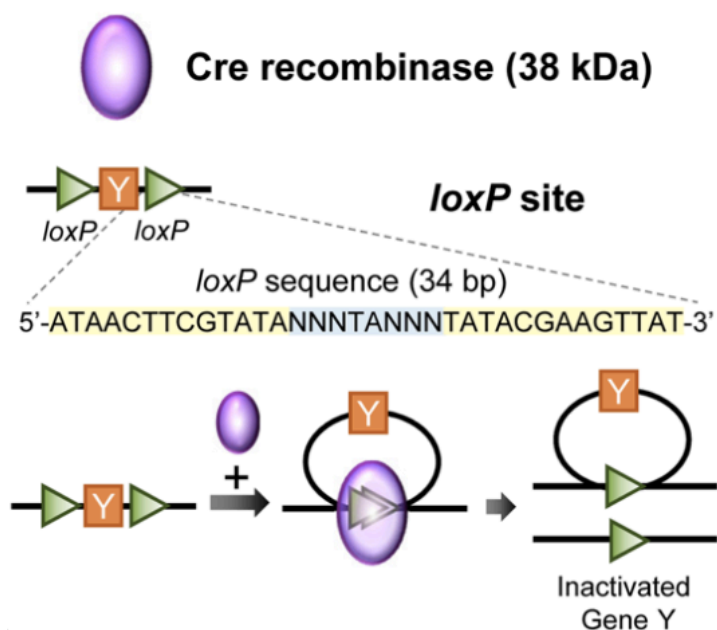


Рис.6. Механизм Cre-*loxP* рекомбинации. Cre-рекомбиназа распознает *loxP* сайты, фланкирующие ген интереса (Y, в работе – ген *Mfn2*), и осуществляет его инактивацию.

Источник: Kim, Hyeonhui et al. “Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes.” *Laboratory animal research* vol. 34,4 (2018)

Для создания мутантных мышей с **пространственно-временным контролем экспрессии** гена интереса необходимы два элемента [70]. Сперва, посредством рекомбинации искусственной бактериальной хромосомы (BAC-recombineering) создается линия животных, экспрессирующая фермент Cre-рекомбиназу. У полученных животных контроль экспрессии Cre-рекомбиназы осуществляется промотором, который является специфическим для интересующего типа клеток. В данной работе были использованы животные, полученные путем трансгенеза BAC-конструкцией, включающей ген *Cre* и ген *DAT*. В такой системе контроль экспрессии Cre-рекомбиназы осуществлялся промотором гена *DAT*, кодирующего DA транспортер дофаминергических нейронов[71]. Таким образом, экспрессия Cre-рекомбиназы в данной системе осуществлялась только в DA нейронах мыши, то есть осуществлялся **пространственный контроль экспрессии**.

Во-вторых, в нашей работе в качестве «Cre-линии» были использованы мыши, экспрессирующие конструкцию, позволяющую запускать процесс рекомбинации в DA нейронах при введении тамоксифена, т.е. осуществлялся не только пространственный, но

и **временной** контроль выключения гена. Это было достигнуто за счет конъюгации Cre с эстрогеновым рецептором, содержащим мутантный лиганд-связывающий домен (LBD) [72]. В этом случае, получаемый конъюгированный белок называется Cre-рекомбиназой, индуцируемой тамоксифеном (CreERT2). При экспрессии этот белок присутствует в цитоплазме в форме, связанной с белком теплового шока 90 (HSP90). После введения тамоксифена, он метаболизируется в нейронах в 4-гидрокситамоксифен, который затем, конкурируя с HSP90, связывается с эстрогеновым рецептором и приводит к транслокации CreER2 в ядро (Рис.7). При наличии гена, фланкированного сайтами *loxP*, фермент взаимодействует с сайтами *loxP* и вызывает последующую инактивацию гена. Для того чтобы ввести такой фланкированный ген в геном, нужно скрестить мышей *Dat-creERT2* со второй линией, у которой имеется ген, фланкированный *loxP*-сайтами. В данном случае, у второй линии был фланкирован ген *Mfn2*. В результате скрещивания и была получена модель с условным нокаутом гена *Mfn2*.

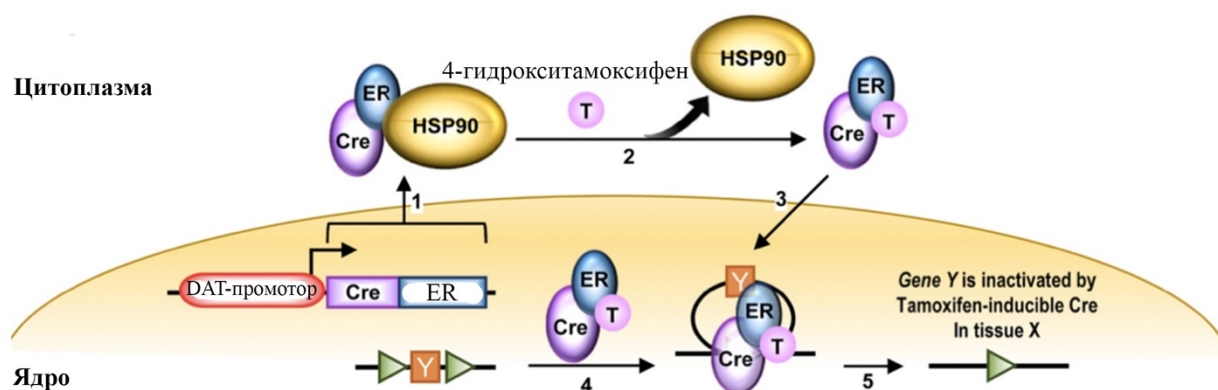


Рис.7. Тамоксифен-индуцируемая Cre-loxP рекомбинация. (1) Экспрессия Cre-рекомбиназы, конъюгированной с мутантной формой рецептора эстрогена (ER), контролируется тканеспецифичным DAT-промотором; рекомбиназа находится в цитоплазме в комплексе с белком теплового шока 90 (HSP90). (2) Связывание 4-гидрокситамоксифена (Т) с Cre-комплексом в цитоплазме вызывает снятие HSP90 с рецепторной (ER) части конструкции. (3) Взаимодействие 4-гидрокситамоксифена с Cre-комплексом вызывает его перемещение в ядро. (4) В ядре Cre-рекомбиназа распознает *loxP* сайты. (5) Инактивация гена интереса Y (в работе – ген *Mfn2*).

Модифицировано из: Kim, Hyeonhui et al. “Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes.” Laboratory animal research vol. 34,4 (2018)

Обобщая и конкретизируя вышесказанное, для создания такой модели были созданы мыши, в которых нарушение *Mfn2* может происходить уже в сформированной дофаминергической системе при введении тамоксифена (*iMfn2^{DA}*). Они были получены путем скрещивания мышей, гомозиготных по аллелю *Mfn2*, фланкированному *loxP* (*Mfn2^{loxP/loxP}*), и гетерозиготных по аллелю, экспрессирующему под контролем DAT-промотора модифицированную конструкцию CreERT2 (+ / *Dat-creERT2*). CreERT2 обладает большей стабильностью по сравнению с CreERT. Полученное потомство скрещивали с *Mfn2^{loxP/loxP}*-мышами и получили расщепление на *iMfn2^{DA}*-мышей (*Mfn2^{loxP/loxP}*; + / *Dat-creERT2*) и контрольных мышей (*Mfn2^{loxP/loxP}*; +/+ или *Mfn2^{+/+}*; +/*DATcreERT2*). Для активации Cre-loxP рекомбинации *iMfn2^{DA}*-мышам в возрасте 5-7 недель внутрибрюшинно вводили 2 мг тамоксифена (Sigma T5648, растворенного в этаноле и подсолнечном масле) в течение пяти дней подряд. Исследование проводили на контрольных и нокаутных мышях через 3, 6 и 9 недель после последней инъекции. Все животные принадлежали лабораторному штамму C57BL/6N.

Трансмиссионная электронная микроскопия

Мышей ($n = 3$ для контроля и нокаута для каждого срока) перфузировали раствором параформальдегида 4% и глутаральдегида 0,1% (Merck) в 0,1 М фосфатном буфере PBS (рН 7.4) через 3, 6 и 9 недель после инъекции тамоксифена. Мозг выделяли и фиксировали в течение 4 часов при 4 ° С в том же фиксаторе, промывали в PBS и делали срезы 100 мкм на вибраторе (Leica, Германия). Срезы инкубировали в растворе 0,1 М PBS с добавлением 0,1% Triton X-100 и 10% ослиной сыворотки в течение 1 часа при комнатной температуре, инкубировали с первичными кроличьими антителами против тирозингидроксилазы ТГ (1: 1000, Pel-Freeze) в PBS в течение 8 часов и вторичными ослиными антителами против кроличьих антител, конъюгированными с биотином (1: 200, Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 4 часов. Локализацию вторичных антител определяли с использованием наборов Vectastain ABC и диаминобензидина DAB (Vector Laboratories). Такой подход позволил выявить на срезах DA нейроны, поскольку окисление DAB происходило только в местах связывания антител с ТГ, т.е. только в DA нейронах (Рис.8).

