

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОЙ ЛИНИИ МЫШЕЙ С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *NFE2L2* (*NRF2*)

© 2023 Е.С. Егоров¹, Н.Д. Кондратенко^{2,3}, О.А. Аверина^{2,4,5}, О.А. Пермяков^{4,5},
М.А. Емельянова^{4,5}, А.С. Приходько^{1,2}, Л.А. Зиновкина¹,
П.В. Сергиев^{2,4,5}, Р.А. Зиновкин^{2,6*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Российский геронтологический научно-клинический центр, 129226 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Институт функциональной геномики, 119991 Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

⁶ НИУ ВШЭ, 101000 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.09.2023

После доработки 22.11.2023

Принята к публикации 23.11.2023

Транскрипционный фактор NRF2 участвует в процессах воспаления, поддержании редокс-баланса, метаболизме ксенобиотиков, а также представляет особый интерес для изучения старения. В настоящей работе с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 были получены мыши NRF2^{ΔNeh2}, у которых белок NRF2 содержит замену восьми аминокислотных остатков на N-конце, непосредственно перед функциональным доменом Neh2, который обеспечивает связывание NRF2 со своим ингибиторным регулятором KEAP1. При скрещиваниях гетерозигот NRF2^{wt/ΔNeh2} частота рождения гомозиготных мутантных мышей была ниже ожидаемой, что сопровождалось их повышенной эмбриональной смертностью и визуальными признаками анемии. Мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФы) гомозигот NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} проявляли меньшую устойчивость к окислительному стрессу по сравнению с МЭФами дикого типа. В тканях гомозиготных животных NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} наблюдалось уменьшение относительного количества мРНК генов-мишеней NRF2: NAD(P)H:хинон оксидоредуктазы-1 (*Nqo1*); альдегидоксидазы-1 (*Aox1*); глутатион-S-трансферазы A4 (*Gsta4*); при этом увеличивалась экспрессия генов, кодирующих монокитарный хемоаттрактантный белок 1 (*Ccl2*), молекулы адгезии 1 клеток сосудов (*Vcam1*) и хемокина *Cxcl8*. Таким образом, полученная мутация в гене *Nfe2l2*, кодирующем NRF2, частично нарушала функции этого транскрипционного фактора, что расширяет представления о функциональной роли неструктурированного N-конца NRF2. Полученная линия мышей NRF2^{ΔNeh2} может быть использована как модельный объект для изучения эмбриональной смертности, а также различных патологий, сопряженных с окислительным стрессом и повышенным уровнем воспалительных реакций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскрипционный фактор NRF2, трансгенные животные, воспаление, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523120035, EDN: NJKYBM

ВВЕДЕНИЕ

NRF2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, ядерный фактор 2, родственник эритроидному фактору 2) — фактор транскрипции,

контролирующий экспрессию множества генов, продукты которых обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. В цитоплазме NRF2 связан с белком KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1), который в обычных условиях способ-

* Адресат для корреспонденции.

ствуется постоянной протеасомной деградации NRF2 [1]. В то же время KEAP1 является редокс-чувствительным регулятором активности NRF2: при проникновении в клетку окислителей и электрофилов происходит тиольная модификация аминокислотных остатков цистеина, входящих в состав KEAP1 [2]. Эта модификация блокирует KEAP1 в связанном с NRF2 состоянии. Из-за отсутствия «вакантных» негативных регуляторов новосинтезированный NRF2 накапливается в цитоплазме, а затем перемещается в ядро. В ядре NRF2 в комплексе со своими коактиваторами, основными из которых являются малые белки семейства Maf, распознаёт ARE-последовательности (ARE — элементы антиоксидантного ответа) в промоторах своих генов-мишеней и запускает их транскрипцию [3].

В структуре NRF2 присутствует 7 высококонсервативных Neh (NRF2-ECH homology, NRF2-ECH гомологичных)-доменов [4, 5]. В N-концевой части белка находится домен Neh2 (а.о. 16–86), включающий две аминокислотные последовательности, известные как DLG- и ETGE-мотивы [6]. С этими последовательностями связывается негативный регулятор NRF2 KEAP1. KEAP1, являясь адаптерным белком для E3-убиквитинлигазного комплекса Cullin 3 (Cul3), стимулирует убиквитинирование семи остатков лизина, располагающихся в домене Neh2 NRF2 между DLG- и ETGE-мотивами, и способствует протеасомной деградации последнего [6, 7]. Домены Neh1 (а.о. 435–562), Neh4 (а.о. 112–134), Neh5 (а.о. 183–201) и Neh7 (а.о. 209–316) отвечают за взаимодействие NRF2 со своими коактиваторами и корепрессорами [3, 8, 9]. В домене Neh6 (а.о. 338–388) располагаются две последовательности-дегрона, которые распознаёт E3-убиквитинлигаза β -TrCP [10, 11]. В C-концевой части белка находится домен Neh3 (а.о. 562–605), который отвечает за распознавание ARE-элементов в промоторах генов-мишеней NRF2 и содержит VFLVPK-мотив, помогающий NRF2 связываться с хеликазой CHD6 [12]. При всей сложности организации NRF2 этот белок является частично неупорядоченным, а его домены Neh2, Neh7 и Neh1 могут структурироваться лишь на некоторое время [13].

NRF2 активирует транскрипцию генов 2-й фазы детоксификации ксенобиотиков, в про-

цессе которой модифицированные соединения выводятся из клетки. NRF2 также принимает активное участие в защите клетки от электрофильного стресса [14]. Также NRF2 контролирует экспрессию генов, продукты которых участвуют в биосинтезе глутатиона, а также ферменты, которые прямо или косвенно нейтрализуют активные формы кислорода (АФК): NAD(P)H:хинон оксидоредуктазу (NQO1), гемоксигеназу-1 (HO1), каталазу (CAT). Уменьшение количества АФК, в свою очередь, способствует прекращению воспалительных реакций. При снижении экспрессии *Nfe2l2* происходит повышение уровня воспаления, что может привести к повреждениям органов и тканей [15]. При снижении экспрессии *Nfe2l2* в моноцитах также повышается продукция провоспалительных цитокинов [16]. На мышинных моделях показано повышение уровня АФК, приводящее к продолжительному окислительному стрессу после черепно-мозговых травм [17].

Для исследования функции транскрипционных факторов широко используются модельные организмы, нокаутные по выбранному гену. Мыши, нокаутные по *Nfe2l2*, кодирующему транскрипционный фактор NRF2, были получены более четверти века назад [18], и все последующие эксперименты проводились исключительно на этой линии. У этих мышей в ген *Nfe2l2* был вставлен цистрон из лактозного оперона, что приводило к невозможности синтеза функциональных мРНК и белкового продукта. Однако использование нокаутных животных зачастую приводит к появлению вторичных эффектов, которые затрудняют интерпретацию полученных результатов. Вполне вероятно, что при полном отсутствии какого-либо транскрипционного фактора вторичные эффекты могут быть обусловлены отсутствием действия связанных с ним кофакторов. В связи с этим представляется актуальным получение новых моделей, в которых не нарушена целостность белковой структуры транскрипционных факторов, а вместо этого внесены мутации в их домены. Ещё одной проблемой при удалении гена может также явиться удаление одной или нескольких некодирующих РНК, встречающихся в интронах и экзонах.

