

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

КОРОСТИНА ВАЛЕРИЯ СЕРГЕЕВНА

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Жигалова Н.А.

Москва 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Эпигенетическая регуляция генома.....	10
1.1.1 Метилирование ДНК	11
1.1.2 Метил-ДНК связывающие белки.....	16
1.1.3 Роль эпигенетики и метил-ДНК связывающих белков в нервной системе.....	19
1.2 Участие метил-ДНК связывающих белков в воспалении.....	22
1.3 Изучение воспалительных процессов кишечника.....	25
1.4 ВТВ/ВОZ-семейство белков.....	26
1.5 Строение метил-ДНК-связывающего белка Каизо	27
1.6 Роль белка Каизо у позвоночных животных.....	29
1.7 Белок Каизо как регулятор транскрипции.....	32
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	36
2.1 Экспериментальные животные.....	36
2.2. Генотипирование мышей.....	37
2.3 Гистологическое исследование.....	38
2.4 Иммуногистохимическое окрашивание.....	39
2.5 Получение и иммуногистохимическое окрашивание тотального препарата семенных канальцев.....	40
2.6 Иммуноблоттинг.....	42
2.7 Магнитно-резонансная томография.....	43
2.8 Исследование поведения животных в стандартных тестах.....	44
2.10 Индукция острого воспалительного процесса с использованием декстран сульфата натрия.....	49
2.11 Определение уровня экспрессии генов.....	50
2.12 Выявление апоптоза с использованием метода TUNEL.....	53
2.13 Статистическая обработка	53

ГЛАВА 3: РЕЗУЛЬТАТЫ.....	55
3.1 Исследование локализации белка Каизо в органах мыши.....	55
3.1.1. Анализ локализации белка Каизо в эпителиальных тканях.....	55
3.1.2 Анализ локализации белка Каизо в тканях глаза.....	59
3.1.3. Анализ локализации белка Каизо в органах кроветворения и иммуногенеза.....	60
3.1.4. Анализ локализации белка Каизо в репродуктивных органах самцов.....	61
3.1.5. Анализ локализации белка Каизо в структурах мозга.....	67
3.2 Морфологические особенности мозга мышей с нокаутом гена <i>Каизо</i>	68
3.3 Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена <i>Каизо</i>	70
3.3.1 Тревожность, двигательная и исследовательская активность.....	70
3.3.2. Депрессивноподобное поведение.....	75
3.3.3. Реакция рефлекторного вздрагивания и её престаимпульное торможение.....	76
3.3.4. Пространственная память и обучаемость.....	77
3.6. Влияние нокаута гена <i>Каизо</i> на развитие острого колита, вызванного декстран сульфатом натрия.....	78
ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ.....	91
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФА** — активная форма азота
- АФК** — активная форма кислорода
- ВЗК** — воспалительные заболевания кишечника
- ДНК** — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСН** — декстран сульфат натрия
- КСС** — Каизо связывающий сайт
- МРТ** — магнитно-резонансная томография
- ЦНС** — центральная нервная система
- HDAC3** — гистон деацетилаза 3
- об/мин** — обороты в минуту
- п.о.** — пар оснований
- ПЦР** — полимеразная цепная реакция
- РНК** — рибонуклеиновая кислота
- ЭДТА** — этилендиаминтетрауксусная кислота
- 5hmC** — 5-гидроксиметилцитозин
- CpG** — цитозин и гуанина, разделенные фосфатом
- DAPI** — 4', 6-диамино-2-фенилиндол
- DNMT** — ДНК-метилтрансферазы
- IL** — интерлейкины
- NK** — натуральные киллеры
- NLS** — сигнал ядерной локализации
- PBS** — Фосфатно-солевой буфер
- SDS** — Додecilсульфат натрия
- TGF- β** — трансформирующий ростовой фактор β
- Th** — Т-хелперные клетки
- TNF α** — фактор некроза опухоли

ВВЕДЕНИЕ

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; Filion 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, корепрессор 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 *Kaiso* 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 наличие мРНК *Kaizo* было выявлено 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 *Kaiso*^{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 *Каизо* мышей, оценить методом МРТ морфологические параметры их мозга;
3. Определить влияние нокаута гена *Каизо* 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 *Каизо*, 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 маркёром 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 о роли Каизо в хроническом воспалении.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Результаты настоящей работы существенно расширяют представление 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 маркёр 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 *Kaizo* нарушает морфологию боковых желудочков мозга, повышает двигательную и исследовательскую активность, но снижает когнитивные способности мышей.
4. Отсутствие гена *Kaizo* 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, заключение, выводы, список цитируемой литературы (220 источников). Работа изложена на 121 страницах, содержит 32 оригинальных рисунка и 9 таблиц.