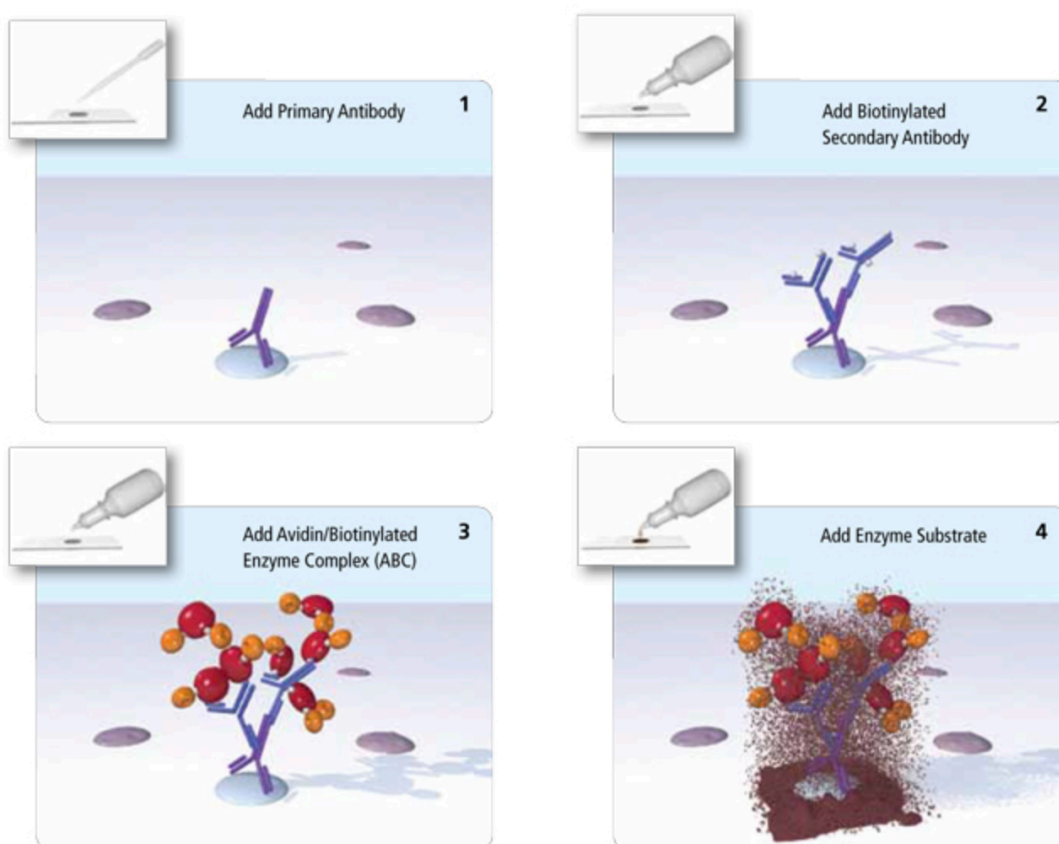


Рис.8. Принцип выявления селективного маркера клеток. Препарат инкубируют с первичными антителами к селективному маркеру клеток (для DA нейронов – тирозингидроксилаза); впоследствии препарат инкубируют со вторичными биотинилированными антителами; конъюгация вторичных антител с комплексом ABC и последующее добавление DAB дает возможность обнаружить селективный маркер клеток по цветному продукту окислительной реакции.

Срезы с DA нейронами были дополнительно фиксированы в 3% глутаральдегиде и 1% тетраоксиде осмия. Для обезвоживания материал был последовательно проведен через серию спиртов возрастающих концентраций 30%, 50%, 70%, 95% (инкубация в каждом растворе по 10 мин), через смесь спирт:ацетон в соотношении 1:1 (инкубация два раза по 5 мин), через обезвоженный ацетон 2 раза по 5 мин. Для заключения в эпоксидную смолу Durcupan ACM (Fluka) материал был проведен через серию разведений смолы в ацетоне

10%, 30%, 50%, 70%, 100%. Полимеризацию блока проводили при 50°C. Фиксацию и заключение материала проводили в виварии Каролинского Института (Швеция).

Серийные ультратонкие (70 нм) срезы изготавливали алмазным ножом (Diatome) на ультратоме Leica UCT в ресурсном центре СПбГУ. Ультратонкие срезы собирали на покрытые формваром медные сетки, контрастировали 1% ацетатом урана и цитратом свинца и исследовали на электронных микроскопах (Рис.9) Теснаі 12 (FEI), оборудованном камерой ТемСам-F224HD, в Каролинском Институте (Швеция), и JEM-1400 (Jeol), оборудованном камерой Olympus-SIS Veleta, в СПбГУ (Россия) (Рис.9).

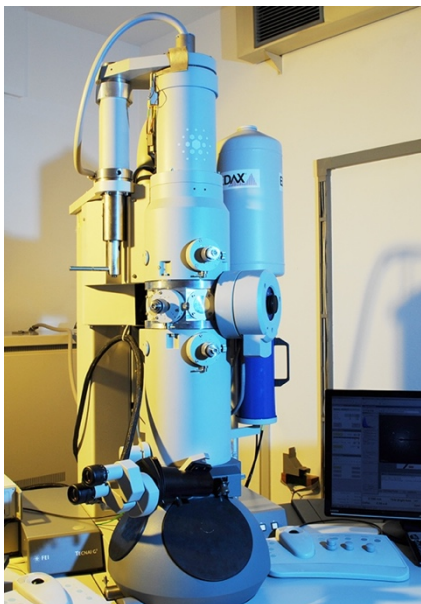


Рис.9. Трансмиссионные электронные микроскопы. Теснаі 12 (слева) и JEM-1400 (справа);

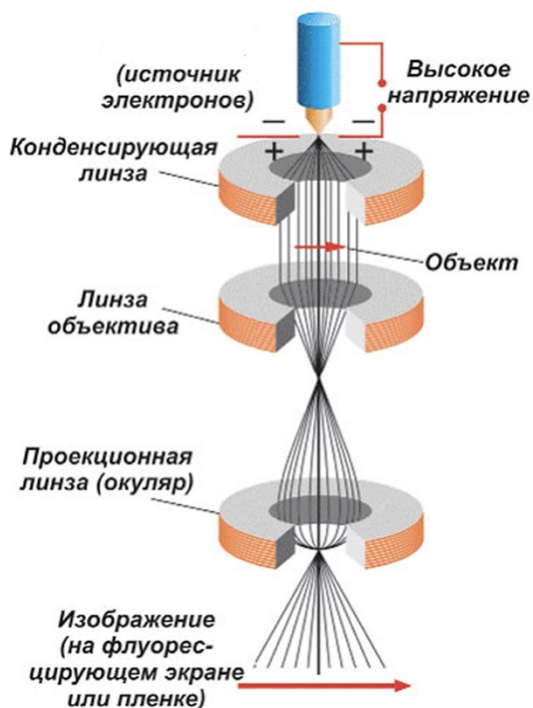


Рис.10. Принцип ТЭМ. Пучок электронов направляется конденсирующей линзой на объект, проходя через него. Прошедшие через объект электроны собираются линзами объектива и фокусируются проекционной линзой на экран. Полученное изображение можно получить в цифровом виде при помощи камеры высокого разрешения (на рисунке не показано).

Суть метода трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) заключается в том, что генерируемый под высоким напряжением электронный пучок просвечивает образец, и неоднородное поглощение электронов разными участками образца (электронноплотными и электроносветлыми) дает двумерную картину распределения плотности прошедшего электронного потока. Прошедший через образец поток электронов затем фокусируется на регистрирующей поверхности магнитными электронными линзами в увеличенном размере (Рис. 10). Этот метод позволил получить изображения дофаминергических нейронов с четко различимыми органеллами, в том числе, разрешающая способность метода позволила исследовать морфологию митохондриальных мембран.

ФИП-СЭМ микроскопия

Для получения больших серий срезов DA нейронов без смещения с целью трехмерной реконструкции митохондрий те же самые блоки с заключенным материалом исследовали с помощью метода фокусируемого ионного пучка – сканирующего микроскопа (ФИП-СЭМ). Эта методика позволяет получить серию срезов с минимальным шагом до 5 нм. Пошаговая зачистка поверхности производится с помощью фокусируемого ионного пучка (ФИПа). В качестве источника ионов используется галлий (Рис. 11), который после ускорения электрическим полем и фокусирования электростатической линзой сталкивается с образцом. Кинетической энергии такого ФИПа достаточно, чтобы выбивать атомы материала из образца. Количество материала, срезанного ФИПом, регулируется интенсивностью пучка.

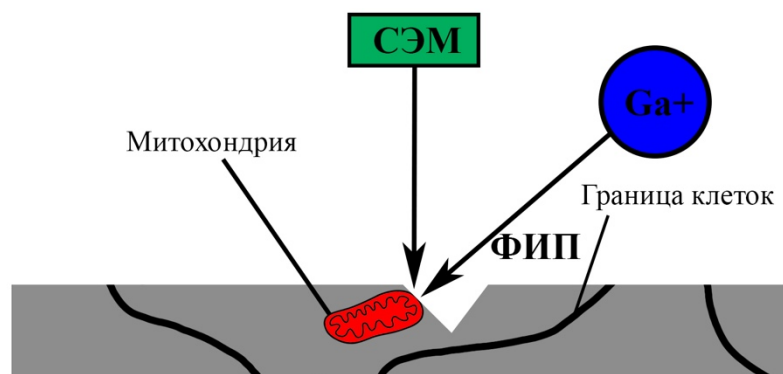


Рис.11. Принцип работы ФИП-СЭМ

Ионным пучком изготавливали углубление (Рис.13.1, красная стрелка) с края от меченной клетки. Поверхность этого углубления использовалась для получения серийных изображений сканирующим электронным микроскопом (СЭМ) после пошаговой зачистки поверхности с ФИПом (Рис. 13.2). Поверхность блока покрывается серебряной краской Conductive Silver Paint (Ted Pella) для исключения появления статического заряда. Таким образом, наличие двух компонентов – ФИП и СЭМ, позволяет получить большое число срезов без смещения, что является критически важным для трехмерной реконструкции.

В работе использовали ФИП-СЭМ Aquilos 2 Cryo-FIB (Thermo Fisher Scientific) (Рис. 12). Серии изображений DA нейронов были получены с шагом в 20 нм. Сбор изображений проводился в Каролинском Институте (Швеция) в рамках программы сотрудничества между КИ и СПбГУ. Связь при сборе данных осуществлялась с помощью программы Zoom.

