

На правах рукописи



**КОРОСТИНА
ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА**

**ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
ЗНАЧИМОСТИ БЕЛКА КАИЗО В ОРГАНИЗМЕ ВЗРОСЛЫХ
МЫШЕЙ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г.Москва.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Жигалова Надежда Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор РАН,
Лагарькова Мария Андреевна
ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр
Физико-Химической Медицины федерального
медико-биологического агентства,
зав. лабораторией клеточной биологии

доктор биологических наук, профессор,
Колосова Наталия Гориславовна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики» СО РАН,
зав. сектором молекулярных механизмов
старения

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научно-
Исследовательский Институт морфологии
человека», г. Москва

Защита диссертации состоится «...»2016 года на заседании диссертационного совета по защите диссертаций Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), в конференц-зале Института по адресу: проспект Лаврентьева, 10, г.Новосибирск, 630090 Тел (383) 3634906, факс (383) 3331278, email: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Метилирование ДНК — важная эпигенетическая модификация в геноме высших эукариот. У позвоночных животных метилированию ДНК подвергается от 60% до 80% CpG динуклеотидов. Одним из механизмов регуляции транскрипции генов является привлечение к метилированной ДНК крупных белковых комплексов (Defossez and Stancheva 2011; Fillion et al. 2006). Метил-ДНК связывающие белки осуществляют связывание с метилированными сайтами ДНК либо за счет метил-ДНК связывающих доменов MBD (MBD семейство белков: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3), либо за счет домена «цинковые пальцы» (Каизо подобное семейство белков: Kaiso/ZBTB33, ZBTB4, ZBTB38). Такие белки выступают в качестве транскрипционных факторов самостоятельно или привлекают к регуляторным элементам генома различные гистоновые деацетилазы и корепрессорные белковые комплексы. Метил-ДНК связывающие белки «читают», а затем «интерпретируют» эпигенетические сигналы, что обеспечивает связь между метилированием ДНК и модификациями гистонов. Мутации в генах метил-ДНК связывающих белков могут приводить к разным нарушениям у позвоночных животных.

Белок Каизо является членом VTB/POZ семейства метил-ДНК связывающих белков. Каизо связывает метилированные CpG динуклеотиды за счет С-концевого домена «цинковые пальцы» C2H2 типа. На N-конце белка находится VTB/POZ домен, обладающий способностью к привлечению крупных репрессивных комплексов к метилированной ДНК, например, корепрессора NCoR в комплексе с гистоновой деацетилазой (Yoon et al. 2003). Таким образом, Каизо является репрессором транскрипции многих генов. В отсутствие Каизо нарушается эмбриогенез у земноводных и рыб, однако, генетический нокаут *Kaizo* у мышей не приводит к ярко выраженному фенотипу, и мыши развиваются здоровыми и фертильными (Prokhortchouk et al. 2006).

На данный момент практически отсутствуют достоверные данные о локализации белка Каизо в организме млекопитающих. В ряде статей учёные пытались изучить связь локализации Каизо в клетке со злокачественными характеристиками различных опухолей у человека, но до сих пор этот вопрос остаётся спорным (Qin et al. 2015). Отсутствие отрицательных контролей для первичных антител на Каизо затрудняет достоверную интерпретацию полученных данных и не исключает неспецифическое окрашивание. Использование мышинной модели с генетическим нокаутом *Kaizo* является единственным контролем специфичности антител при изучении экспрессии белка Каизо в тканях и органах млекопитающих.

Другой актуальной задачей является изучение роли белка Каизо в центральной нервной системе млекопитающих. Ген *Kaizo*, как и ген *MeCP2*, находится на X-хромосоме. Известно, что мутации в гене *MeCP2*

связаны с серьёзным психоневрологическим заболеванием у девочек – синдромом Ретта (Roux and Villard 2010). В результате *in situ* РНК-гибридизации было выявлено наличие мРНК *Kaizo* во многих структурах мозга (Della Ragione et al. 2006). Тройной генетический нокаут *MeCP2/MBD2/Kaizo* приводит к временному нарушению дифференцировки нейронов на ранних этапах (Martín Caballero et al. 2009). Отсутствие белка Каизо не приводит к патологиям структур мозга у мышей, но в процессе содержания наблюдается их высокая подвижность по сравнению с мышами дикого типа линии C57BL/6 (WT). В связи с этим необходимо проведение детального поведенческого и морфологического фенотипирования мышей с генетическим нокаутом *Kaizo* (КО).

Несмотря на то, что отсутствие Каизо у мышей не приводит к ярко выраженному фенотипу, при скрещивании мышей КО с мышами линии *Apc^{Min/+}*, которая несёт мутацию опухолевого супрессора *APC* (adenomatous polyposis coli), у потомков происходит увеличение продолжительности жизни и устойчивости к образованию полипов в кишечнике (Prokhortchouk et al. 2006). С другой стороны, в генетической модели *Kaizo^{Tg/+}* с локальным увеличением экспрессии *Kaizo* в кишечнике, происходит спонтанное развитие хронических воспалительных процессов (Chaudhary et al. 2013). Скрещивание мышей линии *Kaizo^{Tg/+}* с мышами *Apc^{Min/+}* приводит к снижению продолжительности жизни и увеличению количества полипов у потомков (Pierre et al. 2015). Данные результаты предполагают возможное участие Каизо в развитии хронического воспаления и рака кишечника, а использование моделей острого токсического воспаления позволят подробнее изучить механизмы его участия в этих процессах.

Таким образом, изучение локализации и функциональной значимости белка Каизо является актуальным и необходимым для более полного понимания его роли в организме мышей.

Целью настоящей работы явилось изучение локализации и функций белка Каизо в организме взрослых мышей с использованием модели генетического нокаута.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить локализацию белка Каизо в клетках и тканях мышей;
2. Провести поведенческое фенотипирование нокаутных по гену *Kaizo* мышей, оценить методом МРТ морфологические параметры мозга;
3. Определить влияние нокаута гена *Kaizo* на развитие острого воспалительного процесса в кишечнике мышей в ответ на воздействие декстран сульфата натрия (ДСН).

Научная новизна

Использование в качестве отрицательного контроля мышей, нокаутных по гену *Kaizo*, позволило впервые специфично детектировать

белок Каизо в организме взрослых мышей и установить, что Каизо экспрессируется в ядрах клеток эпителиальных тканей, различных структур мозга и репродуктивных органов. Исключение представляют фотосенсорные клетки сетчатки, где Каизо экспрессируется в цитоплазме. Показано, что Каизо может являться маркером сперматогониальных стволовых клеток.

Впервые было проведено морфологическое и поведенческое фенотипирование КО мышей. Было выявлено, что нокаут *Каизо* приводит к уменьшению объёма боковых желудочков мозга, а также к повышению двигательной и исследовательской активности, увеличению способности ЦНС к сенсомоторной фильтрации, ухудшению обучаемости и пространственной памяти.

Впервые было показано, что отсутствие белка Каизо существенно сдерживает развитие острого воспаления в толстом кишечнике при воздействии декстран сульфата натрия, что расширяет и дополняет исследования роли Каизо в хроническом воспалении.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Результаты настоящей работы существенно расширяют представления о локализации белка Каизо в органах и тканях мыши. Представленные иммуногистохимические данные могут быть использованы учёными как стандарт, необходимый для получения достоверных окрашиваний и правильной интерпретации результатов. Кроме того, белок Каизо может быть использован как маркер сперматогониальных стволовых клеток в исследованиях мужской репродуктивной системы.

