

**ЦИБРИДНЫЕ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ TNR-1 С РАЗЛИЧНЫМ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ГЕНОМОМ ИМЕЛИ РАЗНЫЙ
ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ**

Журавлев А. Д.^{1,2}

Верхова С. С.^{1,2}

Кубекина М. В.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия.

² Научно-Исследовательский Институт Морфологии Человека Имени Академика А.П. Авцына ФГБНУ "Российский Научный Центр Хирургии Имени Академика Б.В. Петровского", 117418, Москва, Россия.

³ Центр коллективного пользования и Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук, 119334, Москва, Россия

**THP1-BASED CYBRID CELLS WITH VARIOUS MTDNA MUTATIONS
DIFFER BY THE ABILITY TO FORM INFLAMMATORY RESPONSE**

Zhuravlev A. D.^{a,b}

Verkhova S. S.^{a,b}

Kubekina M. V.^c

^a Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315 Moscow, Russian Federation.

^b Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", 117418, Moscow, Russian Federation.

^c Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Russian Federation.

Резюме

Большинство возрастных заболеваний человека сопровождается хроническим воспалением. Современные исследования направлены на изучение принципов формирования иммунного ответа. До сих пор не известны причины, по которым локальная воспалительная реакция не может разрешиться и переходит в вялотекущую хроническую форму. Врождённый иммунитет первым отвечает на вторжение патогенов. Важной составляющей воспалительной реакции является секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2. Это необходимо для рекрутирования в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток. Чтобы избежать гибели клеток в результате высоких концентраций цитокинов, и как следствие повреждения ткани, существует механизм толерантности врождённого иммунитета. Толерантность врождённого иммунитета заключается в снижении секреции провоспалительных цитокинов в ответ на повторное влияние патогена. Известно, что в формировании иммунного ответа важную роль играют митохондрии. Следовательно, нарушения в функционировании митохондрий могут приводить к нарушениям иммунного ответа. Чтобы избежать накопления дефектных митохондрий в клетке, существует контроль качества митохондрий. Митофагия, являясь специализированной формой аутофагии, очищает клетку от дисфункциональных митохондрий. Ранее, нашей лаборатории удалось разработать цбриды. Это линии, которые были получены на основе моноцитарной клеточной линии THP-1, в которой предварительно убрали митохондрии. Чтобы получить цбриды получившиеся безъядерные клетки THP-1 кокультивировали с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, цбриды несут в себе ядерный геном THP-1 и митохондриальный геном пациента. В нашем исследовании мы решили изучить способность клеток, несущих разный митохондриальный геном, генерировать провоспалительный ответ, а также формировать толерантность в дальнейшем. Для это мы выбрали модель толерантности к эндотоксину. Толерантность к эндотоксину или

липополисахариду определяется как резистентное, противовоспалительное состояние в ответ на вторичную дозу липополисахариду после первичного воздействия. Таким образом, мы дважды стимулировали гибридные линии липополисахаридом и после этого оценивали секреции цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 с помощью ИФА. Гибриды демонстрировали два уровня провоспалительного ответа: высокий и низкий. Более того, гибриды с высоким провоспалительным ответом либо формировали, либо не формировали толерантность при повторной стимуляции. В результате исследования мы установили, что клетки, различающиеся по митохондриальному геному, отличались друг от друга по своему иммунному ответу. Будущие исследования улучшат наше понимание механизмов участия митохондрий в патологических процессах. Вероятно, что исследования недостаточной митофагии и роли определенных мутаций мтДНК в её развитии принесут многообещающие результаты.

Ключевые слова: цитокины, митохондрии, хроническое воспаление, гибриды, толерантность врождённого иммунитета, митофагия.

Abstract.