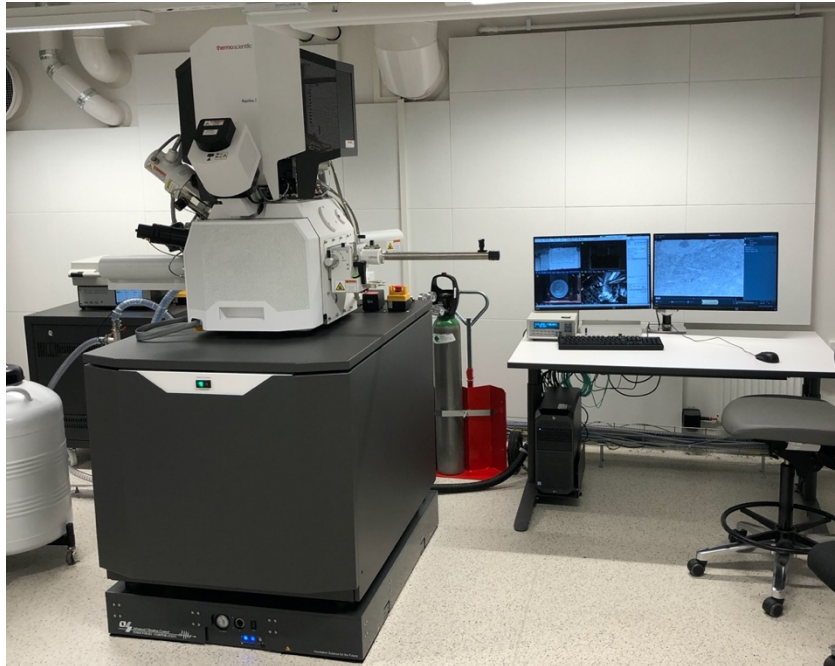


Рис.12. ФИП-СЭМ установка Aquilos 2 Cryo-FIB

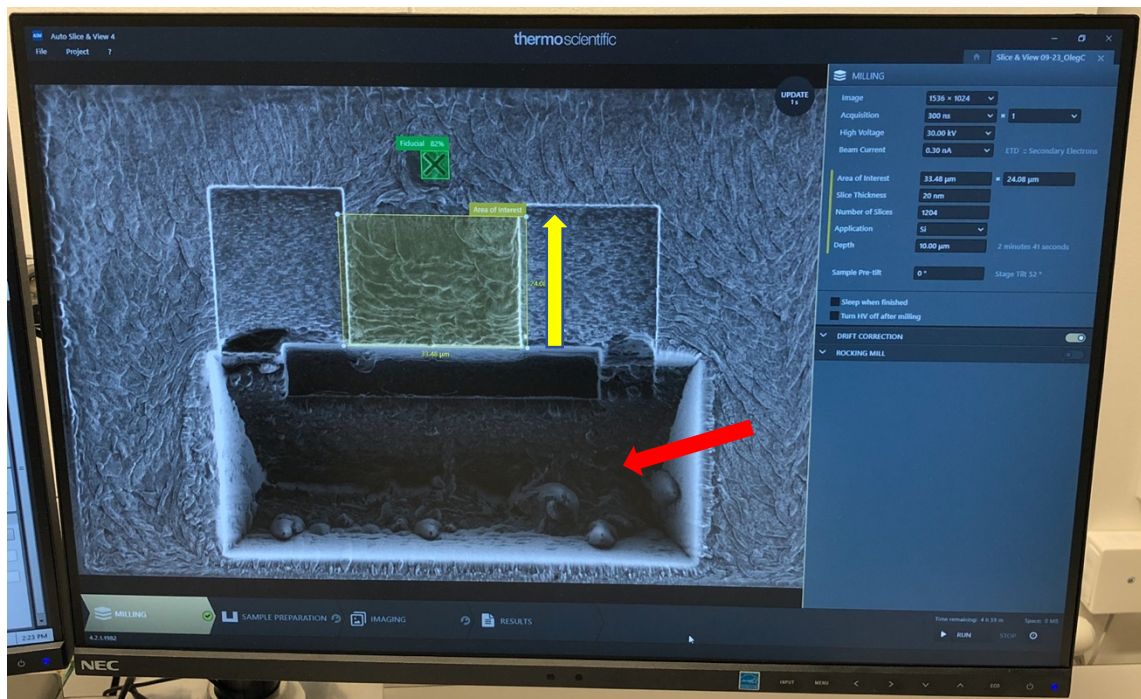


Рис.13.1. Процесс получения срезов. Вид сверху; желтым выделена область резки материала, желтая стрелка отражает направление вектора нарезания материала ФИПом; красная стрелка указывает на углубление.

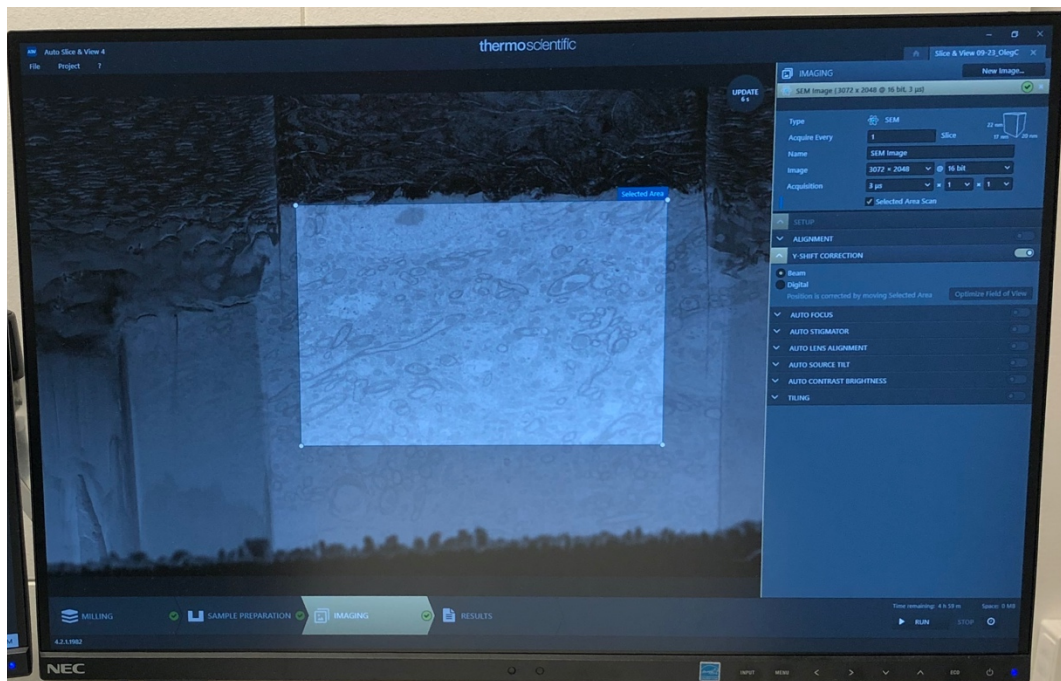


Рис.13.2. Изображение одного из срезов, полученное методом ФИП-СЭМ.

Трехмерная реконструкция и статистический анализ

После получения серийных изображений ДА нейронов нокаутных и контрольных мышей, в СПбГУ проводилась 3D-реконструкция и анализ изображений с помощью ПО Thermo Scientific Amira (2019.1). Статистическая обработка проводилась в программе GraphPad Prism v8.

Результаты

На ранних стадиях после инактивации *Mfn2* изменяется форма митохондрий

Чтобы выяснить, каким образом выключение гена *Mfn2* влияет на структуру митохондрий на ранних этапах, были проанализированы электронные микрофотографии срезов ДА нейронов нокаутных и контрольных мышей через 3 недели после инъекции тамоксифена. Оказалось, что спустя 3 недели после выключения *Mfn2* профили митохондрий на срезах имели форму сферы или эллипса (Рис. 14 а). По сравнению с нокаутом, многие профили митохондрий у контрольных мышей имели вытянутую форму (Рис. 14 б, в).

Чтобы детально исследовать форму митохондрий и определить их объем, цифровые изображения срезов ДА нейронов, полученные методом ФИП-СЭМ, подвергались обработке в программе *Amira* (Thermo Scientific). Для сбора данных в цитоплазме 3х нейронов было случайно выделено (Рис.15.1) по три области для реконструкций (объем выборки для *iMfn2^{DA}* $3 \times 10 = 30$; для контроля $3 \times 10 = 30$). Изображения митохондрий были загружены в программу, и было установлено их разрешение. Затем, после применения шумоподавляющих фильтров, серии снимков получали необходимый контраст, при котором границы достаточно четко различимы для последующего анализа (Рис.15.2). При помощи инструмента «Segmentation» была послойно реконструирована (Рис. 15.3) каждая из митохондрий. Инструмент «Meshing» позволил провести рендеринг поверхности митохондрий по серии послойных реконструкций (Рис. 15.4). Оказалось, что митохондрии ДА нейронов мышей через 3 недели после выключения гена *Mfn2* принимают форму эллипса (Рис.14, г). При этом митохондрии контрольных животных имеют более вытянутую форму (Рис.14, д). Чтобы ответить на вопрос, повлияло ли выключение гена *Mfn2* только на форму органелл, или на

ранних стадиях после нокаута наблюдается также нарушение процесса слияния митохондрий, мы провели анализ реконструкций органелл и определили их объем.