Полученные данные о морфологических изменениях в мозге и в поведении являются доводом в пользу применения новой и перспективной линии мышей с генетическим нокаутом *Каизо* в качестве экспериментальной модели для изучения генетических, молекулярных и нейробиологических механизмов регуляции поведения и функций нервной системы.

Так как нарушения метилирования играют большую роль в развитии раковых заболеваний, особый интерес представляют полученные данные об участии белка Каизо в воспалительном процессе. Полученные результаты о значимости Каизо при остром воспалении позволяют дополнить исследования, направленные на изучение связи хронического воспаления с развитием рака.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белок Каизо, метил-ДНК связывающий транскрипционный фактор, преимущественно экспрессируется в ядрах эпителиальных клеток различных тканей, нейронов и глии.

2. В репродуктивной системе белок Каизо — маркер отдельных популяций сперматогониальных стволовых клеток половозрелых мышей.
3. Нокаут гена *Каизо* нарушает морфологию боковых желудочков мозга, повышает двигательную и исследовательскую активность, но снижает когнитивные способности мышей.
4. Отсутствие гена *Каизо* влияет на проявление гистологических и морфологических признаков острого воспаления у мышей.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены и обсуждены на 1 всероссийской и 7 международных конференциях.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них 5 статей в рецензируемых отечественных (3) и международных (2) журналах, 8 тезисов на всероссийских (1) и на международных конференциях (7).

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы (220 источников). Работа изложена на 121 страницах, содержит 32 оригинальных рисунка и 9 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. В работе использовали следующие линии мышей: C57BL/6 (WT) и с нокаутом по гену *Каизо* (KO) (Prokhortchouk et al. 2006), которые содержались в питомнике лабораторных животных ФИБХ РАН «Пушино». Исследования по поведению проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН». Содержание мышей и все экспериментальные процедуры были выполнены в соответствии с международными правилами обращения с животными (Директива 86/309 Европейского сообщества от 24 декабря 1986г.).

Гистологические и иммуногистохимические исследования. Использовались технологии получения парафиновых срезов или криосрезов по стандартным протоколам. Для гистологического анализа использовали окрашивание гематоксилином и эозином, а для иммуногистохимического анализа — окрашивание первичными специфичными антителами и вторичными флуоресцентными антителами по стандартному протоколу. Для определения локализации белка Каизо использовались поликлональные кроличьи антитела (Daniel and Reynolds 1999). Для визуализации ядер использовали краситель DAPI (Vector Laboratories, США).

Магнитно-резонансная томография. Для морфологического исследования различий в структурах мозга мышей *in vivo* использовался

горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия). Структуры мозга измеряли с помощью программного обеспечения ROI.

Поведенческие тесты. Все поведенческие характеристики в тестах «открытое поле», «новый объект», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «свет-темнота», «водный лабиринт Морриса» и рефлекторную реакцию вздрагивания на акустический сигнал оценивали по стандартным методикам. Поведение животных автоматически регистрировали при помощи цифровой видеокамеры, соединенной с компьютером, и анализировали, используя компьютерную программу EthoStudio (Kulikov et al., 2008).

Модель остроого воспалительного процесса. Экспериментальным мышам в течение 7 дней давали питьевую воду, содержащую 2% р-р декстран сульфата натрия (ДСН) (AppliChem, Германия), далее мышей переводили на обычную питьевую воду. Восстановительный период продолжался до 30 дня.

Выделение тотальной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. Выделение РНК из тканей проводили с использованием реагента Trizol (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, США). Уровень экспрессии генов определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. Обработанные значения представлялись как \pm SEM и были проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA (GraphPad). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ локализации белка Каизо в эпителиальных тканях

Иммуногистохимические исследования показали, что белок Каизо экспрессируется в ядрах различных типов эпителиальных клеток.

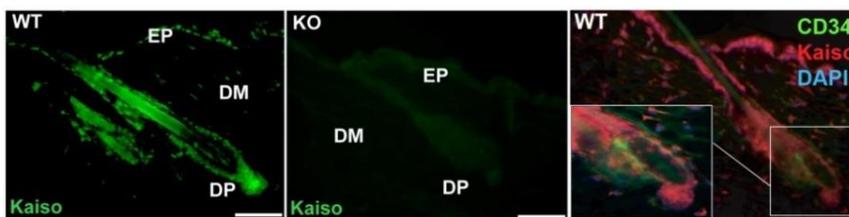


Рис.1. Локализация Каизо в коже мыши. Каизо (зелёный), CD34 (красный), DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО

мышей. EP: эпидермис; DP: дермальная папилла; DM: дермальный матрикс. Криосрезы. Шкала 100 мкм.

В коже Каизо экспрессируется в клетках эпидермиса (внешнего эпителия), дермы (слоя соединительной ткани) и клетках волосяного фолликула. Снимки демонстрируют экспрессию Каизо в ядрах кератиноцитов, фибробластов и меланоцитов базального и супрабазального слоя эпидермиса (Рис. 1). Каизо также локализуется в

ядрах клеток дермальной папиллы, клеток внешнего и внутреннего слоя волосяной луковицы, которые отличаются активной пролиферацией и самообновлением. Совместная окраска Каизо с поверхностным маркёром стволовых клеток волосяного фолликула CD34, показала, что Каизо локализуется в некоторых стволовых клетках волосяного фолликула (Trempeus et al. 2007) (Рис. 1).

Белок Каизо локализуется в ядре однослойных цилиндрических эпителиальных клеток, которые выстилают ворсинки (выступы в просвет) и крипты (глубокие впадины) тонкой кишки, а также крипты толстой кишки у мышей WT. Кроме того, Каизо локализуется в клетках собственной пластинки (*lamina propria*) тонкой и толстой кишки, которая состоит из рыхлой соединительной ткани, содержащей лимфатические капилляры и лимфоциты. (Рис. 2А, Б).

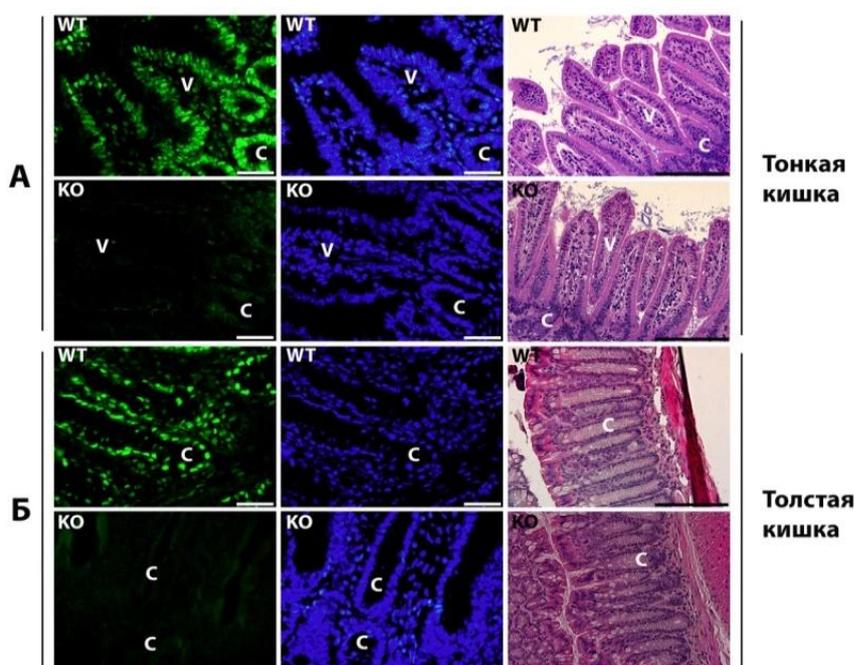


Рис. 2. Локализация Каизо в тонком (А) и толстом (Б) кишечнике мыши. Первая колонка: Каизо (зелёный), вторая: DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Криосрезы. Правая колонка: окрашивание срезов гематоксилином и эозином. Парафиновые срезы. С: крипты; V: ворсинки. Шкала 50 мкм.