Most age-related human diseases are accompanied by chronic inflammation. Modern research is aimed at studying the principles of the formation of the immune response. The reasons why the local inflammatory reaction cannot be resolved and becomes a sluggish chronic form are still unknown. Immune cells secrete cytokines in response to pathogens. To avoid cell death as a result of high concentrations of cytokines and resulting tissue damage, there is a mechanism of innate immune tolerance. Innate immune tolerance involves a decrease in the secretion of proinflammatory cytokines in response to repeated exposure to a pathogen. It is known that mitochondria play an important role in the formation of the immune response. Consequently, impaired mitochondrial function can lead to impaired immune response. To control the quality of mitochondria in the cell, there is a

mechanism - mitophagy. Previously, we have created cybrid lines based on the monocytic cell line THP-1. Cybrids were obtained by fusion of THP-1 cells (mitochondria were removed) with platelets from patients. Each of the cybrid lines had the THP-1 nuclear genome and an individual patient's mitochondrial genome. In our study, we decided to study the ability of cells carrying different mitochondrial genomes to generate a pro-inflammatory response, as well as to form tolerance in the future. For this purpose, we chose a model of endotoxin tolerance. Thus, we stimulated the cybrid lines twice with lipopolysaccharide and then assessed the secretion of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and CCL2 using ELISA. The cybrids demonstrated two levels of pro-inflammatory response: high and low. Moreover, cybrids with a high pro-inflammatory response either did or did not develop tolerance upon repeated stimulation. In our study, cells that differed from each other only in mitochondrial genome demonstrated three types of reactions upon the induction of immune tolerance to LPS. Future studies will improve our understanding of the mechanisms of mitochondrial involvement in pathological processes. It is likely that studies of deficient mitophagy and the role of certain mtDNA mutations in its development will yield promising results.

Keywords: cytokines, mitochondria, chronic inflammation, cybrids, innate immune tolerance, mitophagy.

1 **Введение.**

2 Воспаление – это защитная реакция иммунитета на патоген или
3 повреждение. Одним из важных проявлений воспалительной реакции является
4 секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как
5 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2. Это необходимо для рекрутирования в очаг
6 воспаления иммунокомпетентных клеток и активации механизмов устранения
7 патогена [10]. Чтобы избежать апоптоза клеток в результате высоких
8 концентраций цитокинов, и как следствие повреждения ткани, существует
9 механизм толерантности врождённого иммунитета. Толерантность
10 представляет собой механизм, при котором происходит снижение секреции
11 провоспалительных цитокинов иммунокомпетентных клеток при повторных
12 воздействиях патогена и способствует разрешению воспаления [2]. Если
13 воспаление не может разрешиться, то оно перетекает в хроническое состояние
14 [7].

15 Современные исследования направлены на изучение роли
16 митохондрий в развитии хронического воспаления [1, 9]. Функциональная
17 активность клеток, участвующих в иммунном ответе, зависит от работы
18 митохондрий. Митохондрии представляют собой полуавтономные органеллы,
19 обладающие собственной митохондриальной ДНК (мтДНК). Мутации в
20 мтДНК происходят чаще из-за близости к активным формам кислорода,
21 кольцевой структуры, несовершенной репарации [5]. Поэтому клетке
22 необходимо своевременно устранять повреждённые органеллы. Контроль
23 качества митохондрий осуществляется несколькими механизмами, одним из
24 которых является митофагия. Митофагия обеспечивает селективное удаление
25 поврежденных митохондрий. Снижение эффективности митофагии приводит
26 к накоплению дефектных митохондрий, что в дальнейшем может привести к
27 повышенному уровню секреции провоспалительных цитокинов и, как
28 следствие, чрезмерному воспалению [3, 11].

29 Удобной моделью для изучения функциональной значимости
30 митохондрий являются цитоплазматические гидриды (цибриды). Цибриды

31 были созданы нашей лабораторией ранее, для этого безмитохондриальные
32 клетки ТНР-1 слили с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, все
33 цибриды несут единый ядерный геном и уникальный митохондриальный
34 геном [6].

35 Целью настоящего исследования было изучение способности
36 цибридных линий, несущих разный митохондриальный геном, генерировать
37 провоспалительный ответ, а также формировать толерантность.