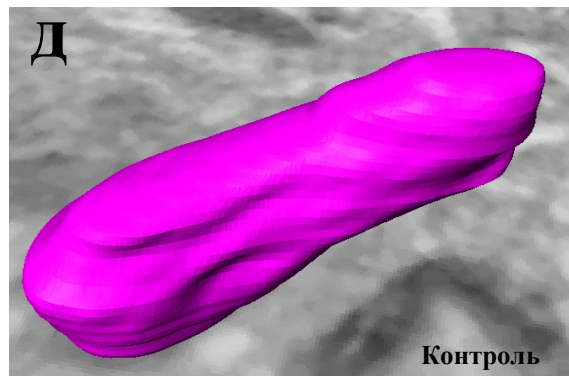
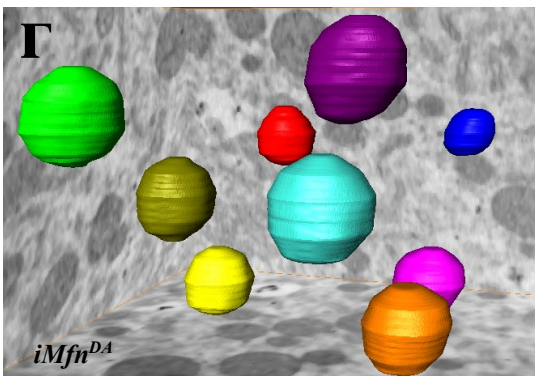
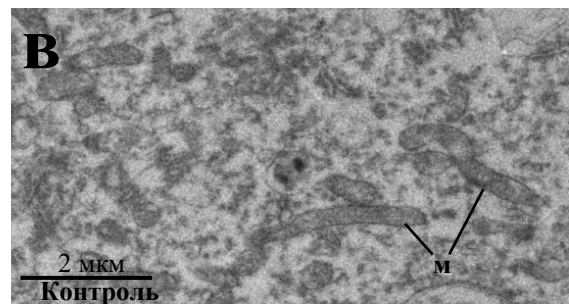
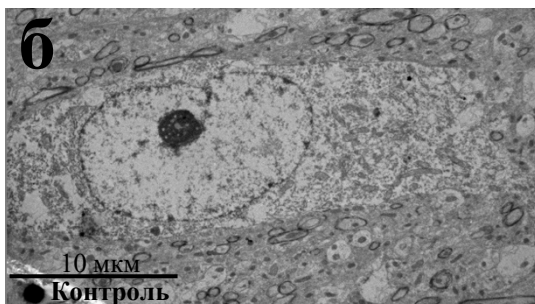
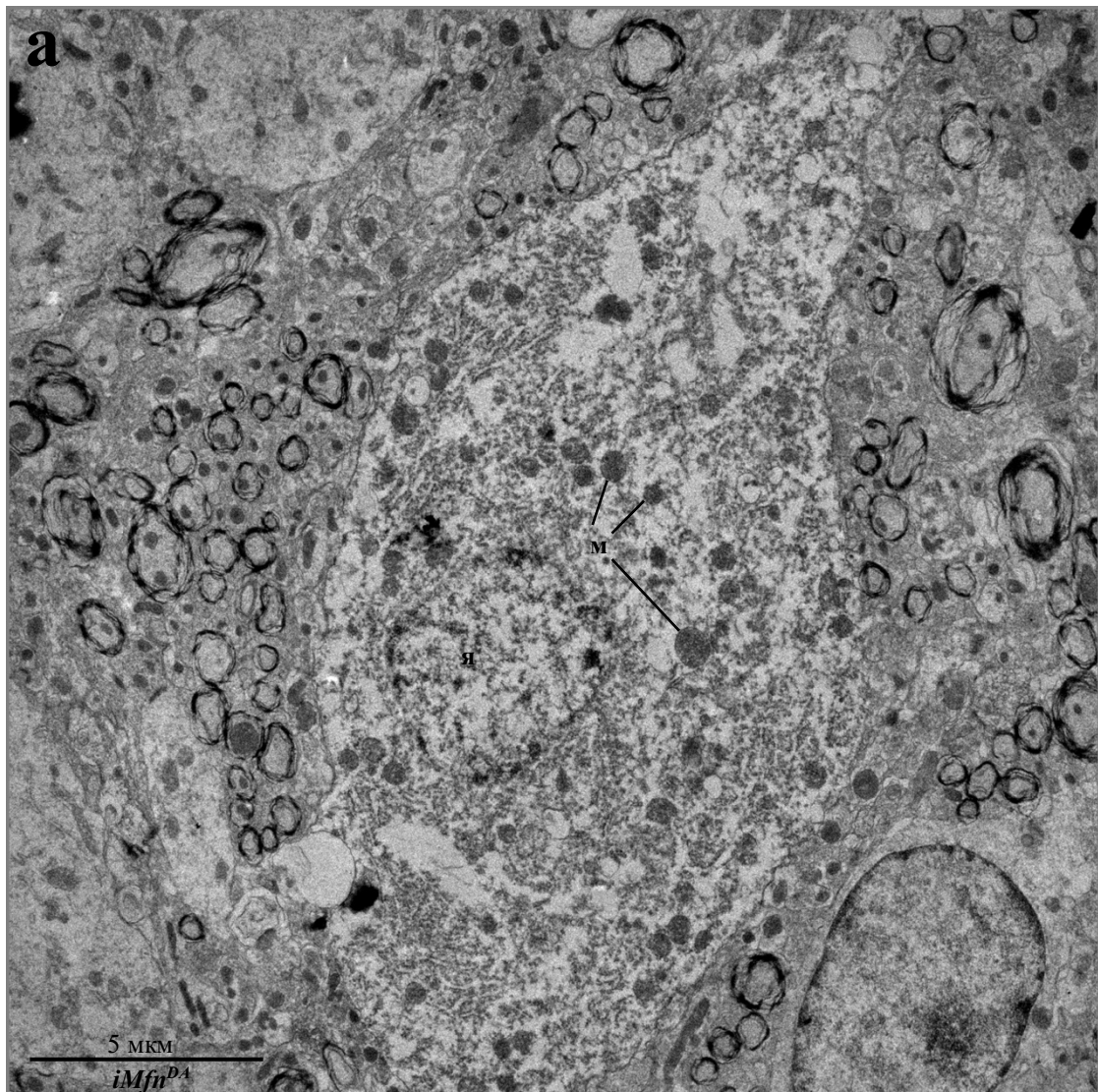


Рис.14. Выключение гена *Mfn2* вызывает изменение формы митохондрий на ранних стадиях. а – ТЭМ-микрофотография DA нейрона мыши (крупная клетка по центру) через 3 недели после выключения гена *Mfn2*; в цитоплазме отмечается наличие электроноплотных митохондрий округлой формы. б,в – микрофоторгафии DA нейронов контроля; стоит обратить внимание на митохондрии вытянутой формы (в). 3D-реконструкции митохондрий DA нейронов нокаутных (г) и контрольных (д) мышей (объемы показанных органелл см. рис 17,18); м – митохондрия, я – ядро.

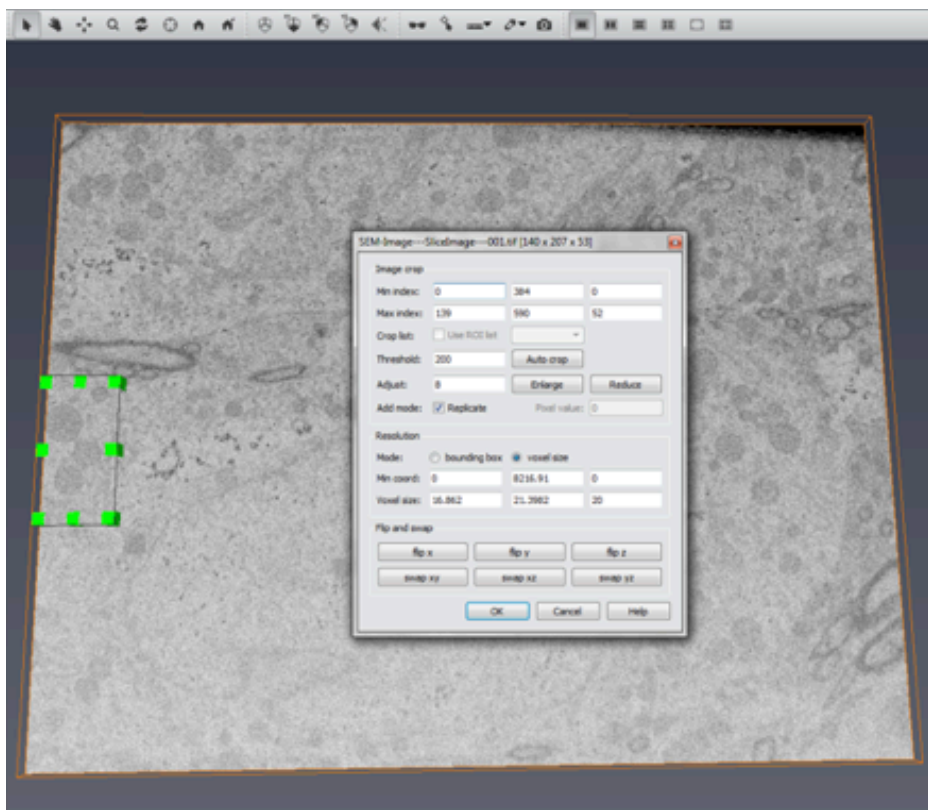


Рис.15.1. Выбор и обрезка интересующей области на препарате.

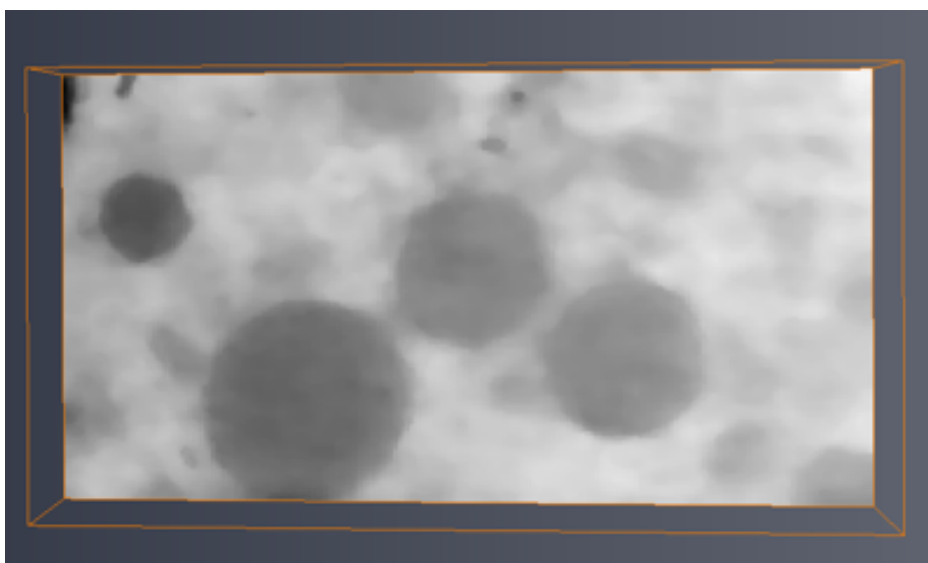


Рис.15.2. Профили митохондрий после обрезки и нейтрализации шумов.

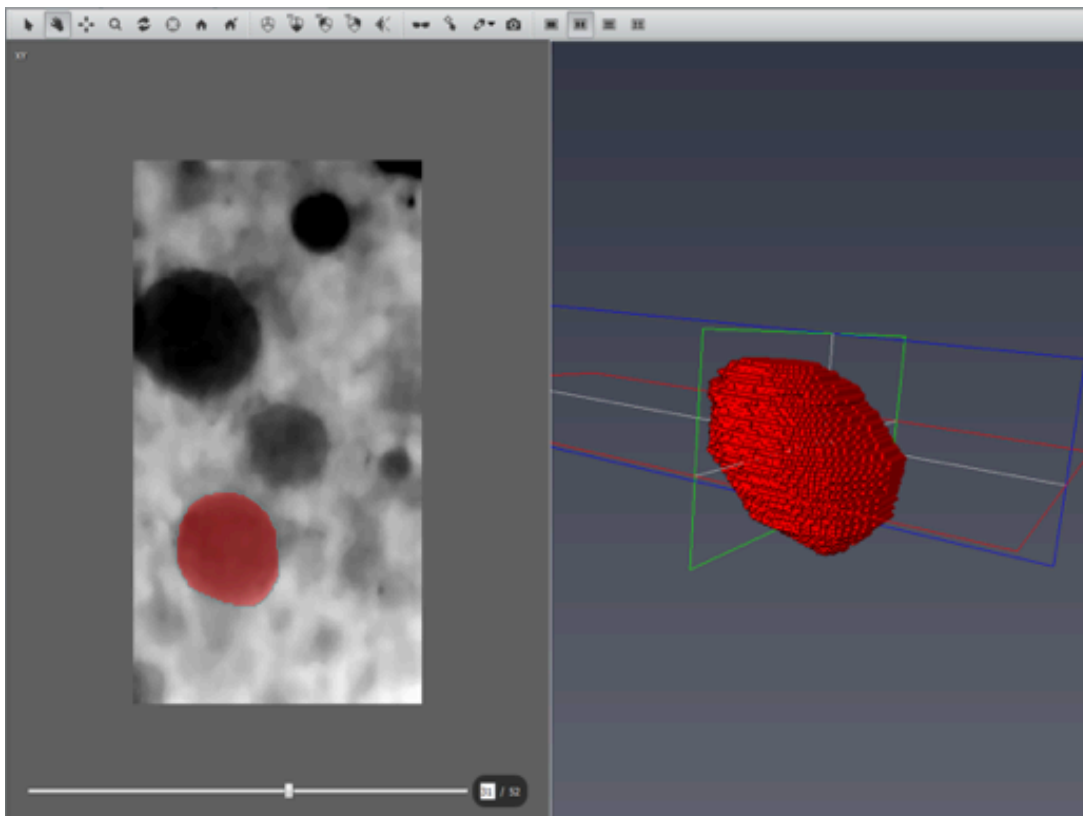


Рис.15.3. Послойная реконструкция митохондрии. Изображение среза (слева); красным цветом вручную заполнен участок изображения, соответствующий профилю митохондрии на срезе. Послойная объемная реконструкция митохондрии (справа).