В лактирующей молочной железе мыши Каизо локализуется в кубическом эпителии, что подтвердило окрашивание последовательных срезов антителами на Каизо и на цитокератин 8 (К8), который является белком промежуточных филаментов и маркёром эпителиальных клеток, выстилающих протоки молочной железы (Kongara et al. 2010). Ядерное окрашивание Каизо совпадает с цитоплазматическим окрашиванием К8 (Рис. 3).

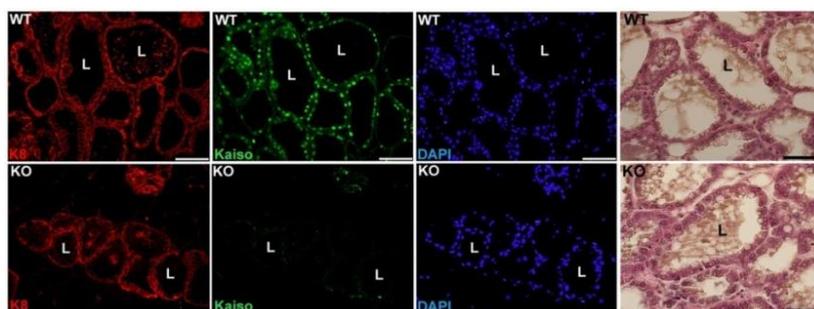


Рис. 3. Локализация Каизо в молочной железе. К8 (красный), Каизо (зелёный), DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Парафиновые срезы. Правая колонка: окрашивание срезов гематоксилином и эозином. L: просвет (люмен). Шкала 100 мкм.

Шкала 100 мкм.

Анализ локализации белка Каизо в тканях глаза

Иммуногистохимический анализ показал, что в роговице глаза белок Каизо локализуется в ядрах клеток многослойного плоского эпителия, а также в стромальных и эндотелиальных клетках (Рис. 4).

В сетчатке Каизо локализуется в цитоплазме внутренних сегментов фоторецепторных клеток сетчатки и отсутствует в наружном ядерном слое, внутреннем ядерном слое и в слое ганглиозных клеток (Рис. 4).

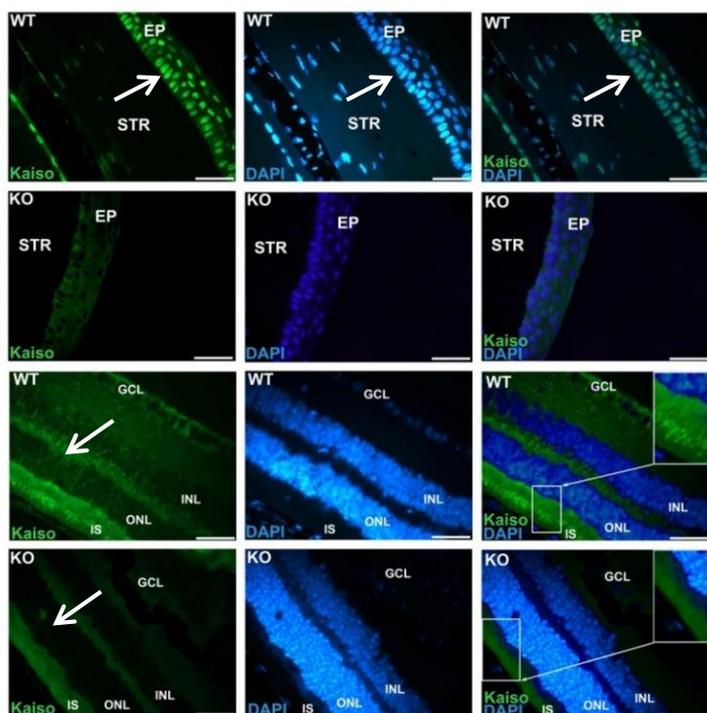


Рис. 4. Локализация Каизо в роговице и сетчатке глаза. Первая колонка: Каизо (зелёный); вторая: DAPI (синий); третья: наложение. Белок Каизо отсутствует у мышей КО. Парафиновые срезы. Шкала 50 мкм. EP: эпителий роговицы; STR: строма; GCL: слой ганглиозных клеток; INL: внутренний ядерный слой (ядра биполярных клеток); ONL: наружный ядерный слой (ядра фоторецепторных кле-

ток); IS: внутренние (цитоплазматические) сегменты фоторецепторных клеток.

Анализ локализации белка Каизо в репродуктивных органах самцов

Иммунофлуоресцентный анализ семенников взрослых мышей показал, что белок Каизо локализуется в ядрах отдельных клеточных популяций, расположенных на базальной мембране семенных канальцев (Рис. 5). В эпидидимисе, где происходит созревание спермиев, Каизо локализуется в ядрах эпителиальных клеток (Рис. 5).

Локализация на базальной мембране семенных канальцев характерна для сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и клеток Сертоли. ССК подразделяются на несколько морфологических типов, которые последовательно сменяют друг друга: сперматогонии As (одиночные), Arp (парные), и Aal (линейные, 4–16 или 32 клеточных синцитиальных кластера) (de Rooij and Russell 2000; de Rooij 2001).

Для определения типа клеток, в которых экспрессируется Каизо было проведено совместное иммуногистохимическое окрашивание с различными маркерами: PLZF и VMI-1 (маркерами недифференцированных ССК), PCNA (маркером пролиферирующих сперматогониев) и GATA4 (маркером клеток Сертоли и Лейдига) (Рис. 6).

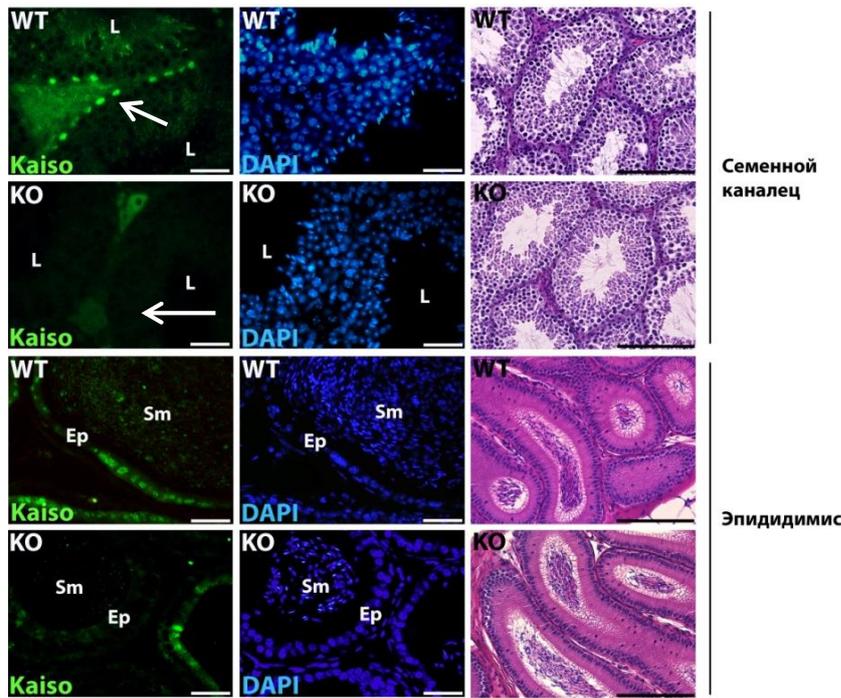


Рис. 5. Локализация Каизо в семенных канальцах и эпидидимисе мыши. Каизо (зелёный), DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Правая панель: окрашивание гематоксилином и эозином. L: просвет канальца (люмен); Sp: спермии; Ep: эпителий. Поперечные парафиновые срезы. Шкала 50 мкм, 100 мкм.