38 **Материалы и методы**

39 Для изучения взаимосвязи между мутациями мтДНК и
40 воспалительным ответом были выбраны цибридные линии. Для получения
41 цибридных линий на ТНР-1 воздействовали бромистым этидием для
42 угнетения митохондрий. После того, как в клетках не осталось митохондрий,
43 они кокультивировались с тромбоцитами от пациентов с хроническими
44 заболеваниями. Особенность этих линий в том, что у них единый ядерный
45 геном. Цибридные линии были получены нашей лабораторией ранее [6].

46 Для воспалительной реакции и толерантности к липополисахариду
47 (LPS) цибридные линии высевали в стерильные 6-луночные планшеты по две
48 лунки в концентрации 1 млн клеток/мл по 2 мл в каждую лунку. В одну из
49 лунок к клеткам добавляли LPS в концентрации 1 мкг/мл. Клетки с LPS
50 инкубировали в течение 4 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C (95% воздуха и 5%
51 CO₂). Через 4 ч клетки откручивали при 300 g в течение 5 мин, отмывали при
52 помощи PBS, добавляли 2 мл RPMI-1640 (10% сыворотки, 100 ед/мл
53 пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и высевали по 1 мл в 24-луночный
54 планшет. Затем добавляли в одну из лунок LPS в концентрации 1 мкг/мл.
55 Клетки с LPS инкубировали в течение 20 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C (95%
56 воздуха и 5% CO₂). Спустя 20 ч образцы культуральной среды отбирали в
57 пробирки, центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. Супернатант
58 отбирали в отдельные пробирки для оценки секреции панели цитокинов
59 методом ИФА с использованием реагентов R&D Systems. Проведение ИФА

60 согласно протоколу анализа. Оптическую плотность калибраторов и
61 исследуемых образцов измеряли на планшетном ридере CLARIOstar.

62 Статистический анализ проводили при помощи программного
63 обеспечения SPSS Statistics 26.

64 **Результаты и обсуждение**

65 Мы решили оценить способность исследуемых клеточных линий
66 генерировать провоспалительный ответ при стимуляции LPS, а также
67 дальнейшую способность клеток формировать иммунную толерантность.

68 Цибриды демонстрировали два уровня провоспалительного ответа:
69 высокий и низкий. Более того, цибриды с высоким провоспалительным
70 ответом можно разделить на те, которые формировали толерантность, и те,
71 которые не формировали толерантность к LPS (Рис.1).

72 **Рисунок 1. Провоспалительный ответ и способность формировать**
73 **толерантность цибридными линиями.** (А) Секреция цитокинов TNF- α , IL-
74 1 β , IL-6, IL-8, CCL2 в ответ на первую и на вторую стимуляцию LPS. По оси
75 Y отмечен провоспалительный ответ на первую стимуляцию LPS, по оси X –
76 на вторую стимуляции. В прямоугольник попали цибриды с низкой
77 секреторной активностью по данному цитокину. Если точка выше линии, то
78 цибридная линия формировала толерантность, если ниже, то не формировала.
79 (Б) Способность цибридных линий формировать иммунную толерантность
80 при двукратной стимуляции клеток LPS. Слева представлены цибридные
81 линии, сверху цитокины. Пересечения соответствуют типу ответа и
82 способности формировать толерантность для каждой цибридной линии по
83 каждому цитокину. Серый прямоугольник – низкий провоспалительный ответ,
84 белый – высокий провоспалительный ответ, формировали толерантность,
85 чёрный – высокий провоспалительный ответ, не формировали толерантность.