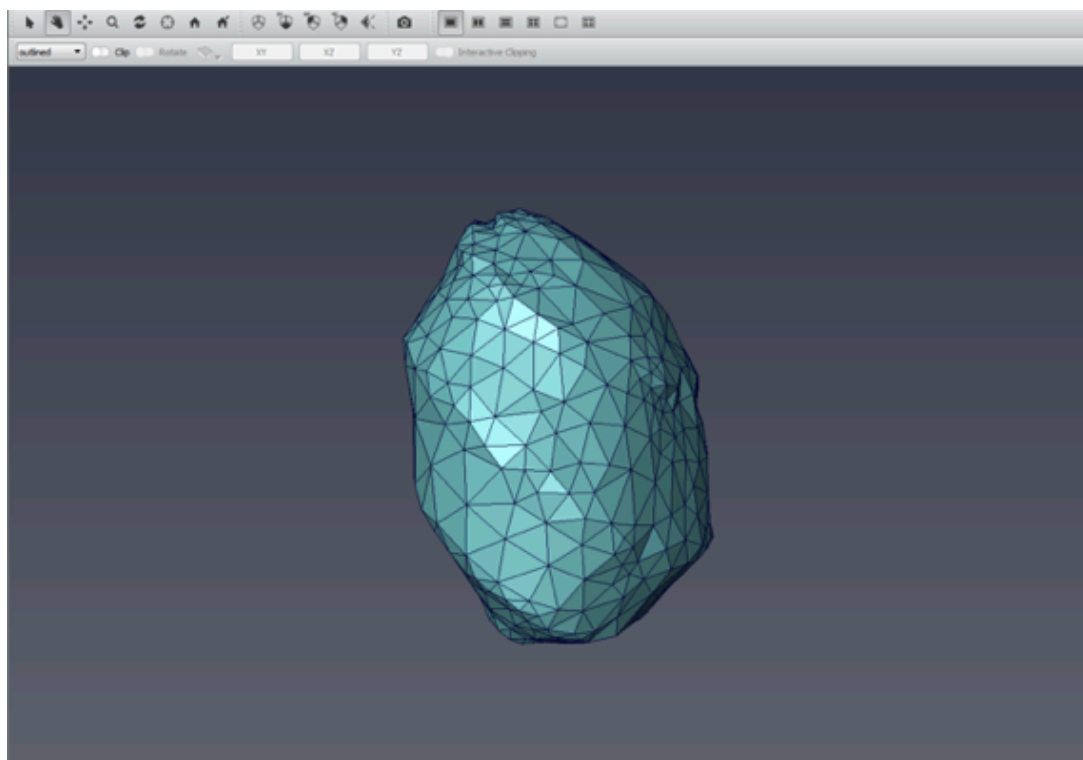


Рис.15.4. Рендеринг (расчет поверхности) на основе послойной модели.

Объемы митохондрий были высчитаны в соответствии с их реконструированной морфологией в ПО Amira при помощи функции «Material statistics». Был получен средний объем митохондрий в DA нейронах нокаутных (*iMfn2^{DA}*) и контрольных мышей. Средний объем органелл составил 0,42 мкм³ для контроля и 0,33 мкм³ для нокаута. Средние значения статистически сравнивали при помощи t-критерия Уэлча (Welch's test). Различия средних значений объемов митохондрий не оказались статистически достоверными (Рис.16, а). Однако сравнение меры разброса (дисперсий) объемов митохондрий в пределах двух выборок дало статистически достоверный результат ($p=0,0002$). Полученные данные (Рис.16, б) показывают, что объемы митохондрий контрольной линии мышей характеризуются большим разбросом, в 20% случаев превышая средний объем митохондрий нокаутной линии в 2 раза и более. То есть в выборке *iMfn2^{DA}* отсутствуют митохондрии объемом больше 0,77 мкм³.

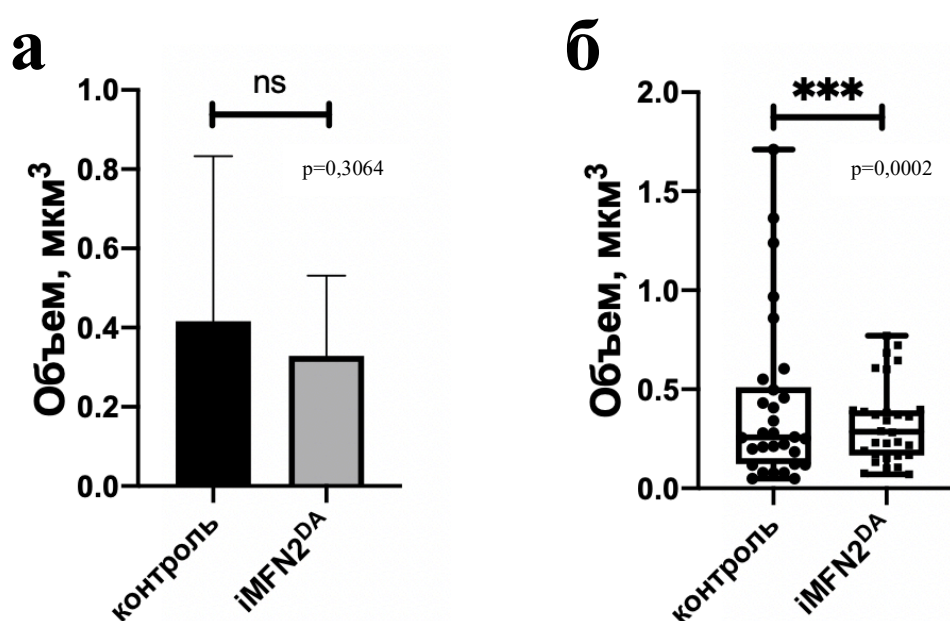


Рис. 16. Сравнение объемов митохондрий DA нейронов контрольной и нокаутной линии. а – столбчатая диаграмма, отражающая средний объем митохондрий контрольной и нокаутной линии; стоит обратить внимание на высокое значение стандартного отклонения у контрольных мышей. б – диаграмма разброса значений объемов митохондрий у контрольной и нокаутной линии.

Для наглядного представления разнообразия объемов митохондрий было выделено несколько трехмерных моделей органелл у контроля (Рис.17) и нокаута (Рис.18). Многие митохондрии DA нейронов контрольной линии обладают вытянутой формой, объем которых превышает среднее значение нокаута.

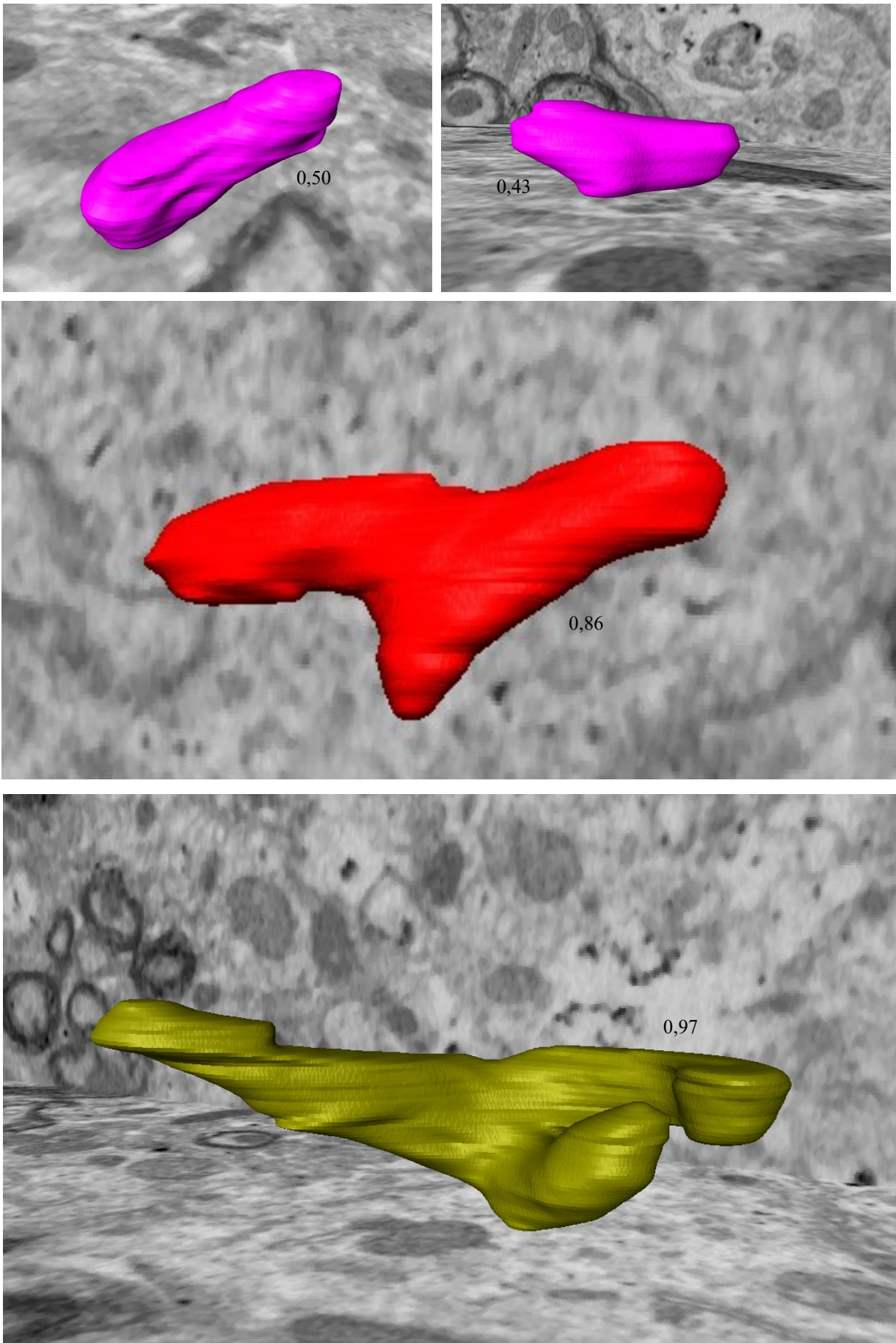


Рис.17. 3D реконструкции митохондрий DA нейронов контрольной линии; объем митохондрий в μm^3 показан на рисунках рядом с органеллами.