При совместном окрашивании Каизо и GATA-4 колокализации не наблюдалось, что свидетельствует о том, что Каизо не экспрессируется в клетках Сертоли (Рис. 6).

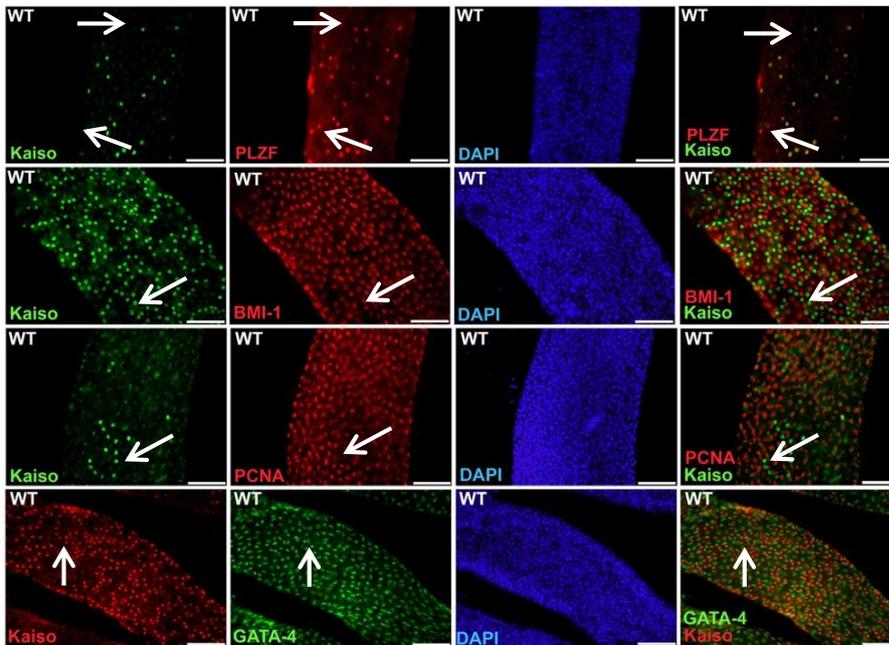


Рис. 6. Локализация Каизо, PLZF, BMI-1, PCNA и GATA-4 в семенниках мыши. Первая колонка: Каизо; вторая: PLZF, BMI-1, PCNA, GATA-4; третья: DAPI; четвёртая: наложение. Продольный вид изолированных семенных канальцев. Шкала 100 мкм.

При совместном окрашивании с маркёрами ССК Каизо не совпадает с BMI-1 (маркёр преимущественно As), частично перекрывается с экспрессией PLZF (маркёр As, Arg и Aal) (Рис. 6) и с PCNA (маркёр пролиферирующих клеток). Можно предположить, что Каизо локализуется в ССК типа Arg и Aal, так как его колокализация с BMI-1, который преимущественно локализуется в As (Komai et al. 2014), не наблюдается.

Анализ локализации белка Каизо в структурах мозга

Локализация Каизо была исследована в коре, обонятельных луковицах, гиппокампе и мозжечке. Было показано, что Каизо локализуется в ядрах нейронов (большие ядра) и глиальных клетках (маленькие ядра). В обонятельной луковице Каизо локализуется во внешнем плексиформном слое, митральных клетках, обонятельных гломерулах (клубочках) и перигломерулярных клетках. Каизо локализуется в ядрах плотно упакованных круглых клеток зернистого и пирамидального слоя, которые вместе формируют V- или U-образные структуры зубчатой извилины в гиппокампе у мышей. В мозжечке Каизо локализуется в ядрах клеток Пуркинье, клеток зернистого и молекулярного слоёв (Рис. 7).

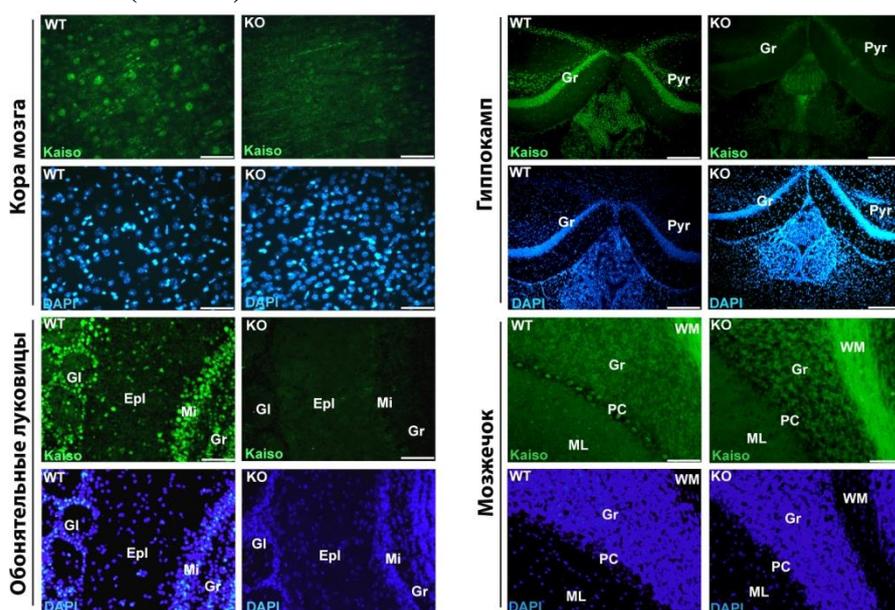


Рис.7. Локализация Каизо в структурах мозга.

Каизо (зелёный), DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Epl: внешний плексиформный слой; Mi: слой митральных клеток; Gl: гломерулярный слой; Gr: зернистый слой; Pyr: пирамиальный слой; PC: клетки Пуркинье; ML: молекулярный слой; WM: белое вещество. Криосрезы.

Шкала 50 мкм. Гиппокамп — шкала 200 мкм.

Морфологические особенности мозга мышей, нокаутных по гену *Каизо*

Поскольку Каизо активно экспрессируется в ЦНС, в данной работе были изучены морфологические особенности мозга КО мышей методами магнитно-резонансной томографии (МРТ). Нокаут гена *Каизо* не приводит к значимым изменениям объёма коры, гиппокампа, стриатума и общего объёма мозга. Разница была выявлена в объёме боковых желудочков: у КО мышей он оказался втрое меньше, чем у WT мышей (Рис. 8).