Глава 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпигенетическая регуляция генома

В начале XX века биология развития и генетика считались отдельными дисциплинами. Для того, чтобы связать две области, Конрад Уоддингтон впервые ввел термин эпигенетика, как совокупность механизмов для поддержания генетической программы развития в 1942 году.

По современным представлениям эпигенетическая регуляция генома в организме позвоночных животных отвечает за правильное развитие и реализацию генетической программы онтогенеза, а также устанавливает и поддерживает экспрессию генов, не затрагивая последовательности ДНК (Wu St and Morris, 2001).

Эпигенетика рассматривает три класса явлений: метилирование и деметилирование ДНК; гистоновый код (энзиматическая модификация гистонов ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование и другие) и регуляцию генома на уровне интерферирующих РНК (транскрипционное и трансляционное замалчивание генов) (Bernstein et al., 2007; Bird, 2007). Многие из этих процессов взаимозависимы между собой, что обеспечивает и гарантирует надежность эпигенетического контроля за избирательным функционированием генов (Strahl and Allis, 2000). Все три механизма реализации генетической информации вовлечены, в частности у позвоночных организмов, в такие клеточные процессы, как тканеспецифичная экспрессия генов, ранний эмбриогенез и гаметогенез, дифференцировка, инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, опухолевая трансформация клеток и репрессия мобильных генетических элементов в соматических клетках организма (Plass and Soloway, 2002).

Геном всех клеток в организме одинаков, но существуют дифференцированные клетки, которые по-разному воспринимают сигналы

окружающей среды и выполняют различные функции. Специфичную программу экспрессии генов в дифференцированных клетках инициируют транскрипционные факторы, а эпигенетическая регуляция способствует стабилизации паттернов экспрессии (Watanabe et al., 2013). Например, близнецы, получившие одинаковый генетический набор от родителей, могут иметь внешние фенотипические различия, вероятно обусловленные эпигенетическими модификациями, которые приобретались на протяжении их жизни (Fraga et al., 2005).

Приобретённые функциональные характеристики и паттерны экспрессии генов надёжно сохраняются в линиях соматических клеток благодаря эпигенетическим модификациям. Например, транскрипционно неактивное состояние генов передаётся от клетки к клетке в процессе репликации и поддерживается метилированием (Bird, 2002). Более того, эпигенетические изменения могут передаваться по наследству через гаметы и не стираться между поколениями (Heard and Martienssen, 2014). Поддержание стабильности генома является важной функцией для нормального развития организма. Нарушение эпигенетических механизмов приводит к различным эпигенетическим заболеваниям у человека, как болезни геномного импринтинга и заболеваниям, связанным с нарушениями случайной инактивации X-хромосомы (Minks et al., 2008). В основе таких заболеваний лежат стабильные и наследуемые изменения экспрессии генов, которые не связаны с мутациями в их кодирующей последовательности. Более того, нарушение эпигенетических механизмов может приводить к развитию различных заболеваний или клеточной онкотрансформации (Leeb and Wutz, 2012).

1.1.1 Метилирование ДНК

Метилирование цитозиновых оснований ДНК является наиболее хорошо изученным к настоящему времени эпигенетическим механизмом и заключается в присоединении метильной группы к цитозину в составе CpG-

динуклеотида (где С – это цитозин, связанный фосфодиэфирной связью *p* с гуанином G) в позиции С5 цитозинового кольца (5mC) (Рис. 1). Метилирование ДНК влияет на функционирование многих клеточных процессов, участвует в регуляции репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации (Bird, 2002).