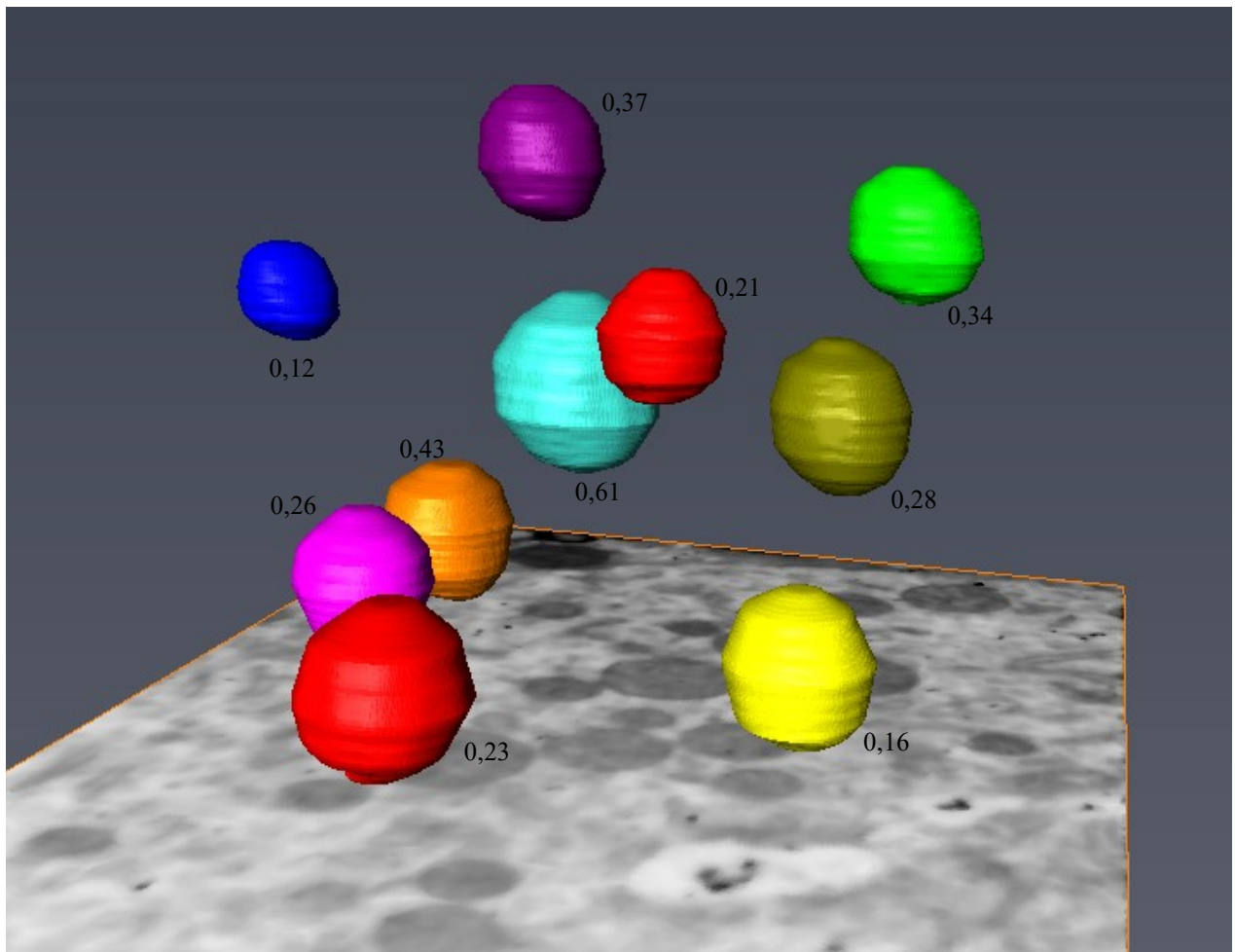


Рис.18. 3D реконструкции митохондрий DA нейронов нокаутной линии;
 объем митохондрий в μm^3 показан на рисунках рядом с органеллами.

Инактивация *Mfn2* вызывает последовательное изменение структуры внутренней мембраны митохондрий и, в конечном итоге, ведет к нарушению их целостности.

Чтобы выяснить, какие последовательные изменения в структуре мембран митохондрий происходят с течением времени после выключения гена *Mfn2*, были получены микрофотографии DA нейронов мышей через 3,6 и 9 недель после введения тамоксифена. Оказалось, что на 3 и 6 неделях наблюдается нарушение регулярной организации крист митохондрий. Они набухают, и нарушается их форма (Рис.19, а-е), что не характерно для нормальной организации внутренней мембраны митохондрий в контроле (Рис.20, г). Кроме того, на 6-ой неделе митохондрии увеличиваются в объеме и занимают обширное пространство в цитоплазме нейрона (Рис.19, в).

На 9 неделе после выключения *Mfn2* наблюдается нарушение внутренней и внешней мембраны митохондрий DA нейронов (Рис.20, а-в). У нескольких митохондрий четко прослеживается нарушение целостности внешней мембраны (Рис.20, б).

У 30% DA нейронов (при $n=36$) на 9 неделе после выключения *Mfn2* наблюдали дегенерацию, которая на микрофотографиях выражается в повышенной электронной плотности цитоплазмы (Рис.21).

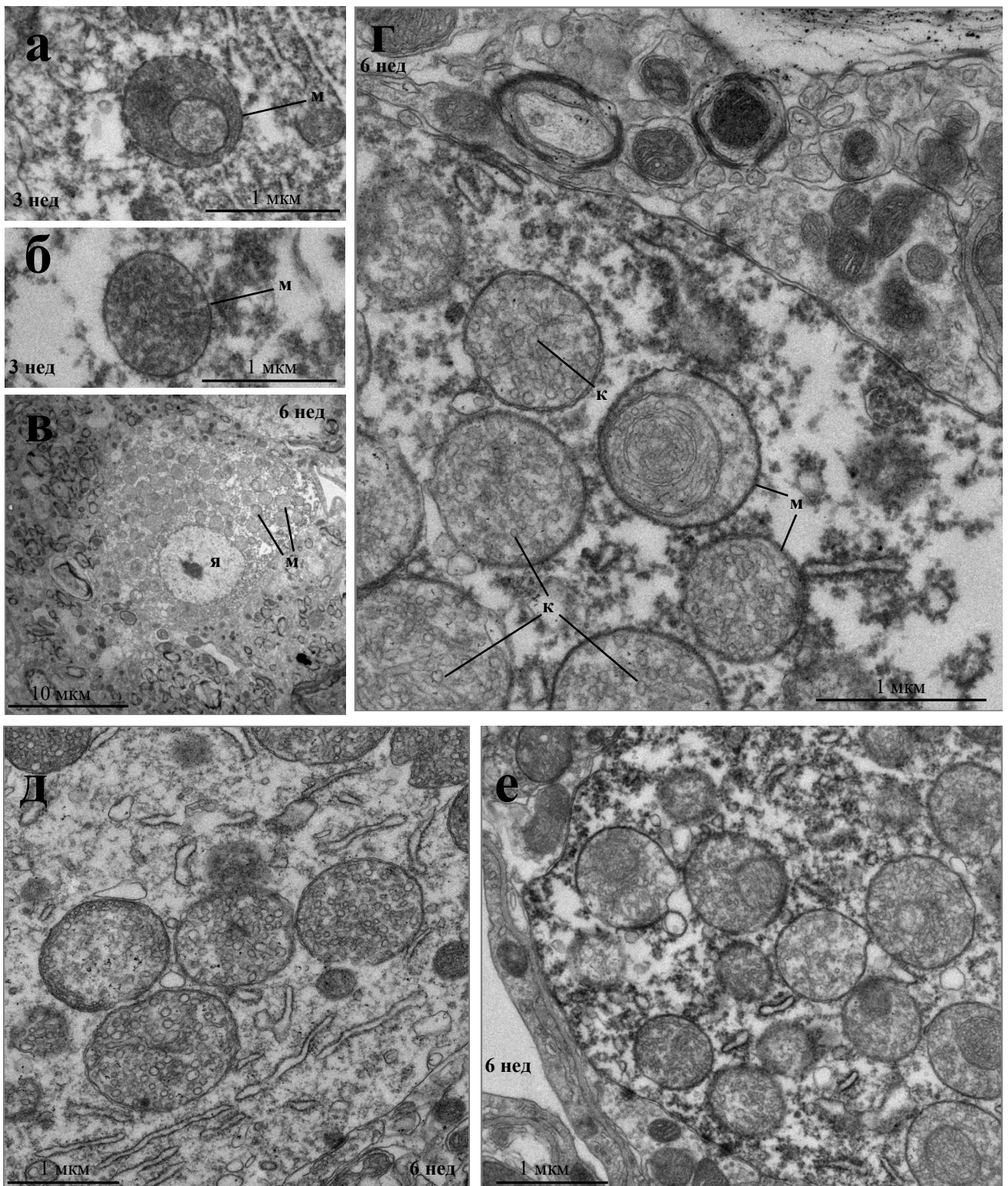


Рис.19. Изменение структуры внутренней мембраны митохондрий DA нейронов через 3 и 6 недель после выключения *Mfn2*: а,б – 3 недели после выключения, г-е – 6 недель после выключения; стоит обратить внимание, что кристы принимают округлую форму на срезе, в – заполнение тела нейрона увеличенными митохондриями; синаптические и аксональные митохондрии сохраняют нормальную структуру спустя 6 недель после нокаута гена *Mfn2*; м – митохондрия, к – криста, я – ядро.