В данной работе была получена новая мутантная линия мышей NRF2 ^{Δ Neh2}, несущая

Принятые сокращения: МЭФы — мышинные эмбриональные фибробласты; AOX1 — альдегидоксидаза-1; CCL2 — белок-аттрактант моноцитов; GOx — глюкозооксидаза; GSTA4 — глутатион-S-трансфераза A4; HMOX1 — гемоксигеназа-1; KEAP1 — Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1; Neh — Nrf2-ECH гомологичный; NRF2 — ядерный фактор 2, родственник эритроидному фактору 2; NQO1 — NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза; VCAM-1 — молекула адгезии 1 клеток сосудов.

замену 8 аминокислот на *N*-концевом участке *NRF2*, осуществлена характеристика мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФов) и определены изменения в уровне мРНК ряда генов-мишеней *NRF2* в различных тканях этих животных. Данная линия мышей может быть использована как модельный объект для изучения эмбриональной смертности, различных патологий, сопровождающихся окислительным стрессом и воспалением, а также для изучения процессов старения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание животных. Животные содержались в индивидуально вентилируемых клетках (система IVC, «TECNIPLAST S.p.A.», Италия) при свободном доступе к гранулированному комбикорму и воде, очищенной обратным осмосом; в среде, свободной от специфических патогенов, при световом режиме 12/12 (включение света в 09:00), в помещениях с кратностью воздухообмена не менее 15 об./ч, с температурой воздуха 20–24 °С, влажностью 30–70%. В качестве подстилки использована деревянная щепа с минимальным образованием пыли. В качестве обогащения среды использованы укрытия и строительные материалы для гнёзд из натуральных материалов. Все материалы, поступающие к животным, стерилизованы путём автоклавирувания.

Создание линии трансгенных животных. Работа с мышами была поддержана локальной комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митотехнологий МГУ», протокол № 79 от 28 апреля 2015 г. Изменение в гене *Nfe2l2* осуществляли с применением технологии CRISPR/Cas9. Гидовая РНК (5'-GACCTGGAGTTGCCACCGCC) к первому экзону этого гена была выбрана с использованием сервиса Feng Zhang lab's (<https://www.zlab.bio/resources>). Соответствующая единая гидовая РНК (егРНК) была получена путём транскрипции T7 *in vitro* (MEGAscript™ T7 Transcription Kit, «Thermo Fisher Scientific») на матрице, полученной путём ПЦР-амплификации плазмиды pX458 [19] с прямым праймером: 5'-TGTAATACGACTCACTATAGGGAAGTTGGAGTTGCCACCGCCCGTTTAGAGCTAGAAATAGC и обратным праймером: 5'-AGCACCGACTCGGTGCCACT. Полученную егРНК смешивали с мРНК Cas9 (GeneArt™ CRISPR Nuclease, «Thermo Fisher Scientific») в ТЕ-буфере (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM ЭДТА, pH 8).

Одноклеточные эмбрионы для последующей микроинъекции генетической конструк-

ции были выделены из яйцевода самок мышей согласно стандартному протоколу [20]. Самки-доноры зигот предварительно были гормонально стимулированы по схеме, описанной Averina et al. [21], и оплодотворены самцами соответствующей линии [21].

Микроинъекцию генетической конструкции в пронуклеус оплодотворённой яйцеклетки осуществляли в среде для промывки ооцитов с феноловым красным, pH 7,4, без гепарина («CooperSurgical, Inc.», США), окружённой вазелиновым маслом (АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, Россия), на инвертированном микроскопе (ECLIPSE Ti, «Nikon», Япония) с помощью двух микроманипуляторов (TransferMan 4R, «Eppendorf», Германия), согласно протоколу [20].

Зиготы после микроинъекции инкубировали с 5% CO₂ при 37 °С в среде Sequential Fert™ с феноловым красным («CooperSurgical, Inc.»).

После инкубации выжившие эмбрионы были подсажены в воронку яйцевода суррогатным самкам, согласно стандартному протоколу [20].

После рождения и завершения периода лактации у мышей, развившихся из эмбрионов, которые перенесли микроинъекцию генетической конструкции, производили отбор биологического материала путём отсечения кончика хвоста, согласно руководству FELASA по генотипированию трансгенных грызунов [22]. Образцы тканей для идентификации генотипа мышей замораживали при –20 °С до проведения генотипирования.

Полученных гетерозиготных мышей (*Nrf2*^{wt/ΔNeh2}) во избежание потенциального влияния вторичных мутаций перекрещивали на инбредную линию C57BL/6J. Гомозиготные особи *Nrf2*^{ΔNeh2/ΔNeh2} и мыши дикого типа *Nrf2*^{wt/wt} были получены от скрещивания гетерозиготных пар *Nrf2*^{wt/ΔNeh2}.

Генотипирование мышей. Для выделения геномной ДНК из образцов тканей использовали метод щелочной экстракции [23] с дополнительной очисткой ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Для генотипирования использовали набор Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) с 50 нг геномной ДНК. На матрице ДНК проводили ПЦР1 с набором праймеров mNrf-F476 (5'-GCAGGCTATCTCCTAGTTCT) и mNrf-R668 (5'-CGGCTTCTTGGCACAG), а также ПЦР2 с праймерами mNrf-F476 и mNrf-R1153 (5'-GACAGGCGTGATCTTACAG). Условия ПЦР: 95 °С – 5 мин, затем 35 циклов (95 °С – 25 с, 60 °С – 25 с, 72 °С – 25 с). Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1,5%-ном агарозном геле.

Получение МЭФов. Получение МЭФов из 10–14-дневных эмбрионов мышей, полученных при скрещивании гетерозигот $Nrf2^{wt/\Delta Nch2}$, проводили согласно методике, описанной в статье Qiu et al. [24]. Клетки культивировали на питательной среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) («ПанЭко», Россия).

Выделение РНК, обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. Выделение общей клеточной РНК производили с помощью набора реактивов «QuickRNA MiniPrep» («ZymoResearch», США) по протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 («Thermo Fisher Scientific»), качество РНК подтверждали электрофоретически. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора SuperScript III («Thermo Fisher Scientific»), как описано ранее [25], для последующего анализа с помощью ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем EvaGreen I («Синтол», Россия). Для ПЦР в реальном времени использовали следующие праймеры: *Hmox1* (прямой: 5'-CACGCATATACCCGCTACC; обратный: 5'-TCATCTCCAGAGTGTTTCATTCG), *Nqo1* (прямой: 5'-GTCCTCCATCAAGATTCG; обратный: 5'-GCTAACTGCTAACTGCTAA), *Aox1* (прямой: 5'-CATAGGTCAGGTTGAAGGT; обратный: 5'-GGCAGGAATCTTGTATTGG), *Gsta4* (прямой: 5'-AGCAACATTCCTACAATTAAGAAGT; обратный: 5'-TCCTGACCACCTCAACATAG), *Vcam1* (прямой: 5'-CCCTCCACAAACCAAGCC; обратный: 5'-CCATTCCAGTCACTTCAACG), *Il-6* (прямой: 5'-ACCGCTATGAAGTTCCTCTC; обратный: 5'-CTCTGTGAAGTCTCCTCTCC), *Cxcl8* (прямой: 5'-ACTTCAAGAACATCCAGAGC; обратный: 5'-CTTCCAGGTCAGTTAGCC). Нуклеотидные последовательности праймеров для *Ccl2* и референсных генов *Rpl32* и *Gapdh* приведены в работе Zinovkin et al. [26].