86 Оказалось, что цибридные линии HSM1, HSM2, TC-520, TC-521, TCI-
87 521 не реагировали на секрецию LPS по всем исследуемым цитокинам. TCN-
88 521 не реагировала по четырём цитокинам и не формировал толерантность по
89 IL-8. LSM1, HSMAM2 имели низкую секрецию по IL-1 β , IL-6, CCL2 и не

90 формировали толерантность по TNF- α , IL-8. LSM2 формировала
91 толерантность по TNF- α и по CCL2, не формировала толерантность по IL-1 β ,
92 IL-6, IL-8. HSMAM3 формировала толерантность по TNF- α , IL-1 β , IL-6 и не
93 формировала по IL-8, CCL2. HSMAM1, TC-522, TCP-521 формировали по
94 CCL2, и не формировали по TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8.

95 Таким образом, клетки, различающиеся по митохондриальному
96 геному, качественно отличались по типу воспалительной реакции.

97 Ранее, группа учёных провела клиническое исследование и показала,
98 что у пациентов с мутациями или делециями в мтДНК секреция
99 провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-1 β лейкоцитами была выше в
100 ответ на LPS [4]. Можно предположить, что ответственным за накопление
101 мутация мтДНК могло быть нарушение в митофагии. Более того, было
102 показано, что нарушения в секреции PINK1 и/или PARKIN, ключевых белков
103 митофагии, также вело к повышенному содержанию IL-1 β , IL-6, CCL2 [8].

104 **Заключение**

105 В своём исследовании мы продемонстрировали, что клетки,
106 различающиеся между собой только митохондриальным геномом,
107 качественно отличались по типу воспалительной реакции. Наше
108 исследование, безусловно, имеет ряд ограничений. Так, мы не
109 продемонстрировали роль конкретных мутаций мтДНК в нарушениях
110 иммунной реакции, а также не осветили механизмы этих нарушений. Однако,
111 вероятно, митохондриальные мутации, а значит и митохондриальная
112 дисфункция, действительно могут лежать в основе нарушений функций
113 иммунных клеток. Раскрытие механизмов влияния мутаций мтДНК на
114 формирование иммунного ответа и толерантности представляется крайне
115 перспективным направлением для разработки эффективной и безопасной
116 терапии заболеваний воспалительного генеза.

117 **Благодарности**

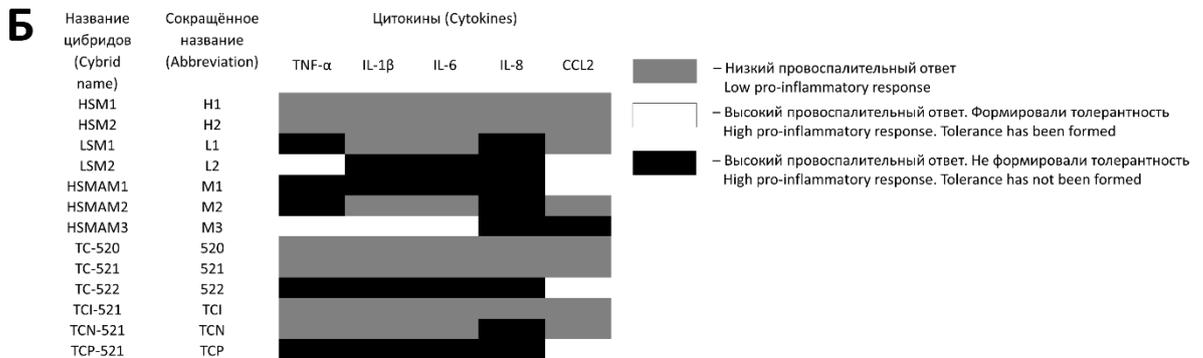
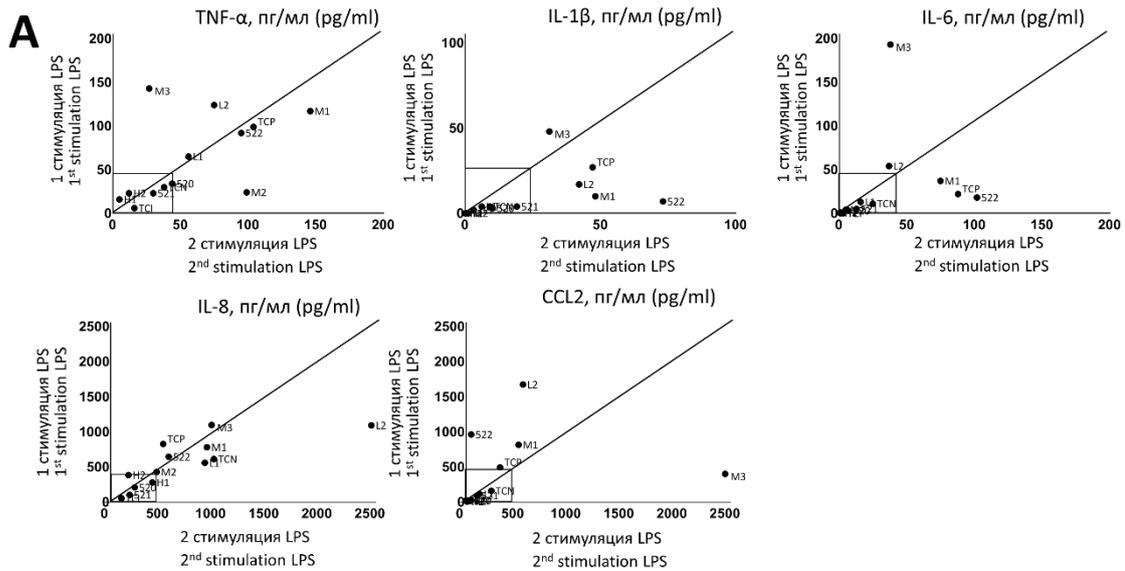
118 Авторы выражают благодарность Центру высокоточного
119 редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, за
120 возможность использования научного оборудования.