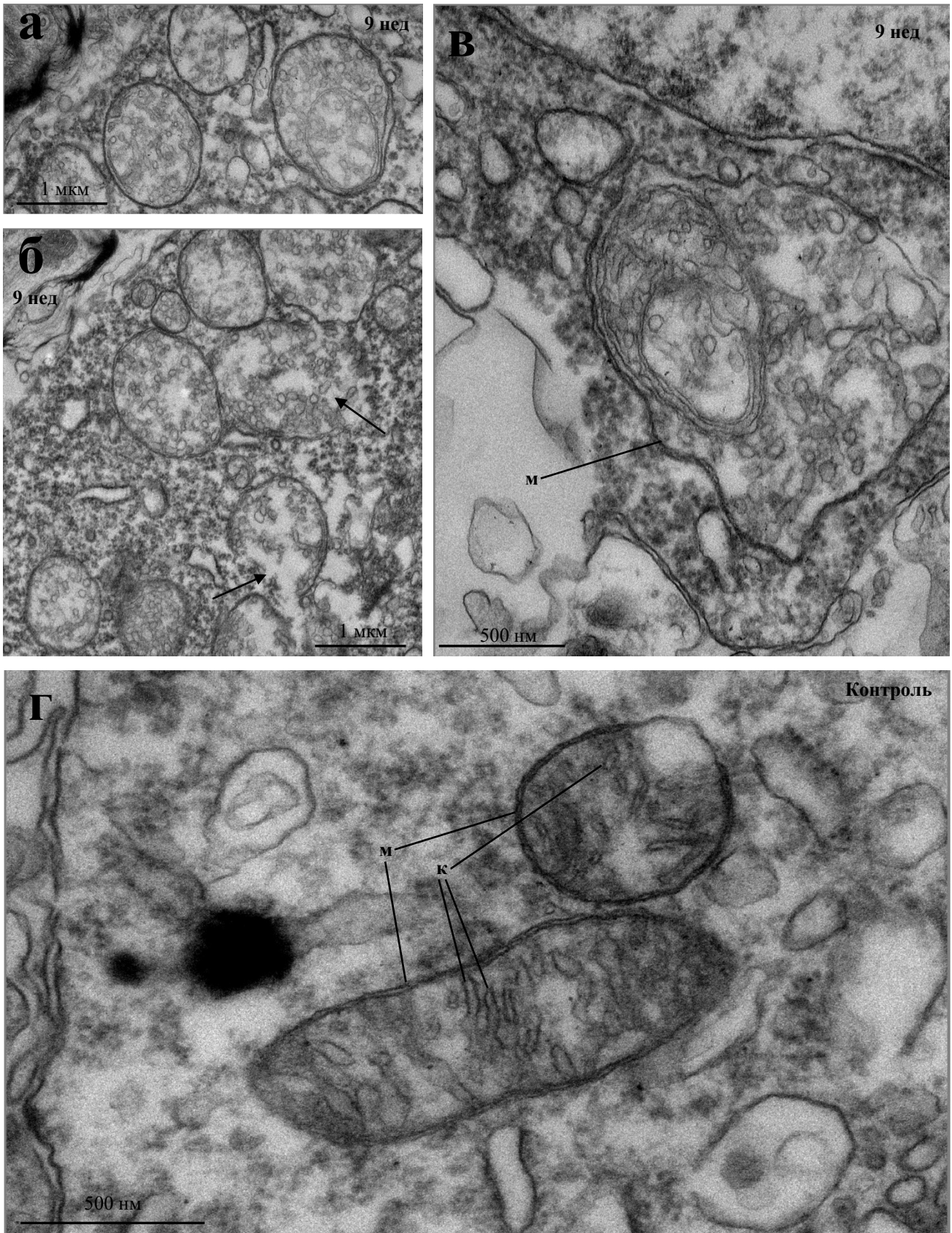


Рис.20. Нарушение структуры и целостности митохондриальных мембран через 9 недель после выключения *Mfn2* (а-в) и структура митохондрий контроля (г). Стоит обратить внимание на разрыв внешней мембраны митохондрий (б, стрелки) и высокую степень неупорядоченности мембран (в); м – митохондрия, к – криста.

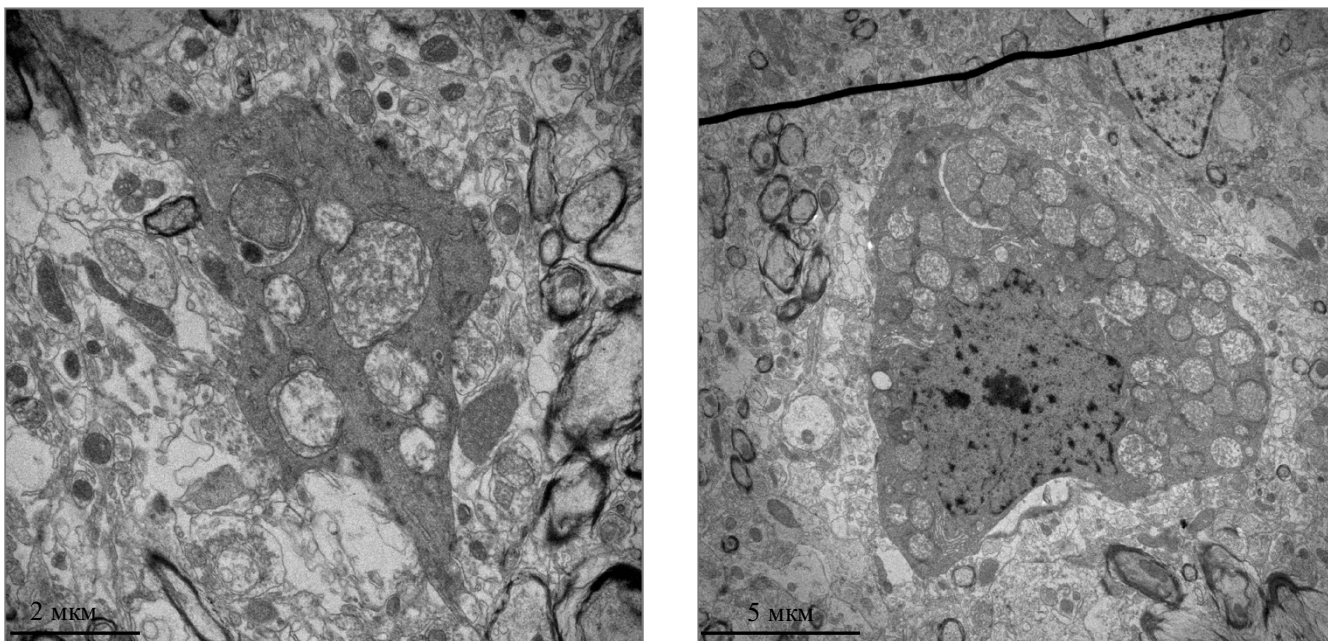


Рис.21. Дегенерация DA нейронов через 9 недель после выключения *Mfn2*.

Обсуждение

Как упоминалось выше, митохондриальная дисфункция в дофаминергических нейронах черной субстанции является важным компонентом патологий, сопутствующих болезни Паркинсона.

Митофузин 2, который управляет слиянием митохондрий, рассматривался как одна из возможных молекул, нарушение функций которой могут способствовать развитию заболевания. Действительно, мутации в генах *PINK1* и *Parkin*, которые кодируют ферменты, участвующие в регуляции функции Mfn2, приводят к БП [61, 62]. Как упоминалось ранее, Mfn2 является ключевой мишенью для убиквитин-лигазы Parkin [63]. При этом, Parkin также опосредует экспрессию PGC-1 α [64], который, в свою очередь, контролирует экспрессию *Mfn2* при стрессовых условиях [65]. Кроме того, Mfn2 участвует в функционировании белка вакуолярной сортировки Vps35, мутации в гене которого связаны с БП [67, 68]. Делеция гена *Vps35* у мышей вызывает фрагментацию митохондрий в результате повышенной активности митохондриальной убиквитин-лигазы и, как следствие, деградации Mfn2 [69]. Хотя эти данные указывали на связь между регуляцией *Mfn2* и БП, непосредственный причинный вклад Mfn2 в развитие этой патологии до настоящего был неясен. Нокаут гена *Mfn2* не позволял в полной мере оценить вклад митофузина 2 в развитие болезни, поскольку этот белок активно вовлечен в эмбриональное развитие [48].

Задачей данного исследования было выяснить, как выключение гена *Mfn2* в сформированной дофаминергической системе взрослого животного повлияет на структуру митохондрий. Система, созданная для моделирования такой картины, позволила провести исследование на взрослых животных, имитируя возможный ход заболевания при нарушении функции гена.

В настоящей работе было выяснено, что на ранних стадиях после выключения *Mfn2* в DA нейронах изменяется форма митохондрий. На 3 неделе после нокаута органеллы принимают форму эллипсов по сравнению с вытянутой формой митохондрий у контроля. Этот результат позволяет предположить, что Mfn2 связан с белковыми комплексами, стабилизирующими структуру внешней мембраны митохондрий.

Расчет объемов митохондрий DA нейронов мышей через 3 недели после выключения гена *Mfn2* и контрольных мышей показал любопытные результаты. В отличие от митохондрий в контроле, объемы митохондрий у *iMfn2^{DA}* обладают меньшим разбросом значений. Хотя различие среднего объема митохондрий у *iMfn2^{DA}* и контрольных мышей не показало статистической достоверности, различие дисперсий распределения объемов органелл оказалось статистически достоверным. Снижение разброса объема митохондрий у нокаутной линии позволяет заключить, что при нарушении регуляции *Mfn2* митохондрии не только изменяют форму, но и теряют способность сливаться и образовывать вытянутые и разветвленные структуры. Мы предполагаем, что средний объем митохондрий DA нейронов на ранних этапах после инактивации гена *Mfn2* действительно может быть меньше объема контроля при увеличении выборки.

Важно отметить, что инактивация *Mfn2* повлияла на организацию внутренней мембраны митохондрий. Как и внешняя мембрана, она также претерпевает динамические процессы - деление и слияние [73]. В слиянии внутренних мембран митохондрий участвует динамин-подобная ГТФаза OPA1, которая также важна для поддержания нормальной пластинчатой структуры крист [74]. Sara Cipolat и ее группа показали, что для нормального функционирования OPA1 необходим *Mfn1*, но не *Mfn2* [75]. Однако нарушение регулярной структуры крист при инактивации *Mfn2* в нашей работе позволяет предположить, что OPA1 может быть связан и с *Mfn2*. Таким образом, мы предполагаем, что *Mfn2* может являться связующим звеном при слиянии внутренней и внешней мембраны митохондрий. Проверка этого предположения будет проведена в биохимических экспериментах. В случае подтверждения нашего предположения это позволит объяснить, почему OPA1-зависимая организация крист является критическим фактором для нормального функционирования комплексов ЭТЦ митохондрий [76]. Также OPA1 участвует в регуляции цитохром С – индуцируемого апоптоза [77]. В связи с этим, можно предположить, что нарушение целостности мембран митохондрий и гибель нейронов, наблюдаемые в нашей работе, связаны с окислительным стрессом и выходом цитохрома С из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль. В дальнейшем необходимо более тщательно исследовать вопрос *Mfn2*-OPA1 взаимодействия, поскольку причина наблюдаемой митохондриальной деградации может заключаться и в нарушении формы их наружной мембраны.

Подводя итоги, следует отметить, что *Mfn2* является участником множества других критически важных процессов в DA нейронах. В дальнейшем стоит уделить внимание вероятным эффектам на аксональный транспорт митохондрий и организацию их контактов с эндоплазматическим ретикуломом.