Вестерн-блот. МЭФы лизировали в горячем SDS-буфере (62,5 мМ Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 мМ ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) 5 мин при 94 °С. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном SDS-ПААГ, переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad», США), последовательно инкубировали с антителами к NRF2 («Invitrogen», США) и вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, мечеными пероксидазой хрена («Sigma-Aldrich», США). Для пероксидазы использовали субстрат West Dura Extended Duration Substrate («Thermo Fisher Scientific»), изображения получали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc («Bio-Rad»).

Цитотоксический тест. Резазуриновый тест проводили по стандартному протоколу, как описано ранее [25]. Опыты по изучению действия окислительного стресса на выживаемость МЭФов проводили при действии на клетки 250 мкМ H_2O_2 («Экотекс», Россия) и 3 ед./мл глюкозооксидазы (GOx) («Sigma-Aldrich») в течение 3 ч, $n = 3$.

Секвенирование ДНК. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer («Thermo Fisher Scientific»).

Статистический анализ. Анализ результатов скрещивания мышей проводили с помощью критерия χ^2 . Разницу в уровне экспрессии генов между группами, а также в выживаемости МЭФов определяли с помощью непарного t -теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение мышей с мутацией в гене *Nfe2l2*. С использованием технологии CRISPR/Cas9 и гидовой РНК, соответствующей первому экзону гена *Nfe2l2*, была получена самка мыши F0, в геноме которой имелась делеция 284 нт, затрагивающая границу первых экзона и интрона гена *Nfe2l2* (рис. 1). Для устранения влияния возможных вторичных мутаций, вызванных неспецифическим действием геномного редактирования, проводили последовательные скрещивания гетерозигот с инбредными мышами линии C57BL/6J на протяжении десяти поколений. Затем при скрещивании гетерозигот были получены разнополые гомозиготные особи, а также особи дикого типа и гетерозиготы.

Наблюдаемая делеция в участке, затрагивающем сайт сплайсинга (5'-CAG | GTGCTG CCC) между первыми экзоном и интроном гена *Nfe2l2*, теоретически могла приводить к нарушению сплайсинга пре-мРНК *Nfe2l2* и последующей деградации этого транскрипта. Таким образом, можно было бы ожидать получения животного, нокаутного по *Nfe2l2*. Однако секвенирование кДНК гена *Nfe2l2* обнаружило делецию кодонов, кодирующих 8 аминокислотных остатков 3'-концевого участка первого экзона (PPGLQSQQ), которые были замещены двумя аминокислотами (RW), образовавшимися при трансляции некодирующего участка первого интрона (рис. 1, б). При этом остальная часть NRF2 осталась неизменной. На основании полученных данных был сде-

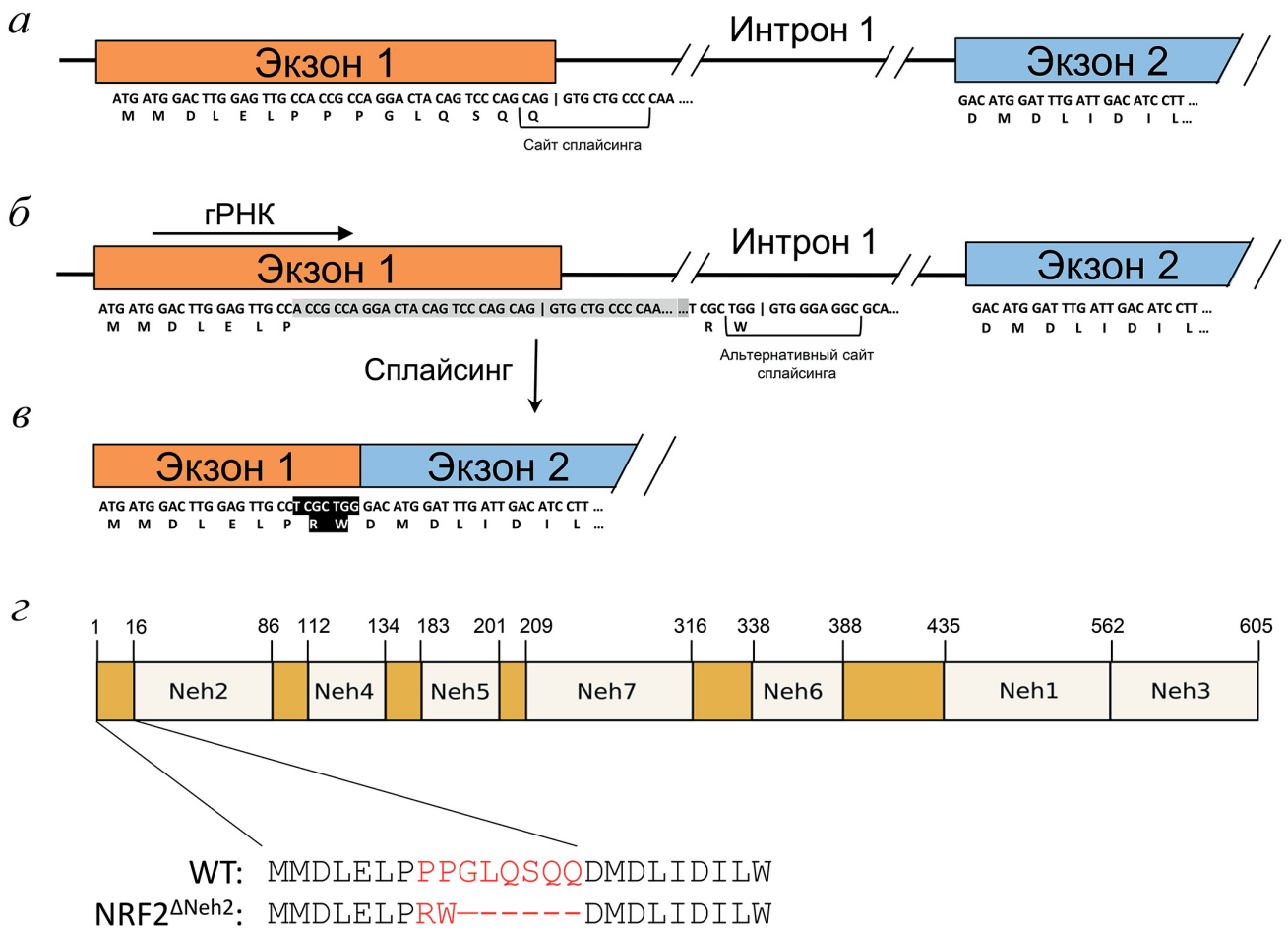


Рис. 1. Схема получения мышей NRF2^{ΔNeh2} с мутацией в гене *Nfe2l2*. **а** – Участок последовательности пре-мРНК гена *Nfe2l2* дикого типа (WT). **б** – Последовательность пре-мРНК гена *Nfe2l2* с делецией, полученной с помощью CRISPR/Cas9 и гидовой РНК (гРНК). Серым цветом обозначен делетированный участок гена, также на схеме отмечен альтернативный сайт сплайсинга в первом интроне гена. **в** – Последовательность зрелой сплайсированной мРНК гена *Nfe2l2* с внесённой мутацией (замены аминокислот выделены чёрным цветом). **г** – Доменная схема белка NRF2 и сравнение аминокислотных последовательностей этих белков у мышей NRF2^{ΔNeh2} и WT. Внесённая мутация находится на N-конце NRF2 и представляет собой делецию 8 а.о. (PPGLQSQQ), которые были замещены двумя аминокислотами (RW), образовавшимися при трансляции некодирующего участка первого интрона. Мутация затрагивает позиции 8–15, которые находятся рядом с доменом Neh2, отвечающим за связывание NRF2 со своим негативным регулятором KEAP1

лан вывод, что в полученной линии мышей NRF2^{ΔNeh2} происходит альтернативный сплайсинг за счёт активности скрытого донорного сплайс-сайта (5'-TGG | GTGGGAGGC) в первом интроне гена *Nfe2l2*. Несмотря на то что нам не удалось получить мышью, нокаутную по гену *Nfe2l2*, работа на этой уникальной модели с мутацией в этом гене была продолжена.