121 Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00339.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Провоспалительный ответ и способность формировать толерантность цибридными линиями. (А) Секреция цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 в ответ на первую и на вторую стимуляцию LPS. По оси Y отмечен провоспалительный ответ на первую стимуляцию LPS, по оси X – на вторую стимуляции. В прямоугольник попали цибриды с низкой секреторной активностью по данному цитокину. Если точка выше линии, то цибридная линия формировала толерантность, если ниже, то не формировала. **(Б)** Способность цибридных линий формировать иммунную толерантность при двукратной стимуляции клеток LPS. Слева представлены цибридные линии, сверху цитокины. Пересечения соответствуют типу ответа и способности формировать толерантность для каждой цибридной линии по каждому цитокину. Серый прямоугольник – низкий провоспалительный ответ, белый – высокий провоспалительный ответ, формировали толерантность, чёрный – высокий провоспалительный ответ, не формировали толерантность.

Figure 1. Pro-inflammatory response and ability to form tolerance in hybrid lines. (A) Secretion of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 in response to the first and second LPS stimulation. The Y axis shows the proinflammatory response to the first LPS stimulation, and the X axis to the second stimulation. The rectangle contains cybrids with low secretory activity for this cytokine. If the point is above the line, then the cybrid line has formed tolerance, if below, then it has not. (B) The ability of cybrid lines to form immune tolerance upon double stimulation of cells with LPS. On the left are cybrid lines, on top are cytokines. The intersections correspond to the type of response and the ability to form tolerance for each cybrid line for each cytokine. Gray rectangle – low pro-inflammatory response, white – high pro-inflammatory response, tolerance was formed, black – high pro-inflammatory response, tolerance was not formed.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Журавлев Александр Дмитриевич – аспирант, младший научный сотрудник, Лаборатория Ангиопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, ул. Балтийская, дом 8, Москва, Россия.

Тел: +79857917198

E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Zhuravlev Alexander Dmitrievich – Postgraduate Student, Junior Researcher Fellow, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Street, 125315 Moscow, Russian Federation.

125315, st. Baltiyskaya, building 8, Moscow, Russia

+79857917198

E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Кубекина М.В. – к.б.н., научный сотрудник Центра коллективного пользования и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН Института биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия.