У человека объём боковых желудочков изменяется с возрастом и увеличен у людей, страдающих шизофренией и биполярными расстройствами (Wright et al. 2000). Предполагается, что уменьшение размера желудочков также может быть связано с различными психическими расстройствами (Roza et al. 2008).

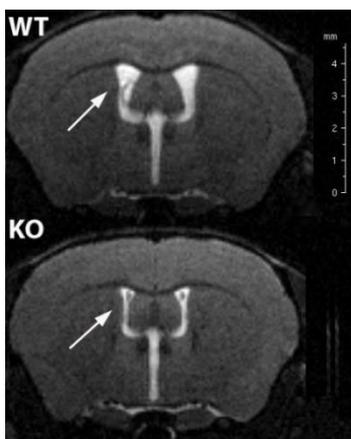


Рис. 8. Снимок МРТ боковых желудочков в мозге мышей WT и KO. Изображения мозга мыши *in vivo*, полученные с помощью горизонтального томографа. Срез мозга в коронарной проекции. ($F_{1,14} = 28.55$, $p < 0.0001$)

Учитывая полученные результаты, было решено провести стандартную серию тестов, рекомендованных для обязательного поведенческого фенотипирования нокаутных и трансгенных мышей (Crawley 2008).

Влияние отсутствия Каицо на поведение мышей

Тест «открытое поле» используется для оценки двигательной (пройденное расстояние) и исследовательской (число вертикальных стоек) активностей, а также тревожности (время в центре) в условиях мягкого стресса (новая обстановка и интенсивное освещение) (Prut and Belzung 2003; Stanford 2007). Мыши KO в тесте «открытое поле» проходили большее расстояние ($F_{1,23} = 34.98$, $p < 0.0001$), чаще демонстрировали вертикальные стойки ($F_{1,23} = 50.23$, $p < 0.0001$) и проводили больше времени в центре ($F_{1,23} = 11.16$, $p < 0.001$) по сравнению с животными WT (Рис. 9). Таким образом, мышей KO отличают повышенная по сравнению с животными WT двигательная и исследовательская активность, а увеличение времени нахождения мышей KO в центре открытого поля можно, на первый взгляд, интерпретировать как анксиолитический (противотревожный) эффект нокаута гена *Каицо*, так как обычно мыши избегают ярких и открытых пространств, предпочитая держаться ближе к стенке.

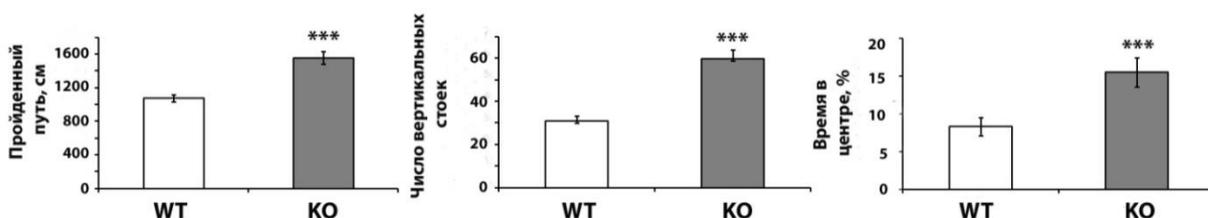


Рис. 9. Пройденный путь, число вертикальных стоек и время, проведённое в центре поля, в тесте «открытое поле» у мышей WT и KO. *** $p < 0.001$ достоверные различия с WT.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» — основной для оценки тревожности. В нем оценивается баланс между естественным страхом животных перед открытым пространством, высотой, новизной и одновременным стремлением исследовать эти незнакомые условия (Pellow et al. 1985; Belzung and Griebel 2001; Milner and Crabbe 2008). Мыши KO в этом тесте преодолевали большие дистанции ($F_{1,23} = 12.21$, $p < 0.002$), чаще пересекали центр ($F_{1,23} = 7.9$, $p < 0.01$) и проводили в нём больше

времени ($F_{1,23} = 8.89$, $p < 0.01$) по сравнению с мышами WT (Рис. 10), что согласуется с высокой двигательной и исследовательской активностью у мышей КО в тесте «открытое поле». Однако, латентное время захода в открытые рукава, количество заходов и время, проведенное в открытых рукавах не различалось у мышей обеих линий, что свидетельствует об отсутствии различий в уровне тревожности между мышами КО и WT. Таким образом, увеличение времени пребывания в центре «открытого поля» отражает повышенную двигательную активность, а не пониженную тревожность КО мышей. Суммируя результаты исследования поведения животных в обоих тестах можно заключить, что в отсутствие Каицо мыши демонстрируют не просто повышенную двигательную активность, а поведение, характерное для синдрома двигательной расторможенности у детей, одним из проявлений которого становится нарушение способности к обучению.

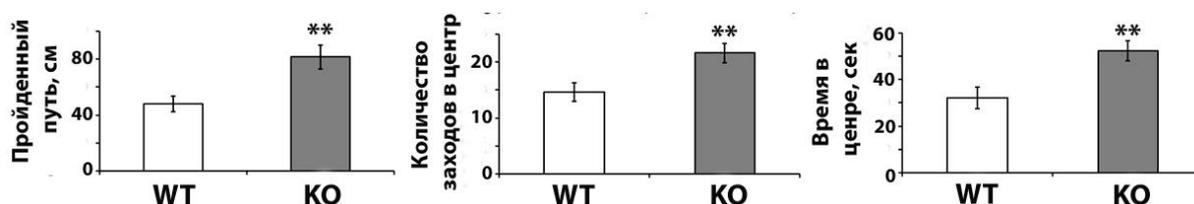
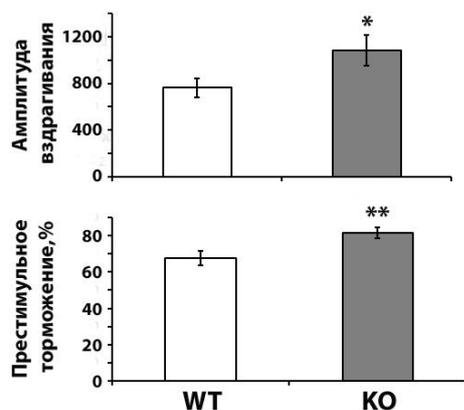


Рис.10. Proйденный путь (см), количество заходов в центр и время, проведённое в центре поля, в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей WT и КО.
 ** $p < 0.01$ достоверные различия с WT.

Влияние отсутствия Каицо на реакцию рефлекторного вздрагивания и ее прeстимульное торможение

У мышей WT и КО исследовалась амплитуда реакции рефлекторного вздрагивания на неожиданный звуковой сигнал и прeстимульное торможение реакции вздрагивания, если основному резкому акустическому стимулу предшествует слабый прeстимул. Животные с высоким уровнем оборонительного поведения характеризуются высокой амплитудой рефлекторной реакции вздрагивания, а прeстимульное торможение отражает способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию (Braff and Geyer 1990; Geyer et al. 1990).