Гомозиготные мыши NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} проявляют повышенную эмбриональную летальность. Всего в результате скрещиваний гетерозиготных мышей было получено 22 особи дикого типа (37%), 34 гетерозигот (57%) и 3 гомозигот (5%). Количество полученных генотипов не соответствовало менделевскому типу наследования ($P = 0,001$ по тесту χ^2), что привело к предположению о повышенной внутриутробной летальности гомозигот. Действительно,

при анализе эмбрионов, полученных на 9, 11 и 17–21 дни после зачатия, были обнаружены признаки анемии и смерть некоторых гомозиготных зародышей (рис. 2). Всего было проанализировано 55 эмбрионов, из которых 12 были генотипированы как особи дикого типа (22%), 29 – как гетерозиготы (53%) и 14 – как гомозиготы (25%) ($P = 0,81$ по тесту χ^2).

МЭФы гомозиготных NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2}-мышей обладают пониженной устойчивостью к окислительному стрессу. Окислительный стресс в МЭФах индуцировали добавлением 250 мкМ H₂O₂ или 3 ед./мл GOx на 3 ч. При индукции окислительного стресса с помощью H₂O₂ выживаемость МЭФов, полученных от гомозиготных мутантных мышей, была незначительно меньше, чем у клеток, полученных от особей дикого типа (рис. 3). При добавле-

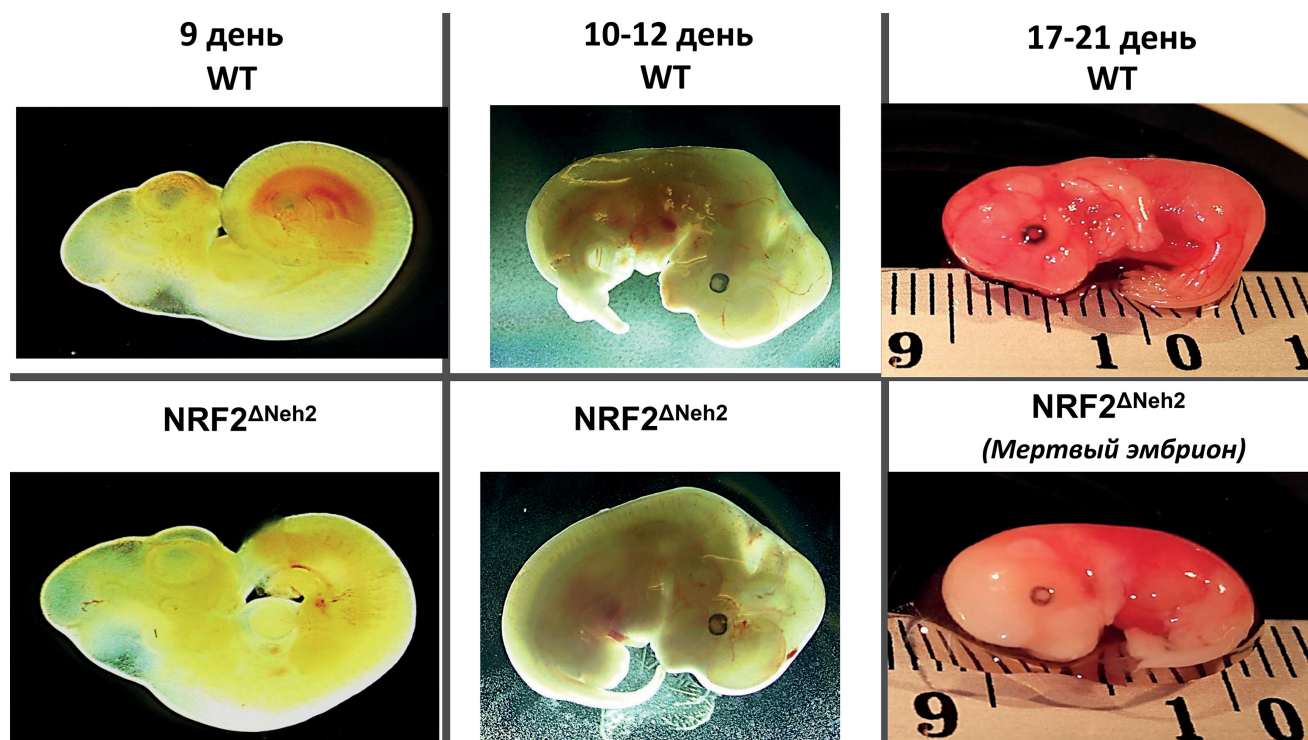


Рис. 2. Репрезентативные фотографии эмбрионов мышей дикого типа (WT) и гомозиготных мышей с мутацией в гене *Nfe2l2* ($\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$). При анализе эмбрионов, полученных при скрещивании гетерозигот на 9, 10–12 и 17–21 дни, у гомозигот $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$ наблюдаются признаки анемии

нии GOx выживаемость МЭФов, полученных от особей дикого типа, составила 50%, а клеток, полученных от гомозиготных мутантных особей, – 30%. Таким образом, МЭФы животных с мутацией в гене *Nrf2* оказались менее устойчивы к окислительному стрессу, индуцированному добавлением GOx, чем клетки дикого типа.

МЭФы гомозиготных $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}/\Delta\text{Neh2}}$ -мышей имеют пониженный уровень экспрессии мРНК *Nfe2l2* и его генов-мишеней. В МЭФах с мутацией в гене *Nfe2l2* гомозигот наблюдали тенденцию к снижению экспрессии *Nfe2l2* и его генов-мишеней, а также повышение количества мРНК маркера воспаления *Ccl2* (рис. 4, а). Интересно отметить, что при анализе одной и той же пробы мРНК и белка NRF2 в МЭФах количество мРНК *Nfe2l2* у $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$ -мышей было в ~10 раз меньше, чем у мышей дикого типа, а количество белка NRF2 практически не отличалось (рис. 4, б, в).

В тканях гомозиготных $\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}/\Delta\text{Neh2}}$ -мышей снижен уровень мРНК *Nfe2l2* и некоторых его таргетных генов, а экспрессия маркеров воспаления *Ccl2*, *Vcam1* и *Cxcl8* повышена.