Метилирование встречается во всех главных надцарствах живых организмов, включая некоторые виды вирусов, беспозвоночных (например, *Drosophila melanogaster*) и хордовых (например, *Ciona intestinalis*) (Hung et al., 1999). У растений значительный уровень метилированных цитозинов обнаружен в контексте CG, CNG и CNN последовательностей (где N=A, T или G) (Tariq and Paszkowski, 2004). У млекопитающих метилирование представлено в контексте CG динуклеотида, однако, было показано, что в эмбриональных стволовых клетках мыши и на ранних стадиях развития мышинового эмбриона метилирование может быть в контексте CNG и CNN (Haines et al., 2001).

Метилированные CpG динуклеотиды осуществляют замолкание генов при помощи множества процессов, включающих: блокирование связывания транскрипционных комплексов с промоторными областями ДНК, ингибирование РНК-полимеразы (RNAP) и привлечение комплексов, репрессирующих транскрипцию (Defossez and Stancheva, 2011).

В соматических клетках человека метилировано 60-70% всех CpG в геноме. Основная часть метилированной ДНК ассоциирована с различными повторяющимися элементами, на которые приходится приблизительно 45% генома человека, включая транспозоны, которые представляют собой неактивный хроматин, защищающий организм от работы чужеродных генов (Nakao, 2001).

Исключение из общего правила метилирования ДНК составляют так называемые «CpG островки», которые избегают метилирования и транскрибируются на протяжении всей жизни (Bird, 2002). Эти районы генома имеют размер более 200 нуклеотидов, в которых процентное содержание CG

оснований составляет от 50% и более, а соотношение ожидаемого количества динуклеотидов CpG к действительному на данном участке должно составлять более 0.6 (Jones and Takai, 2001). Неметилированные «CpG островки» чаще всего располагаются в регуляторных последовательностях генов, в экзон-интронных участках и в промоторных областях генов «домашнего хозяйства», которые кодируют белки необходимые для жизнедеятельности клеток и экспрессируются во всех клетках независимо от их специфичности. Существуют также «CpG островки» неассоциированные с промоторными областями генов «домашнего хозяйства». Так, тканеспецифичные гены человека и мыши (*α-глобин*, *MyoD1* и *Thy-1*) содержат в своих промоторных областях «CpG островки», которые метилируются в тех тканях, в которых они не экспрессируются. Известно, что иногда в статусе метилирования «CpG островков» могут происходить изменения, часто связанные с развитием раковых заболеваний у человека. Более того, небольшая часть «CpG островков», связанных с импринтированными генами, может подвергаться метилированию во время эмбриогенеза и оставаться молчащими на протяжении всей жизни организма (Davies et al., 2005).

Изменения в ДНК-метилировании могут приводить к онкообразованию и нарушениям эмбриогенеза. Например, метилирование промоторных областей генов опухолевых супрессоров провоцирует развитие раковых заболеваний, а локальное деметилирование или гиперметилирование в местах импринтинга приводят к аномалиям в развитии (Туско, 2000).

За сохранение статуса метилирования генома из поколения в поколение клеток отвечают особые ферменты — ДНК-метилтрансферазы, что обеспечивает долговременное поддержание определенных профилей экспрессии генов (Jurkowska et al., 2011).

Одной из главных и жизненно необходимых ДНК-метилтрансфераз является DNMT1. DNMT1 поддерживает уже существующий уровень и локализацию метилирования в процессе репликации, восстанавливая его в первоначальном виде на дочерней молекуле ДНК, поэтому её принято

называть «поддерживающей» метилтрансферазой (Yoder et al., 1997).

Кроме DNMT1 для позвоночных характерны DNMT3a и DNMT3b — это *de novo* метилтрансферазы, которые отвечают за восстановление нормального статуса метилирования перед имплантацией и за перестройки во время гаметогенеза (Okano et al., 1999). Оба фермента DNMT3 гомологичны друг другу, но кодируются разными генами. DNMT3a и DNMT3b могут добавлять метильную группу как к неметилированным, так и полуметилированным CpG динуклеотидам, не отдавая предпочтения полуметилированным участкам, как в случае с DNMT1 (Gowher and Jeltsch, 2001).