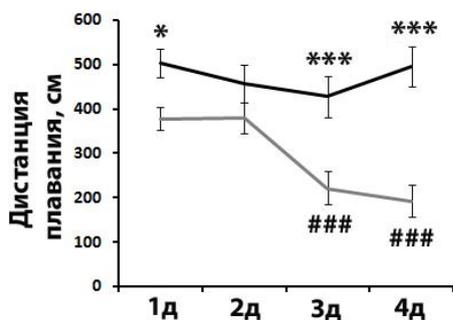
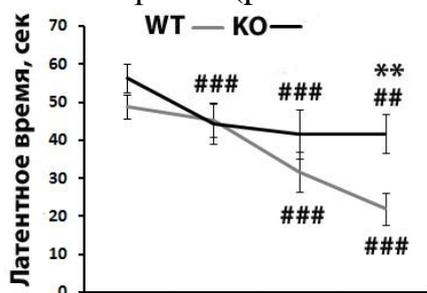


У КО мышей амплитуда акустической реакции вздрагивания ($F_{1,22} = 4.68$, $p < 0.05$) и прeстимульное торможение ($F_{1,23} = 6.58$, $p < 0.02$) оказались выше, чем у WT мышей (Рис. 11). Таким образом, удаление гена *Каицо* приводит к увеличению прeстимульного торможения, что увеличивает, но не нарушает, способность ЦНС мышей к сенсомоторной фильтрации.

Рис. 11. Амплитуда рефлекса вздрагивания (условные единицы) и прeстимульное торможение (%) у мышей WT и КО. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ достоверные различия с WT.

Влияние отсутствия Каизо на обучение мышей в тесте «водный лабиринт Морриса»

Водный тест Морриса (Morris R., 1984) используется для исследования обучения, долговременной пространственной памяти, для обнаружения когнитивных расстройств. Мыши КО отличались от WT как по латентному времени нахождения невидимой платформы ($F_{3,69} = 2.96$, $p < 0.05$), так и по величине пропываемого расстояния ($F_{3,69} = 5.43$, $p < 0.002$) (Рис. 12). На четвертый день тестирования у мышей WT время нахождения невидимой платформы было значительно короче, чем в первый ($p = 0.00014$), во второй ($p = 0.00028$) и в третий день ($p = 0.049$), что свидетельствует об успешном обучении. У мышей КО только на четвертый день тестирования латентное время нахождения невидимой платформы было достоверно меньше, чем в первый день ($p = 0.045$). Дистанция, которую проплыли мыши WT на четвёртый день, была короче, чем в первый ($p = 0.00022$) и во второй ($p = 0.00035$) дни. У мышей КО



разницы в пропываемой дистанции между первым и последующими днями не наблюдалось. Полученные результаты демонстрируют нарушение пространственной памяти и снижение способности к обучению КО мышей, что может быть связано с их гиперактивностью.

Рис. 12. Динамика латентного времени нахождения платформы (сек) и дистанции плавания (см) во время четырёх ежедневных тренировок в водном лабиринте Морриса у мышей WT и КО. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ достоверные различия с соответствующим днём у WT и КО.

$p < 0.01$, ### $p < 0.001$ достоверные различия с первым днём одной и той же линии.

Влияние нокаута Каизо на развитие острого колита, вызванного декстран сульфатом натрия

Острый воспалительный процесс в кишечнике мышей инициировали декстран сульфатом натрия (ДСН), который добавляли в питьевую воду. В результате токсического действия ДСН развивается острая воспалительная реакция, которая сопровождается потерей веса, появлением жидкого стула и кровотечениями в прямом кишечнике (Egger et al. 2000). Опытные группы животных получали 2% ДСН с питьевой водой в течение семи дней, контрольные — воду без добавления ДСН. После отмены ДСН животные восстанавливались до 30-го дня эксперимента (Рис. 14А). Экспериментальные животные были разделены на две группы: первую группу подвергали эвтаназии на 7 день после добавления ДСН, а вторую на 30 день.

У животных WT с третьего дня добавления ДСН начинали проявляться стандартные признаки воспаления: резкое снижение веса, жидкий стул и кровотечение. У животных КО признаки воспаления возникали только на 6 день добавления ДСН и были не столь явно выражены. Оценка индекса активности колита (ИАК) подтвердила, что фенотипические признаки воспаления (потеря веса, консистенция стула, кровотечение) появлялись раньше и были выражены гораздо сильнее у мышей WT по сравнению с КО (Рис. 13А, Б). Несмотря на то, что в течение 7 дней приёма ДСН все признаки воспаления и снижение веса у мышей КО были выражены незначительно, после его отмены у них

наблюдалось отсроченное снижение веса и более обильное выделение жидкого стула.

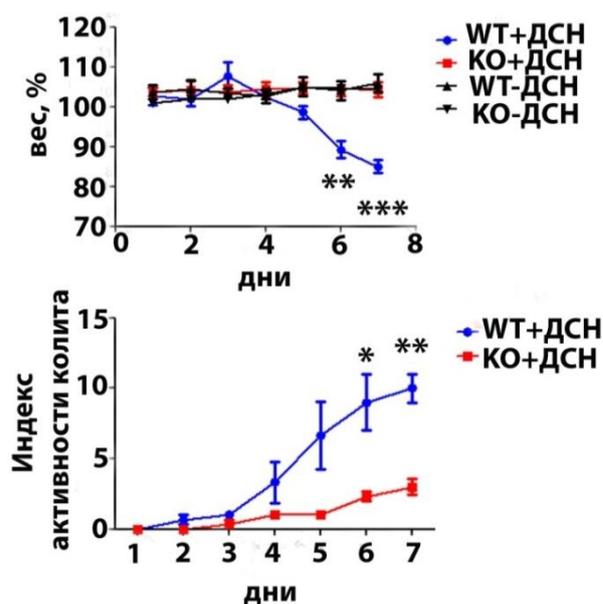


Рис. 13. Динамика изменения веса мышей во время воздействия ДСН по сравнению с контролем (питьевая вода).

p-value = 0.002, * p-value < 0.001.

Сравнительный анализ ИАК (индекса активности колита), регистрируемый ежедневно, как комбинированная оценка массы тела, кровотечения и консистенции стула по шкале от 0 до 4. Приведены средние значения +/- стандартная ошибка среднего (n = 6 в каждой группе).

(*p-value = 0.03, ** p-value = 0.0037).

Вскрытие мышей на 7 день после воздействия ДСН у WT выявило укорочение длины толстого кишечника и, соответственно, общей длины кишечника. У КО мышей на 7 день укорочения кишечника не наблюдалось (Рис. 14Б, В). При гистологическом анализе кишечника у получавших ДСН мышей WT и КО были выявлены: деформация, сглаженность, укорочение крипт кишечного эпителия, а также обильная лимфоцитарная инфильтрация. При этом, у мышей WT лимфоцитарные скопления были крупнее, инфильтрация лимфоцитами обильнее, что подтвердил анализ индекса гистологической активности (ИГА) (Рис. 14Г). После восстановительного периода (на 30 день) морфология кишечника как у WT, так и у КО мышей полностью восстанавливалась (Рис. 14А). Различий в длине и морфологии кишечника между контрольными мышами линий WT и КО выявлено не было.

Поскольку под действием ДСН у мышей возникали признаки воспаления, были проанализированы уровни экспрессии генов некоторых цитокинов, участвующих в этом процессе на 7 день: *TGF-β1*, *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17a* и *TNFα* (Рис. 15А-Ж). Биологические активности цитокинов часто перекрываются, а оценка их экспрессии позволяет судить о тяжести воспалительного процесса.