В печени гомозиготных мутантных особей наблюдали двукратное снижение экспрессии NRF2 и его мишени *Nqo1*, небольшое снижение экспрессии двух других мишеней NRF2 – *Aox1* и *Gsta4* (рис. 5, а). Также в печени мутантных

животных происходило двукратное увеличение количества мРНК гена *Ccl2* – одного из маркеров воспаления. В мозге гомозиготных мутантных животных наблюдали двукратное снижение экспрессии NRF2 и его гена-мишени *Aox1*, количество мРНК других генов почти не изме-

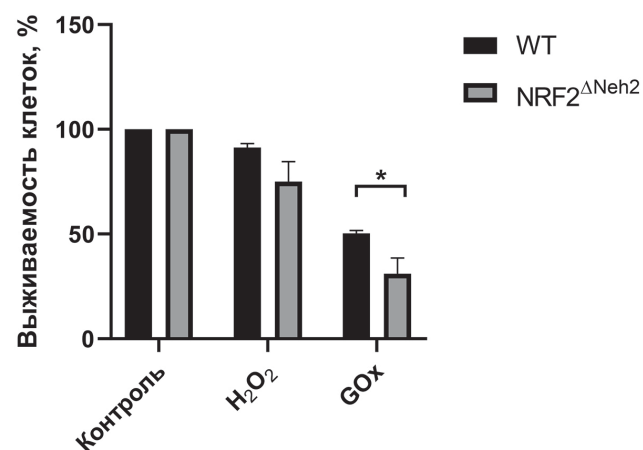


Рис. 3. МЭФы гомозиготных мутантных животных ($\text{NRF2}^{\Delta\text{Neh2}}$) обладают большей чувствительностью к окислительному стрессу, индуцированному GOx, чем МЭФы животных дикого типа (WT). Гибель клеток была индуцирована перекисью водорода (250 мкМ) и GOx (3 ед./мл). Приведены результаты выживаемости фибробластов (резазуриновый тест). Указано среднее значение $\pm$ SEM, $n = 3$. * $p < 0,05$ при сравнении с WT по непарному t -тесту Стьюдента

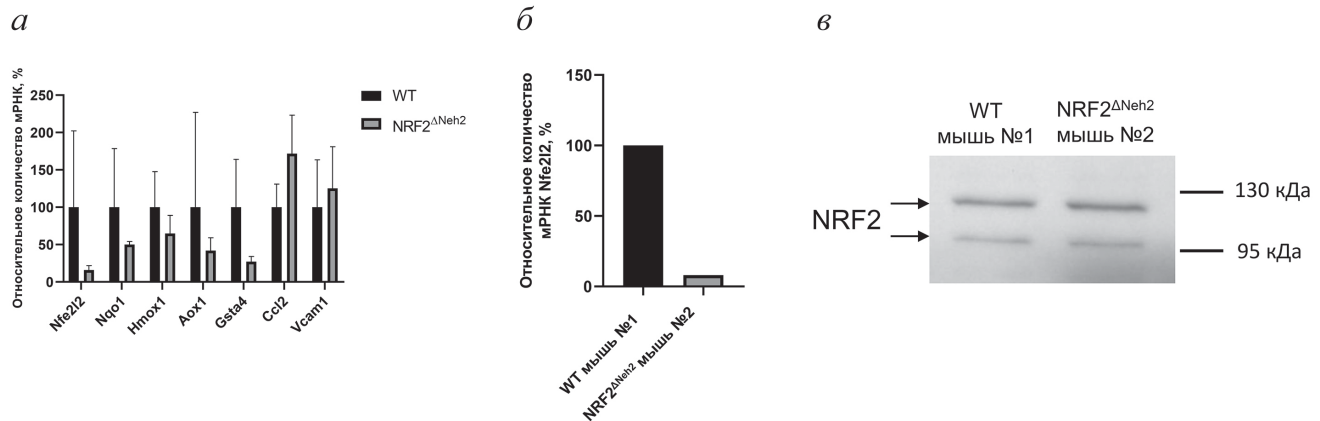


Рис. 4. Уровень экспрессии *Nfe2l2*, его генов-мишеней, а также генов-маркеров воспаления в МЭФах гомозигот *NRF2*^{ΔNeh2/ΔNeh2} (*NRF2*^{ΔNeh2}) и мышей дикого типа *NRF2*^{wt/wt} (WT). *a* – Данные ПЦР в реальном времени, отражающие относительный уровень мРНК в МЭФах мышей дикого типа и гомозигот по мутации в *Nfe2l2*. Соответствующие гены: *Hmox1* – гемоксигеназа-1, мишень NRF2; *Nqo1* – NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза-1, мишень NRF2; *Aox1* – альдегидоксидаза-1, мишень NRF2; *Gsta4* – глутатион-S-трансфераза A4, мишень NRF2; *Ccl2* – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; *Vcam1* – молекула адгезии 1 клеток сосудов. За 100% принят уровень мРНК для WT. Указано среднее значение $\pm$ SEM, $n = 4$. *б* – Относительное количество мРНК *Nfe2l2* в МЭФах особи № 1 (WT) и МЭФах гомозиготы № 2 (*NRF2*^{ΔNeh2}). *в* – Вестерн-блот с NRF2 в МЭФах особи № 1 (WT) и № 2 (*NRF2*^{ΔNeh2}).