Kubekina M.V. – PhD, Research Fellow , Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation.

Верхова С.С. – аспирант Научно-Исследовательского Института Морфологии Человека Имени Академика А.П. Авцына ФГБНУ "Российский Научный Центр Хирургии Имени Академика Б.В. Петровского", Москва, Россия.

Verkhova S.S. – Postgraduate Student in Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre Of Surgery", Moscow, Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

ЦИБРИДНЫЕ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ THP-1 С РАЗЛИЧНЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ГЕНОМОМ ИМЕЛИ РАЗНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ

THP1-BASED CYBRID CELLS WITH VARIOUS MTDNA MUTATIONS DIFFER BY THE ABILITY TO FORM INFLAMMATORY RESPONSE

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Роль митохондрий в воспалении

The role of mtDNA in inflammation

Ключевые слова: цитокины, митохондрии, хроническое воспаление, цибриды, толерантность врождённого иммунитета, митофагия.

Keywords: cytokines, mitochondria, chronic inflammation, cybrids, innate immune tolerance, mitophagy.

Раздел Объединенный иммунологический форум 2024

Количество страниц текста – 5

Количество таблиц – 0

Количество рисунков – 1

Дата поступления: 31.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Dela Cruz C.S., Kang M.J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. Mitochondrion, 2018, Vol. 41, pp. 37-44	-	doi: 10.1016/j.mito.2017.12.001
2	Dominguez-Andres J., Netea M.G. Long-term reprogramming of the innate immune system. J Leukoc Biol, 2019, Vol. 105, no. 2, pp. 329-338	-	doi: 10.1002/JLB.MR0318-104R
3	Fang E.F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B.A., Kerr J.S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M.M., Caponio D., Dan X., Rocktäschel P., Croteau D.L., Akbari M., Greig N.H., Fladby T., Nilsen H., Cader M.Z., Mattson M.P., Tavernarakis N., Bohr V.A. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. Nat Neurosci, 2019, Vol. 22 no. 3, pp. 401-412	-	doi: 10.1038/s41593-018-0332-9

4	Karan K.R., Trumpff C., Cross M., Engelstad K.M., Marsland A.L., McGuire P.J., Hirano M., Picard M. Leukocyte cytokine responses in adult patients with mitochondrial DNA defects. J Mol Med (Berl), 2022, Vol. 100, no. 6, pp. 963-971	-	doi: 10.1007/s00109-022-02206-2
5	Marian A.J. Mitochondrial genetics and human systemic hypertension. Circ Res, 2011, Vol. 108, no. 7, pp. 784-6	-	doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.242768
6	Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Khasanova Z.B., Shkurat T.P., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of Cybrid Cultures Containing mtDNA Mutations m.12315G>A and m.1555G>A, Associated with Atherosclerosis. Biomolecules, 2019, Vol. 9, no. 9, pp. 499	-	doi: 10.3390/biom9090499
7	Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. J Leukoc Biol, 2017, Vol. 101, no. 1, pp. 107-119	-	doi: 10.1189/jlb.3MR0316-118RR
8	Sliter D.A., Martinez J., Hao L., Chen X., Sun N., Fischer T.D., Burman J.L., Li Y., Zhang Z., Narendra D.P., Cai H., Borsche M., Klein C., Youle R.J.. Parkin	-	doi: 10.1038/s41586-018-0448-9

	and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. Nature, 2018, Vol. 561, no. 7722, pp. 258-262		
9	Vaamonde-García C., López-Armada M.J. Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. Biochem Pharmacol, 2019, Vol. 165, pp. 181-195	-	doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.008
10	Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Galon J., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. Oncoimmunology, 2012, Vol. 1, no. 4, pp. 493-506	-	doi: 10.4161/onci.20459
11	Xu Y., Shen J., Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. Autophagy, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 3-17	-	doi: 10.1080/15548627.2019.16035 47