Существует ещё одна ДНК-метилтрансфераза, DNMT3L, которая экспрессируется в эмбрионе во время гаметогенеза, когда происходит геномный импринтинг, таким образом картина экспрессии *Dnmt3L* совпадает с экспрессией *Dnmt3a* и *Dnmt3b*. DNMT3L не обладает метил-ДНК трансферазной активностью, однако помогает *de novo* метилтрансферазам, повышая их сродство к S-аденозил-L-метионину (Kareta et al., 2006).

Недавно была описана и охарактеризована ещё одна модификация цитозина — 5-гидроксиметилцитозин (5hmC) (Zhang et al., 2010). Впервые 5hmC был обнаружен в клетках Пуркинье и гранулярных клетках головного мозга мыши, где эта модификация составляла 0.6% и 0.2% от всех нуклеотидов, соответственно, но отсутствовала в раковых клеточных линиях человека и мыши. Уровень 5hmC в геноме составляет около 10% от 5mC (Kriaucionis and Heintz, 2009). При изучении распределения 5hmC в геноме обнаружили, что эта модификация находится в основном в районах генов и особенно часто в промоторах. Более того, для некоторых генов была показана положительная корреляция между уровнем их экспрессии и количеством 5hmC в их последовательности (Song et al., 2011).

Было показано, что 5mC может подвергаться деметилированию и окислению до 5hmC, а затем до 5-карбоксилцитозина (5caC) и 5-формилцитозина (5fC) (Spruijt et al., 2013). Окисление 5mC до 5hmC и далее до 5caC может иметь два последствия: отмена репрессивного влияния 5mC или

замещение 5mC на немодифицированный цитозин с помощью репликации ДНК (Branco et al., 2012).

Окисление 5mC до 5hmC осуществляется за счёт белков ТЕТ-семейства (Ten Eleven Translocation): ТЕТ1, ТЕТ2 и ТЕТ3 (Рис.1). Уровень 5hmC наиболее высок в мышечных эмбриональных стволовых клетках, и этот уровень, так же как и степень экспрессии ТЕТ1 и ТЕТ2, понижаются в процессе дифференцировки (Ito et al., 2010). Кроме того, белок ТЕТ1 часто связывается с областями «СрG островков», как следствие, связанные с ТЕТ1 промоторы имеют более низкое содержание 5-метилцитозина. Возможно, ТЕТ1 позволяет поддерживать СрG островок в неметилированном состоянии, за счет блокирования доступа ДНК-метилтрансферазам и их кофакторам к ДНК. Было показано, что Tet1 в эмбриональных стволовых клетках подавляет транскрипцию генов *Sox17*, *Gata6* и *Cdx2*, а при нарушении экспрессии Tet1 запускается дифференцировка в экстраэмбриональные ткани (Ito et al., 2010). Белок Tet3, в отличие от Tet1 and Tet2, активно экспрессируется в зиготе и способствует активному деметилированию мужского пронуклеуса. Более того, было показано, что нокаут *Tet3* приводит к нарушению развития эмбриона мыши (Gu et al., 2011).