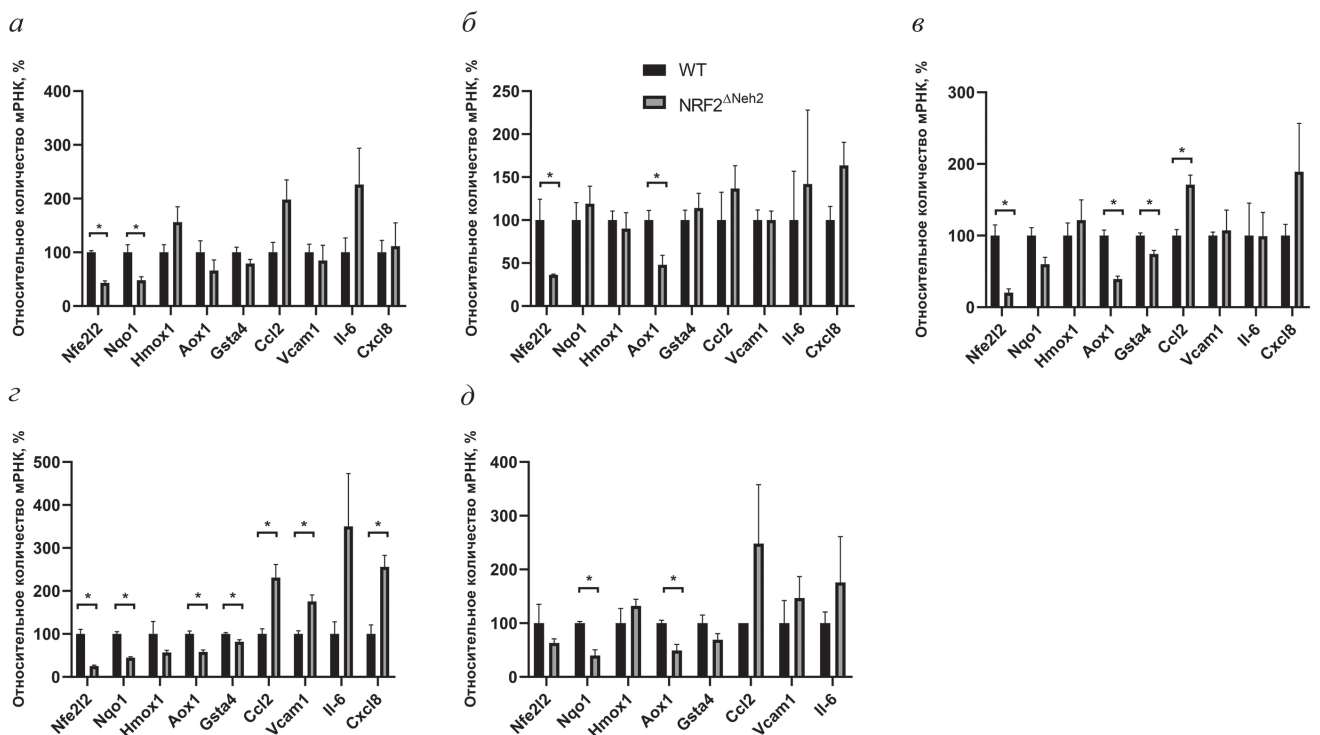


Рис. 5. Уровень экспрессии NRF2, его генов-мишеней, а также генов-маркеров воспаления в тканях животных дикого типа (WT) и гомозигот по мутации в *Nfe2l2* (*NRF2*^{ΔNeh2}). Результаты ПЦР в реальном времени, отражающие относительное количество мРНК в печени (*a*), мозге (*б*), сердце (*в*), почке (*г*) и передней большеберцовой мышце (*musculus tibialis anterior*) (*д*) *NRF2*^{ΔNeh2} и WT. *Hmox1* – гемоксигеназа-1, мишень NRF2; *Nqo1* – NAD(P)H:хинон оксидоредуктаза-1, мишень NRF2; *Aox1* – альдегидоксидаза-1, мишень NRF2; *Gsta4* – глутатион-S-трансфераза A4, мишень NRF2; *Ccl2* – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1; *Vcam1* – молекула адгезии 1 клеток сосудов; *Il-6* – интерлейкин 6; *Cxcl8* – интерлейкин 8, хемокин. За 100% принят уровень мРНК для WT. Указано среднее значение $\pm$ SEM, $n = 3$. * $p < 0,05$ при сравнении с WT по непарному *t*-тесту Стьюдента

нялось (рис. 5, б). В сердце мышей, гомозиготных по мутации в *Nrf2*, наблюдали значительное снижение количества мРНК гена *Nfe2l2* и его мишени *Aox1* и небольшое снижение уров-

ня экспрессии *Nqo1* (рис. 5, в). Также в сердце *NRF2*^{ΔNeh2}-животных происходило небольшое увеличение уровня мРНК *Ccl2*. В почках *NRF2*^{ΔNeh2}-мышей происходило значительное

снижение уровня экспрессии *Nfe2l2*, *Nqo1* и *Aox1*, а также увеличение количества мРНК генов-маркеров воспаления *Ccl2*, *Vcam1* и *Cxcl8* (рис. 5, *з*). В передней большеберцовой мышце (*tibialis anterior*) гомозиготных по мутации *Nfe2l2* животных наблюдали уменьшение количества мРНК *Nfe2l2*, *Nqo1* и *Aox1*, небольшое снижение экспрессии *Gsta4* и увеличение количества мРНК маркера воспаления *Ccl2* (рис. 5, *д*). Удивительно, но ни в одной из исследованных тканей не происходило значимого изменения уровня экспрессии *Hmox1*. Измерение относительного уровня мРНК хемокина *Cxcl8* в большеберцовой мышце, а также мРНК цитокинов *Tnf* и *IL-1 β* во всех тканях оказалось невозможным в связи с высокими значениями пороговых циклов детекции (*Ct* > 35 циклов).

Таким образом, в тканях гомозиготных *NRF2* ^{Δ Neh2/ Δ Neh2}-мышей происходит снижение уровня экспрессии как самого *Nfe2l2*, так и некоторых его мишеней, и одновременно увеличен уровень экспрессии некоторых маркеров воспаления.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе данной работы были получены животные с мутацией в гене, кодирующем транскрипционный фактор NRF2 (рис. 1). Мутация затрагивает 8 аминокислотных остатков, находящихся в первом экзоне *N*-концевой части последовательности NRF2 в позициях 8–15, и включает в себя делецию аминокислот PPGLQSQQ с замещением их на аминокислоты RW. На *N*-концевой части NRF2 располагается домен Neh2, отвечающий за связывание NRF2 со своим негативным регулятором KEAP1, но аминокислотные остатки, находящиеся на позициях 1–15, обычно не включают в состав домена Neh2, так как они не являются консервативными среди белков, гомологичных NRF2 [27, 28]. Тем не менее в работе McMahon et al. [11] было показано, что делеция аминокислотных остатков 1–16 приводит к небольшому увеличению времени полужизни NRF2, причём этот эффект не связан с нарушением убиквитинирования белка. В данной работе было показано, что несмотря на то что введённая мутация затрагивает неконсервативный участок аминокислотной последовательности NRF2, она тем не менее оказывает влияние на функционирование белка, что проявляется в повышенной эмбриональной смертности мутантных животных, снижении устойчивости полученных от животных

МЭФов к окислительному стрессу, пониженном количестве мРНК *Nfe2l2* и некоторых его мишеней, а также повышенной экспрессии маркеров воспаления в МЭФах и некоторых органах гомозигот *NRF2* ^{Δ Neh2/ Δ Neh2}.

Известно, что понижение уровня NRF2 приводит к снижению устойчивости клеток и тканей к окислительному стрессу. Так, гипероксия вызывала более выраженные повреждения лёгких у нокаутных по *Nfe2l2* мышей по сравнению с мышами дикого типа [29]. У этих же животных под воздействием сигаретного дыма и дизельных выхлопов наблюдалось повышение уровня 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина, что свидетельствует об окислительном повреждении ДНК [30, 31]. Помимо этого, у нокаутных мышей при воздействии аллергенов, приводящих к воспалению дыхательных путей, наблюдается усиление окислительного повреждения [32], аналогичный эффект наблюдается и при сепсисе [33]. Ранее было показано, что МЭФы нокаутных по *Nfe2l2* мышей имеют повышенную чувствительность к окислительному стрессу, вызванному дикуват дибромидом [34], а также органическими и неорганическими перекисями [35]. В соответствии с вышеперечисленными наблюдениями, в нашей работе мы также наблюдали снижение выживаемости мутантных по *Nfe2l2* МЭФов (рис. 3).

Неожиданным результатом нашей работы явилось наблюдение, что мутация в *N*-концевой области NRF2 приводит к повышенной эмбриональной летальности (рис. 2). Часть гомозиготных эмбрионов имела признаки анемии, что может быть следствием нарушения производства эритроцитов, эритропоэза. Интересно отметить, что изучение транскрипционного фактора NRF2 началось благодаря открытию его роли в эритропоэзе, что отражено в его названии (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2): NRF2 был обнаружен как белок, узнающий промоторную область гена бета-глобина [36]. Однако у полученных нокаутных по NRF2 мышей не наблюдали каких-либо патологий, связанных с эритропоэзом, и также у них не наблюдалось анемии, эмбриональной летальности или снижения фертильности [17]. Можно предположить, что внесённая в NRF2 мутация могла повлиять на эритропоэз у гомозиготных мышей другим способом: например, нарушить способность NRF2 регулировать экспрессию генов, ответственных за биосинтез гемов — ключевых компонентов гемоглобина (см. обзор Kerins et al. [37]). Тем не менее точные причины и механизмы смерти эмбрионов остаются неизвестными.