В заключение, стоит подчеркнуть, что наши исследования указывают на важную роль *Mfn2* в развитии патологий, связанных с БП. Не исключено, что этот белок может являться потенциальной мишенью для терапии заболевания. В пользу такого сценария указывают, например эксперименты, в которых стабилизация уровня *Mfn2* при нарушении функции *Vps35* может предотвратить гибель дофаминергических нейронов [69].

Выводы

1. Выключение гена *Mfn2* в сформированных DA нейронах приводит к прогрессирующей митохондриальной дисфункции и гибели нейронов.
2. На начальных этапах (3 недели) выключение гена *Mfn2* нарушает процесс слияния митохондрий. Происходит изменение формы органелл и изменяется организация их внутренней мембраны.
3. Через 6 недель все митохондрии принимают сферическую форму, происходит реорганизация крист, наблюдается набухание митохондрий.
4. Через 9 недель у большинства митохондрий происходит нарушение целостности наружной и внутренней мембран. Параллельно наблюдается гибель до 30% дофаминергических нейронов черной субстанции.

Список литературы

1. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson's disease*. Lancet, 2015. **386**(9996): p. 896-912.
2. Sterky, F.H., et al., *Impaired mitochondrial transport and Parkin-independent degeneration of respiratory chain-deficient dopamine neurons in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(31): p. 12937-42.
3. Sterky, F.H., et al., *Altered dopamine metabolism and increased vulnerability to MPTP in mice with partial deficiency of mitochondrial complex I in dopamine neurons*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(5): p. 1078-89.
4. Pickrell, A.M., et al., *Striatal dysfunctions associated with mitochondrial DNA damage in dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2011. **31**(48): p. 17649-58.
5. Ekstrand, M.I., et al., *Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1325-30.
6. Dorsey, E.R., et al., *The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic*. J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S3-S8.
7. Collaborators, G.B.D.N., *Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. Lancet Neurol, 2019. **18**(5): p. 459-480.
8. Goetz, C.G., *The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a008862.
9. Jankovic, J., et al., *Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort*. The Parkinson Study Group. Neurology, 1990. **40**(10): p. 1529-34.
10. Fereshtehnejad, S.M. and R.B. Postuma, *Subtypes of Parkinson's Disease: What Do They Tell Us About Disease Progression?* Curr Neurol Neurosci Rep, 2017. **17**(4): p. 34.
11. Khoo, T.K., et al., *The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease*. Neurology, 2013. **80**(3): p. 276-81.
12. Duncan, G.W., et al., *Health-related quality of life in early Parkinson's disease: the impact of nonmotor symptoms*. Mov Disord, 2014. **29**(2): p. 195-202.
13. Postuma, R.B., et al., *Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(5): p. 617-26.
14. Siderowf, A. and A.E. Lang, *Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions*. Mov Disord, 2012. **27**(5): p. 608-16.
15. Fox, S.H., et al., *The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease*. Mov Disord, 2011. **26 Suppl 3**: p. S2-41.
16. Connolly, B.S. and A.E. Lang, *Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review*. JAMA, 2014. **311**(16): p. 1670-83.
17. Hely, M.A., et al., *Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years*. Mov Disord, 2005. **20**(2): p. 190-9.
18. Hely, M.A., et al., *The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years*. Mov Disord, 2008. **23**(6): p. 837-44.
19. Bloem, B.R., M.S. Okun, and C. Klein, *Parkinson's disease*. Lancet, 2021.
20. Carpenter, M.B., K. Nakano, and R. Kim, *Nigrothalamic projections in the monkey demonstrated by autoradiographic technics*. J Comp Neurol, 1976. **165**(4): p. 401-15.
21. Hodge, G.K. and L.L. Butcher, *Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1980. **313**(1): p. 51-67.
22. Hauber, W., *Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation*. Prog Neurobiol, 1998. **56**(5): p. 507-40.
23. Dickson, D.W., et al., *Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1150-7.

24. Kordower, J.H., et al., *Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease*. *Brain*, 2013. **136**(Pt 8): p. 2419-31.
25. Hornykiewicz, O. and S.J. Kish, *Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease*. *Adv Neurol*, 1987. **45**: p. 19-34.
26. Johansen, K.K., et al., *A Case of Parkinson's Disease with No Lewy Body Pathology due to a Homozygous Exon Deletion in Parkin*. *Case Rep Neurol Med*, 2018. **2018**: p. 6838965.
27. Maiti, P., J. Manna, and G.L. Dunbar, *Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: Targets for potential treatments*. *Transl Neurodegener*, 2017. **6**: p. 28.
28. Zeng, X.S., et al., *Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease*. *Front Aging Neurosci*, 2018. **10**: p. 109.
29. Ip, C.W., et al., *AAV1/2-induced overexpression of A53T-alpha-synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease*. *Acta Neuropathol Commun*, 2017. **5**(1): p. 11.
30. Pupyshv, A.B., et al., *Suppression of autophagy in the brain of transgenic mice with overexpression of capital A, Cyrillic53capital TE, Cyrillic-mutant alpha-synuclein as an early event at synucleinopathy progression*. *Neurosci Lett*, 2018. **672**: p. 140-144.
31. Li, X., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)/PARK8 possesses GTPase activity that is altered in familial Parkinson's disease R1441C/G mutants*. *J Neurochem*, 2007. **103**(1): p. 238-47.
32. Ho, D.H., et al., *LRRK2 Kinase Activity Induces Mitochondrial Fission in Microglia via Drp1 and Modulates Neuroinflammation*. *Exp Neurol*, 2018. **27**(3): p. 171-180.
33. Nguyen, M. and D. Krainc, *LRRK2 phosphorylation of auxilin mediates synaptic defects in dopaminergic neurons from patients with Parkinson's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(21): p. 5576-5581.
34. Clark, I.E., et al., *Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin*. *Nature*, 2006. **441**(7097): p. 1162-6.
35. Pickrell, A.M. and R.J. Youle, *The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease*. *Neuron*, 2015. **85**(2): p. 257-73.
36. Wang, W., et al., *Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes*. *Nat Med*, 2016. **22**(1): p. 54-63.
37. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. *Nat Genet*, 2006. **38**(5): p. 515-7.
38. Reeve, A.K., et al., *Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons*. *Am J Hum Genet*, 2008. **82**(1): p. 228-35.
39. Chaturvedi, R.K. and M.F. Beal, *Mitochondrial approaches for neuroprotection*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1147**: p. 395-412.
40. Isobe, C., T. Abe, and Y. Terayama, *Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process*. *Neurosci Lett*, 2010. **469**(1): p. 159-63.
41. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
42. Starkov, A.A., *The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1147**: p. 37-52.
43. Keeney, P.M., et al., *Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled*. *J Neurosci*, 2006. **26**(19): p. 5256-64.

44. Dias, V., E. Junn, and M.M. Mouradian, *The role of oxidative stress in Parkinson's disease*. J Parkinsons Dis, 2013. **3**(4): p. 461-91.
45. Martinez-Vicente, M., *Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 64.
46. Mouton-Liger, F., et al., *PINK1/Parkin-Dependent Mitochondrial Surveillance: From Pleiotropy to Parkinson's Disease*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 120.
47. Alexander, C., et al., *OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 211-5.
48. Chen, H., et al., *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
49. Griffin, E.E. and D.C. Chan, *Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion*. J Biol Chem, 2006. **281**(24): p. 16599-606.
50. Qi, Y., et al., *Structures of human mitofusin 1 provide insight into mitochondrial tethering*. J Cell Biol, 2016. **215**(5): p. 621-629.
51. Ryan, M.T. and D. Stojanovski, *Mitofusins 'bridge' the gap between oxidative stress and mitochondrial hyperfusion*. EMBO Rep, 2012. **13**(10): p. 870-1.
52. Santel, A., et al., *Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2763-74.
53. Koshiba, T., et al., *Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes*. Science, 2004. **305**(5685): p. 858-62.
54. Daumke, O. and A. Roux, *Mitochondrial Homeostasis: How Do Dimers of Mitofusins Mediate Mitochondrial Fusion?* Curr Biol, 2017. **27**(9): p. R353-R356.
55. Giorgi, C., et al., *Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(12): p. 995-1019.
56. de Brito, O.M. and L. Scorrano, *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature, 2008. **456**(7222): p. 605-10.
57. Hamasaki, M., et al., *Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 389-93.
58. Hailey, D.W., et al., *Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation*. Cell, 2010. **141**(4): p. 656-67.
59. Misko, A., et al., *Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex*. J Neurosci, 2010. **30**(12): p. 4232-40.
60. Lee, S., et al., *Mitofusin 2 is necessary for striatal axonal projections of midbrain dopamine neurons*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(22): p. 4827-35.
61. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
62. Dodson, M.W. and M. Guo, *Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*. Curr Opin Neurobiol, 2007. **17**(3): p. 331-7.
63. Matsuda, N., et al., *PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy*. J Cell Biol, 2010. **189**(2): p. 211-21.
64. Shin, J.H., et al., *PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease*. Cell, 2011. **144**(5): p. 689-702.
65. Soriano, F.X., et al., *Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2*. Diabetes, 2006. **55**(6): p. 1783-91.
66. Zheng, L., et al., *Parkin functionally interacts with PGC-1alpha to preserve mitochondria and protect dopaminergic neurons*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(3): p. 582-598.

67. Vilarino-Guell, C., et al., *VPS35 mutations in Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(1): p. 162-7.
68. Zimprich, A., et al., *A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(1): p. 168-75.
69. Tang, F.L., et al., *VPS35 Deficiency or Mutation Causes Dopaminergic Neuronal Loss by Impairing Mitochondrial Fusion and Function*. Cell Rep, 2015. **12**(10): p. 1631-43.
70. McLellan, M.A., N.A. Rosenthal, and A.R. Pinto, *Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations*. Curr Protoc Mouse Biol, 2017. **7**(1): p. 1-12.
71. Parlato, R., et al., *Survival of DA neurons is independent of CREM upregulation in absence of CREB*. Genesis, 2006. **44**(10): p. 454-64.
72. Metzger, D. and P. Chambon, *Site- and time-specific gene targeting in the mouse*. Methods, 2001. **24**(1): p. 71-80.
73. Murata, D., et al., *Mitochondrial division, fusion and degradation*. J Biochem, 2020. **167**(3): p. 233-241.
74. Olichon, A., et al., *Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7743-6.
75. Cipolat, S., et al., *OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(45): p. 15927-32.
76. Cogliati, S., et al., *Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency*. Cell, 2013. **155**(1): p. 160-71.
77. Baker, N., J. Patel, and M. Khacho, *Linking mitochondrial dynamics, cristae remodeling and supercomplex formation: How mitochondrial structure can regulate bioenergetics*. Mitochondrion, 2019. **49**: p. 259-268.