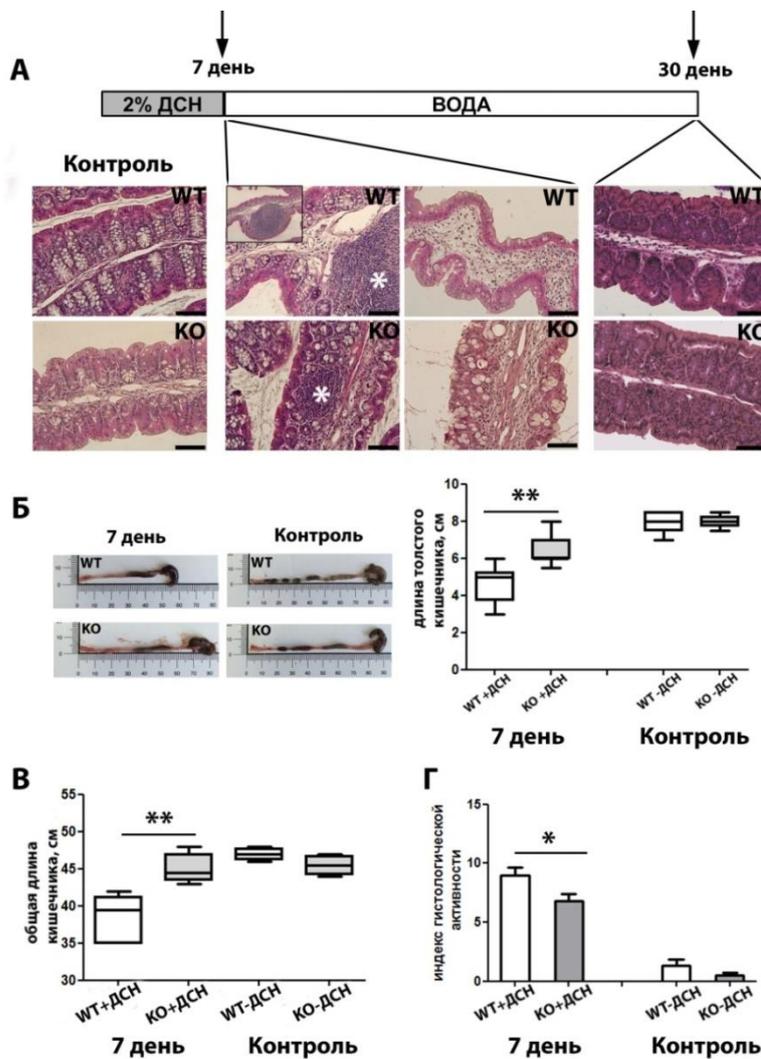


Рис. 14. Снижение уровня воспаления у мышей КО по сравнению с WT при воздействии ДСН. (А) Схема эксперимента с ДСН. Стрелками обозначены дни эвтаназии мышей. Окрашивание прямой кишки гематоксилином и эозином. Звездочкой указаны участки скопления лимфоцитов. Парафиновые срезы. Шкала 100 мкм. (Б) Длина толстого кишечника на 7 день после воздействия ДСН. ***p*-value = 0.0059. (В) Общая длина всего кишечника (толстого и тонкого) на 7 день после воздействия ДСН. ***p*-value = 0,002. (Г) Сравнительный анализ индекса гистологической активности (ИГА) на 7 день после воздействия ДСН. Общий гистологический подсчет суммы трёх проявлений воспаления (максимальная оценка 12)

на 7-й день. **p*-value = 0.0385 достоверные различия с WT (*n*=6 в каждой группе).

После 7 дней воздействия ДСН уровень мРНК генов *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *TNF-α* и *TGF-β1* в толстой кишке был увеличен как у WT, так и у КО мышей по сравнению с контролем, что подтверждает активацию воспалительного процесса в ответ на ДСН. При этом повышение экспрессии всех исследованных генов цитокинов, за исключением *TNF-α*, у мышей КО было ниже, чем у мышей WT: *TGF-β1* в 1.5 раза, *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-10* и *IL-17A* в 3–7 раз, *IL-6* в 14 раз (Рис. 15А-Ж), а также наблюдалось снижение уровня мРНК гена *Каицо* (Рис. 153). После восстановительного периода экспрессия цитокинов у мышей WT и КО снижалась до нормы (Рис. 15А, Б).

Таким образом, активация большинства проанализированных цитокинов у КО мышей выражена слабее, что говорит о менее активном развитии воспалительного процесса по сравнению с WT. Согласно полученным данным, *Каицо* участвует в развитии острого воспаления в кишечнике в ответ на воздействие ДСН, а его отсутствие изменяет временные параметры и выраженность этого процесса.

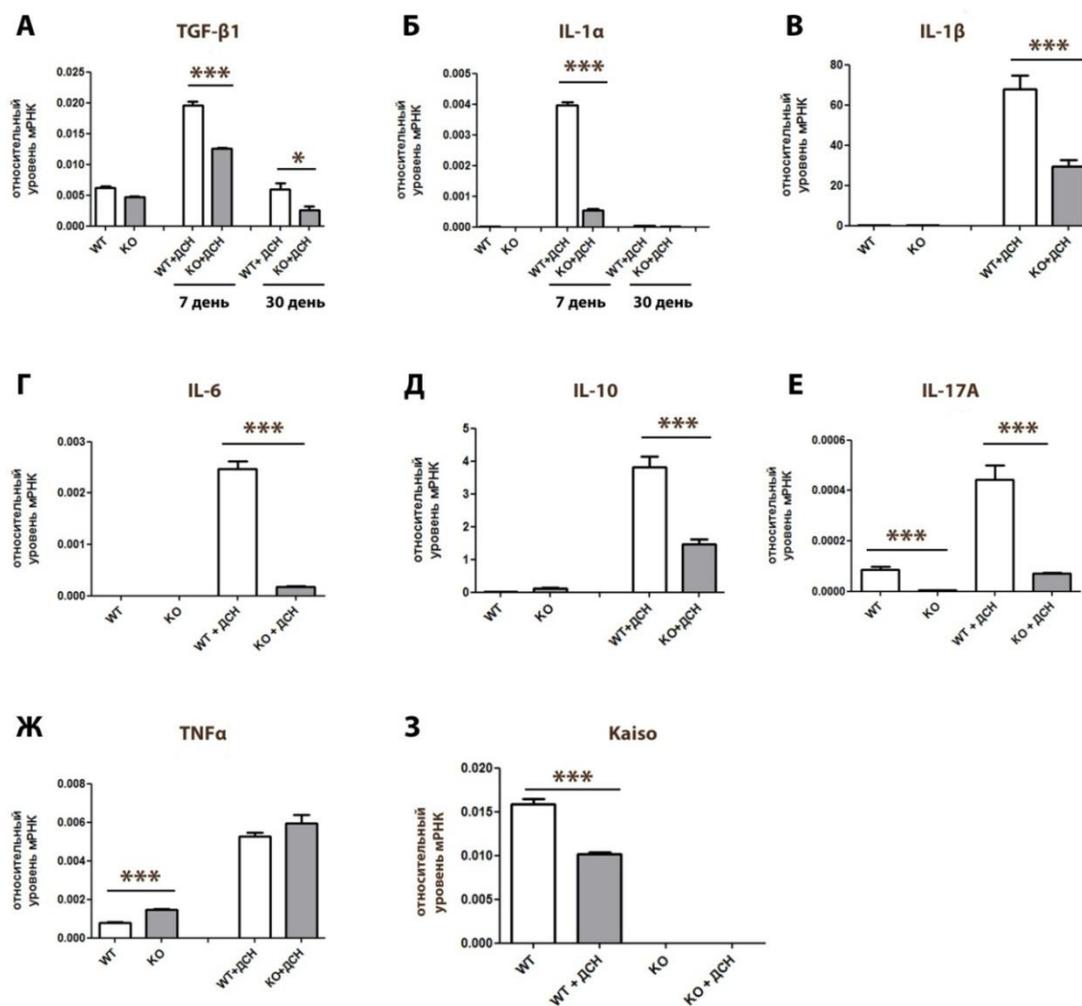


Рис. 15. Изменение экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в толстой кишке после воздействия ДСН.

Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР в реальном времени генов *TGF-β1* (А), *IL-1α* (Б), *IL-1β* (В), *IL-6* (Г), *IL-10* (Д) *IL-17A* (Е) и *TNFα* (Ж) в толстой кишке, до и после воздействия ДСН на 7-й день (А-Ж) и на 30-й день (А, Б). ***p-value < 0.0001, * p-value = 0.043. Приведены средние значения (n = 3 в каждой группе). +/- стандартная ошибка среднего. (З) Анализ экспрессии мРНК *Kaiso* в толстой кишке на 7 день после воздействия ДСН. (***)p-value < 0.0001). Приведены средние значения (n = 4 в каждой группе) +/- стандартная ошибка среднего.

Заключение

Таким образом, в данной работе была изучена локализация и функциональная значимость белка Каизо в организме мышей. С использованием генетического нокаута в качестве контроля было показано, что локализация Каизо ограничивается определёнными типами клеток в различных органах мыши. Обнаружена ядерная локализация Каизо в эпителиальных клетках, клетках тимуса и селезёнки, а также в нейронах и глиальных клетках различных структур мозга, исключение составила цитоплазматическая локализация Каизо в фотосенсорных клетках сетчатки. Более того, полученные в этой работе данные свидетельствуют о том, что Каизо может являться новым маркером ССК типа Arg(парные) и Aal(линейные).

Было показано, что удаление гена *Kaizo* приводит к уменьшению боковых желудочков головного мозга, а также влияет на увеличение двигательной и исследовательской активности, повышает способности к сенсомоторной фильтрации, но снижает когнитивные способности у мышей.

Обнаружено, что *Kaizo* вовлечен в развитие острого колита, что выражается в менее выраженном воспалительном ответе и пониженном уровне экспрессии воспалительных цитокинов при воздействии ДСН на мышей, нокаутных по гену *Kaizo*.

ВЫВОДЫ

1. Методом флуоресцентной иммуногистохимии было выявлено, что метил-ДНК связывающий белок *Kaizo* преимущественно локализуется в ядрах эпителиальных клеток в тканях и органах мыши, а также в ядрах клеток тимуса и селезёнки, в ядрах нейронов и глиальных клеток в различных структурах мозга.
2. Обнаружено, что в фотосенсорных клетках сетчатки глаза *Kaizo* локализуется в цитоплазме.
3. Выявлено, что *Kaizo* может являться новым маркёром стволовых сперматогониальных клеток типа *Arg*(парные) и *Aal*(линейные) у половозрелых мышей. Обнаружена частичная колокализация *Kaizo* с *PLZF* (маркёром ССК типа *As*(одиночные), *Arg*(парные) и *Aal*(линейные)) и *PCNA* (маркёром пролиферации ССК), а также выявлено отсутствие колокализации с *BMI-1*(маркёром ССК типа *As*(одиночные)) и *GATA-4* (маркёром клеток Сертоли и Лейдига).
4. Методом магнитно-резонансной томографии у мышей, нокаутных по гену *Kaizo*, было выявлено уменьшение размеров боковых желудочков, при неизменном общем объеме мозга.
5. Показано, что нокаут гена *Kaizo* у мышей приводит к повышенной двигательной и исследовательской активности, увеличению акустического рефлекса вздрагивания и престаимпульного торможения, а также снижению обучаемости и пространственной памяти в тесте «водный лабиринт Морриса».
6. Обнаружено, что у нокаутных по гену *Kaizo* мышей происходит сдерживание развития острого воспалительного процесса в ответ на воздействие декстран сульфата натрия: отсроченное снижение веса, менее выраженное проявление морфологических и гистологических признаков воспаления.
7. После воздействия декстран сульфата натрия уровни экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов (*TGF-β1*, *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*) у мышей, нокаутных по гену *Kaizo*, ниже по сравнению с мышами дикого типа.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Shumskaya (Korostina), V.S.** Distribution of Kaiso protein in mouse tissues / **V.S. Shumskaya (Korostina)**, N.A. Zhigalova, A.V. Prokhorchouk, E.B. Prokhorchouk // *Histochem Cell Biol.* – 2015. – Vol.143. – № 1 – P. 29-43.
2. Kulikov, A.V. Knockout *Zbtb33* gene results in an increased locomotion, exploration and pre-pulse inhibition in mice / A.V. Kulikov, **V.S. Korostina**, E.A. Kulikova, D.V. Fursenko, A.E. Akulov, M.P. Moshkin, E.B. Prokhorchouk // *Behav Brain Res.* – 2016. – Vol.297. – P. 76-83.
3. **Коростина, В.С.** Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kaiso* / **В.С. Коростина**, А.В. Куликов // Вавил. Журн. Генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – № 4. – С. 399-403.
4. Кожевникова, Е.Н. Роль генов *Mucin-2* и *Kaiso* в социальном поведении мышей / Е.Н. Кожевникова, К.М. Ачасова, **В.С. Коростина**, Е.Б. Прохорчук, Е.А. Литвинова // Вавил. Журн. Генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – № 4. – С. 410-412.
5. Литвинова, Е.А. Вклад кишечного муцина-2 в эффективность антибактериальной терапии *Helicobacter spp.* у лабораторных мышей / Е.А. Литвинова, М.Д. Беляев, А.В. Прохорчук, **В.С. Коростина**, Е.Б. Прохорчук, Е.Н. Кожевникова // Вавил. Журн. Генетики и селекции. – 2015. – Т.19. – № 4. – С. 494-498.
6. **Шумская (Коростина), В.С.** Роль белка Каизо в формировании репродуктивной системы позвоночных / **В.С. Шумская (Коростина)**, А.В. Прохорчук // VIII Международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток». – Звенигород, 2011. – С. 59-60.
7. **Шумская (Коростина), В.С.** Роль белка Kaiso в процессе сперматогенеза млекопитающих / **В.С. Шумская (Коростина)**, А.В. Прохорчук // III Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2012. – С. 53.
8. **Шумская (Коростина), В.С.** Гиперактивность, нарушение серотониновой системы и редукция латеральных желудочков мозга у мышей, лишённых гена Каизо / **В.С. Шумская (Коростина)**, А.С. Соколов, Н.А. Жигалова, А.В. Куликов, Е.Б. Прохорчук // XXVI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». – Москва, 2014. – С. 86.
9. **Shumskaya (Korostina), V.S.** Hyperactivity, learning deficit and alterations in the brain in mice lacking the DNA methylation-dependent transcriptional repressor Kaiso / **V.S. Shumskaya (Korostina)**, A. S. Sokolov, N.A. Zhigalova, A.V. Kulikov, E.B. Prokhorchouk // 21st Multidisciplinary International Neuroscience and Biopsychiatry Conference «Stress and Behavior». – St-Petersburg, 2014. – Vol.1. – P. 28.