В МЭФах гомозиготных мышей $NRF2^{\Delta Nch2}$ наблюдали снижение уровня мРНК *Nfe2l2*, а также снижение уровня мРНК большинства его мишеней (рис. 4, а). Такое снижение также наблюдалось в тканях гомозиготных животных (рис. 5), что свидетельствует о нарушении транскрипционной активности *NRF2* у этих мышей. Подобные изменения в профиле экспрессии генов были ранее описаны в различных тканях нокаутных по *Nfe2l2* мышей [38–41]. Интересно отметить, что несмотря на то что уровень мРНК *Nfe2l2* в МЭФах $NRF2^{\Delta Nch2}$ гомозигот был понижен по сравнению с диким типом, количество белка на Вестерн-блоте практически не отличалось (рис. 4, б, в). Вероятно, это может быть следствием увеличения времени жизни белка $NRF2^{\Delta Nch2}$, как было описано в работе McMahon et al. [11], однако это предположение требует дальнейшей проверки.

Известно, что под контролем *NRF2* находятся гены, продукты которых регулируют воспалительный ответ [42, 43]. Как правило, активация *NRF2* снижает воспалительный ответ в различных моделях *in vitro* и *in vivo*, в том числе путём уменьшения экспрессии генов хемокина *Ccl2* и молекулы межклеточной адгезии *Vcam1* [44]. В большинстве тканей $NRF2^{\Delta Nch2}$ -мышей наблюдался повышенный уровень экспрессии этих генов (рис. 5), что позволяет предположить, что полученная линия мышей может быть использована как модель с избыточной воспалительной активацией в разных тканях, в том числе почечных, поскольку именно в почках наблюдали наибольшие изменения в экспрессии этих генов (рис. 5, г).

Под контролем *NRF2* также находятся гены, регулирующие антиоксидантный ответ клетки: диафораза *Nqo1*, а также гены, кодирующие ключевые ферменты биосинтеза глутатиона: глутатион-трансферазы и глутаматцистеин-лигазы. Снижение уровня мРНК *Nqo1* и *Gsta4* наблюдалось во многих тканях

$NRF2^{\Delta Nch2}$ -мышей (рис. 5), что может свидетельствовать о нарушении редокс-гомеостаза и предполагает развитие окислительного стресса у данной линии животных, однако этот вопрос не исследовали в данной работе.

Таким образом, в нашей работе была получена новая мутантная линия мышей с заменой 8 аминокислот на *N*-концевом участке *NRF2*, что привело к частичному нарушению функций этого транскрипционного фактора и повышенной эмбриональной смертности. Полученная линия мышей может быть использована как модельный объект для изучения различных патологий развития, связанных с нарушением функций *NRF2*.

Вклад авторов. Е.С. Егоров – проведение экспериментов, написание текста; Н.Д. Кондратенко – проведение экспериментов, статистический анализ и подготовка рисунков (Е.С.Е. и Н.Д.К. внесли равнозначный вклад в работу); О.А. Аверина – работа с лабораторными животными, проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; О.А. Пермяков, М.А. Емельянова, А.С. Приходько – проведение экспериментов; Л.А. Зиновкина, П.В. Сергиев – проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования; Р.А. Зиновкин – написание текста, концепция и руководство работой.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-64-00006.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Ольге Юрьевне Плетюшкиной за неоценимую помощь в работе с МЭФах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа с мышами была поддержана локальной комиссией по биоэтике ООО «НИИ Митоинженерии МГУ», протокол № 79 от 28 апреля 2015 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsui, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 7130–7139, doi: 10.1128/MCB.24.16.7130-7139.2004.
2. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Watai, Y., Tong, K. I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 221–229, doi: 10.1128/MCB.26.1.221-229.2006.
3. Motohashi, H., Katsuoka, F., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (2004) Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6379–6384, doi: 10.1073/pnas.0305902101.

4. Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018) Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1727-1745, doi: 10.1089/ars.2017.7342.
5. Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., and Saso, L. (2020) An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation, *Molecules*, **25**, 5474, doi: 10.3390/molecules25225474.
6. Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006) Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 2887-2900, doi: 10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006.
7. Zhang, D. D., Lo, S.-C., Cross, J. V., Templeton, D. J., and Hannink, M. (2004) Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex, *Mol. Cell Biol.*, **24**, 10941-10953, doi: 10.1128/MCB.24.24.10941-10953.2004.
8. Katoh, Y., Itoh, K., Yoshida, E., Miyagishi, M., Fukamizu, A., and Yamamoto, M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription, *Genes Cells*, **6**, 857-868, doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00469.x.
9. Wang, H., Liu, K., Geng, M., Gao, P., Wu, X., Hai, Y., et al. (2013) RXR α inhibits the NRF2-ARE signaling pathway through a direct interaction with the Neh7 domain of NRF2, *Cancer Res.*, **73**, 3097-3108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3386.
10. Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., and Cuadrado, A. (2011) SCF/ β -TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1121-1133, doi: 10.1128/MCB.01204-10.
11. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2004) Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron, *J. Biol. Chem.*, **279**, 31556-31567, doi: 10.1074/jbc.M403061200.
12. Nioi, P., Nguyen, T., Sherratt, P. J., and Pickett, C. B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10895-10906, doi: 10.1128/MCB.25.24.10895-10906.2005.
13. Karunatilleke, N. C., Fast, C. S., Ngo, V., Brickenden, A., Duennwald, M. L., Konermann, L., et al. (2021) Nrf2, the major regulator of the cellular oxidative stress response, is partially disordered, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7434, doi: 10.3390/ijms22147434.
14. Kansanen, E., Jyrkkänen, H.-K., and Levonen, A.-L. (2012) Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 973-982, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.038.
15. Reddy, N. M., Potteti, H. R., Mariani, T. J., Biswal, S., and Reddy, S. P. (2011) Conditional deletion of Nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **45**, 1161-1168, doi: 10.1165/rcmb.2011-0144OC.
16. Rushworth, S. A., Shah, S., and MacEwan, D. J. (2011) TNF mediates the sustained activation of Nrf2 in human monocytes, *J. Immunol.*, **187**, 702-707, doi: 10.4049/jimmunol.1004117.
17. Lu, X.-Y., Wang, H.-D., Xu, J.-G., Ding, K., and Li, T. (2015) Deletion of Nrf2 exacerbates oxidative stress after traumatic brain injury in mice, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **35**, 713-721, doi: 10.1007/s10571-015-0167-9.
18. Chan, K., Lu, R., Chang, J. C., and Kan, Y. W. (1996) NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13943-13948, doi: 10.1073/pnas.93.24.13943.
19. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **8**, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
20. Cho, A., Haruyama, N., and Kulkarni, A. B. (2009) Generation of transgenic mice, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **42**, 19.11.1-19.11.22, doi: 10.1002/0471143030.cb1911s42.
21. Averina, O. A., Vysokikh, M. Y., Permyakov, O. A., and Sergiev, P. V. (2020) Simple recommendations for improving efficiency in generating genome-edited mice, *Acta Naturae*, **12**, 42-50, doi: 10.32607/actanaturae.10937.
22. Bonaparte, D., Cinelli, P., Douni, E., Hérault, Y., Maas, M., Pakarinen, P., et al. (2013) FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically-modified rodents: a report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group, *Lab. Anim.*, **47**, 134-145, doi: 10.1177/0023677212473918.
23. Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., and Warman, M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT), *Biotechniques*, **29**, 52-54, doi: 10.2144/00291bm09.
24. Qiu, L.-Q., Lai, W. S., Stumpo, D. J., and Blackshear, P. J. (2016) Mouse embryonic fibroblast cell culture and stimulation, *Bio Protoc.*, **6**, e1859, doi: 10.21769/BioProtoc.1859.
25. Zinovkina, L. A., Galivondzhyan, M. K., Prikhodko, A. S., Galkin, I. I., and Zinovkin, R. A. (2020) Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds do not affect estrogen receptor alpha, *PeerJ*, **8**, e8803, doi: 10.7717/peerj.8803.
26. Zinovkin, R. A., Romaschenko, V. P., Galkin, I. I., Zakharova, V. V., Pletjushkina, O. Y., Chernyak, B. V., and Popova, E. N. (2014) Role of mitochondrial

- reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium, *Aging*, **6**, 661-674, doi: 10.18632/aging.100685.
27. Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes Dev.*, **13**, 76-86, doi: 10.1101/gad.13.1.76.
28. Katoh, Y., Iida, K., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Mizukami, M., Tong, K. I., McMahon, M., Hayes, J. D., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2005) Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome, *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 342-350, doi: 10.1016/j.abb.2004.10.012.
29. Cho, H.-Y., Jedlicka, A. E., Reddy, S. P. M., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Zhang, L.-Y., and Kleeberger, S. R. (2002) Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **26**, 175-182, doi: 10.1165/ajrcmb.26.2.4501.
30. Rangasamy, T., Cho, C. Y., Thimmulappa, R. K., Zhen, L., Srisuma, S. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Petrache, I., Tudor, R. M., and Biswal, S. (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice, *J. Clin. Invest.*, **114**, 1248-1259, doi: 10.1172/jci200421146.
31. Aoki, Y., Sato, H., Nishimura, N., Takahashi, S., Itoh, K., and Yamamoto, M. (2001) Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **173**, 154-160, doi: 10.1006/taap.2001.9176.
32. Rangasamy, T., Guo, J., Mitzner, W. A., Roman, J., Singh, A., Fryer, A. D., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Tudor, R. M., Georas, S. N., and Biswal, S. (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice, *J. Exp. Med.*, **202**, 47-59, doi: 10.1084/jem.20050538.
33. Thimmulappa, R. K., Lee, H., Rangasamy, T., Reddy, S. P., Yamamoto, M., Kensler, T. W., et al. (2016) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis, *J. Clin. Invest.*, **116**, 984-995, doi: 10.1172/JCI25790.
34. Osburn, W. O., Wakabayashi, N., Misra, V., Nilles, T., Biswal, S., Trush, M. A., et al. (2006) Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion, *Arch. Biochem. Biophys.*, **454**, 7-15, doi: 10.1016/j.abb.2006.08.005.
35. Higgins, L. G., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M., Itoh, K., Yamamoto, M., and Hayes, J. D. (2009) Transcription factor Nrf2 mediates an adaptive response to sulforaphane that protects fibroblasts *in vitro* against the cytotoxic effects of electrophiles, peroxides and redox-cycling agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **237**, 267-280, doi: 10.1016/j.taap.2009.03.005.
36. Moi, P., Chan, K., Asunis, I., Cao, A., and Kan, Y. W. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9926-9930, doi: 10.1073/pnas.91.21.9926.
37. Kerins, M. J., and Ooi, A. (2018) The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1756-1773, doi: 10.1089/ars.2017.7176.
38. Gebel, S., Diehl, S., Pype, J., Friedrichs, B., Weiler, H., Schüller, J., Xu, H., Taguchi, K., Yamamoto, M., and Müller, T. (2010) The transcriptome of Nrf2^{-/-} mice provides evidence for impaired cell cycle progression in the development of cigarette smoke-induced emphysematous changes, *Toxicol. Sci.*, **115**, 238-252, doi: 10.1093/toxsci/kfq039.
39. Muramatsu, H., Katsuoka, F., Toide, K., Shimizu, Y., Furusako, S., and Yamamoto, M. (2013) Nrf2 deficiency leads to behavioral, neurochemical and transcriptional changes in mice, *Genes Cells*, **18**, 899-908, doi: 10.1111/gtc.12083.
40. Chartoumpekis, D. V., Ziros, P. G., Zaravinos, A., Iskrenova, R. P., Psyrogiannis, A. I., Kyriazopoulou, V. E., Sykiotis, G. P., and Habeos, I. G. (2013) Hepatic gene expression profiling in Nrf2 knockout mice after long-term high-fat diet-induced obesity, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2013**, 340731, doi: 10.1155/2013/340731.
41. Quiles, J. M., Narasimhan, M., Shanmugam, G., Milash, B., Hoidal, J. R., and Rajasekaran, N. S. (2017) Differential regulation of miRNA and mRNA expression in the myocardium of Nrf2 knockout mice, *BMC Genomics*, **18**, 509, doi: 10.1186/s12864-017-3875-3.
42. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 585-597, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
43. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/S0006297920070111.
44. Chen, X.-L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H., and Kunsch, C. (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H1862-H1870, doi: 10.1152/ajpheart.00651.2005.

A NEW MOUSE STRAIN WITH MUTATION IN THE *NFE2L2* (*NRF2*) GENE

E. S. Egorov¹, N. D. Kondratenko^{2,3}, O. A. Averina^{2,4,5}, O. A. Permyakov^{4,5},
M. A. Emelyanova^{4,5}, A. S. Prikhodko^{1,2}, L. A. Zinovkina¹,
P. V. Sergiev^{2,4,5}, and R. A. Zinovkin^{2,6*}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: roman.zinovkin@gmail.com

³ Russian Clinical Research Center for Gerontology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Pirogov Russian National Research Medical University, 129226 Moscow, Russia

⁴ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁵ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

⁶ HSE University, 101000 Moscow, Russia

The transcription factor NRF2 is involved in inflammatory reactions, maintenance of redox balance, metabolism of xenobiotics, and is of particular interest for aging studies. In the present work, CRISPR/Cas9 genome editing technology was used to generate NRF2^{ΔNeh2} mice containing a substitution of eight amino acid residues at the N-terminus of the NRF2 protein, upstream of the functional Neh2 domain, which ensures binding of NRF2 to its inhibitor KEAP1. Heterozygote NRF2^{wt/ΔNeh2} mice gave birth to homozygous mice with lower than expected frequency, accompanied by their increased embryonic lethality and visual signs of anemia. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} homozygotes showed impaired resistance to oxidative stress compared to wild-type MEFs. The tissues of homozygous NRF2^{ΔNeh2/ΔNeh2} animals had a decreased expression of NRF2 target genes: NAD(P)H: Quinone oxidoreductase-1 (*Nqo1*); aldehyde oxidase-1 (*Aox1*); glutathione-S-transferase A4 (*Gsta4*); while the relative mRNA level of monocyte chemoattractant protein 1 (*Ccl2*), vascular cell adhesion molecule 1 (*Vcam1*) and chemokine *Cxcl8* was increased. Thus, the resulting mutation in the *Nfe2l2* gene partially impaired the function of this transcription factor, expanding the insights into the functional role of the unstructured N-terminus of NRF2. The obtained NRF2^{ΔNeh2} mouse line can be used as a model object for studying various pathologies associated with oxidative stress and inflammation.

Keywords: transcription factor NRF2, transgenic animals, inflammation, oxidative stress