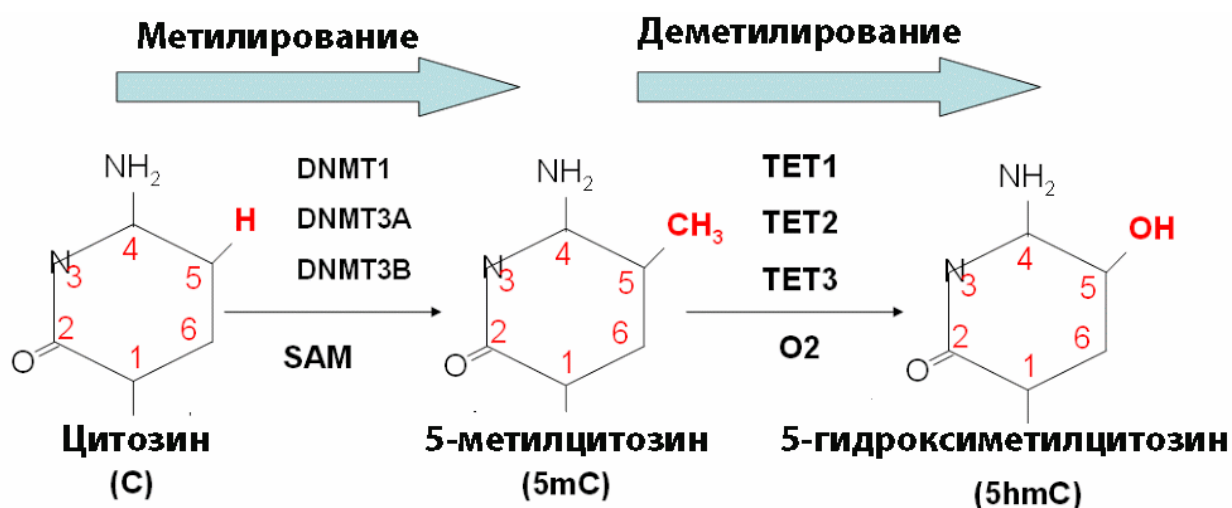


Рис. 1. Схема процесса метилирования и деметилирования.

Таким образом, процессы метилирования и деметилирования ДНК играют важную роль в регуляции транскрипции генов, но одной лишь

модификации нуклеотидов недостаточно для полного надгенетического контроля.

1.1.2 Метил-ДНК связывающие белки

Метилирование участков ДНК часто связано с подавлением экспрессии генов. Репрессия транскрипции с одной стороны осуществляется благодаря прямой репрессии, когда метилирование ДНК препятствует связыванию некоторых активаторов транскрипции с ДНК. С другой стороны, с метилированной последовательностью ДНК могут взаимодействовать метил-ДНК-связывающие белки, которые привлекают комплексы белков-репрессоров и подавляют транскрипцию. Существует несколько семейств таких метил-ДНК связывающих белков.

Так, у позвоночных есть белки, которые могут связываться с метилированной ДНК с помощью метил-ДНК связывающего домена (MBD). Семейство MBD включает белки: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 и MeCP2 (Fatemi and Wade, 2006). Эти белки участвуют во многих процессах по контролю стабильности генома, в раннем эмбриональном развитии, созревании нейронов, дифференцировке Т-клеток и др. (Hendrich et al., 2001). Впервые домен MBD был идентифицирован в белке MeCP2 (Nan et al., 1993). Позднее была смоделирована вторичная структура MBD домена, которая оказалась схожей для всех белков этого семейства. Структура домена позволяет MBD белкам специфично узнавать метилированные участки ДНК и взаимодействовать с метилированными CpG-динуклеотидами в большой бороздке (Ohki et al., 2001). Исключение составляет белок MBD3, который содержит ряд аминокислотных замен в домене MBD у млекопитающих, что препятствует связыванию с метилированными CpG-парами. Тем не менее, было показано, что MBD3 и MeCP2 могут связываться с гидроксиметилированной ДНК (Baubec et al., 2013).

Белок MBD1 является самым большим в семействе MBD. Помимо MBD домена на N-конце, он имеет TRD домен (Transcriptional Repression Domain)

на С-конце. MBD1 может иметь три СХХС домена («цинковые пальцы») (Рис. 2). Два из них – СХХС1 и СХХС2 – позволяют MBD1 связываться с метилированной ДНК, однако СХХС3 участвует в связывании с неметилированной ДНК. Благодаря этому MBD1 участвует не только в регуляции экспрессии посредством метилирования, но и в модификации гистонов. Кроме того, была показана важная роль MBD1 в опухолеобразовании и нейрональном развитии (Xu et al., 2013). Известно, что MBD1 привлекает главным образом белки, которые модифицируют гистоны, и участвует в образовании гетерохроматина.

MBD2 и MBD3 являются родственными белками и, вероятно, произошли путем дупликации от единого предшественника MBD2/MBD3, который все еще присутствует в геномах некоторых многоклеточных, таких как *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila* (Marhold et al., 2004). В пользу этой гипотезы выступает тот факт, что данные гены обладают сходной интрон-экзонной структурой, а аминокислотная последовательность самих белков идентична на 70%. Домены MBD и CC (coiled-coil) у них являются общими. Кроме этого, у MBD2 на N-конце присутствует глицин-аргинин богатый домен (GR) и TRD домен (Transcriptional Repression Domain). У MBD3 белка на С-конце находится область полиглутамата. Генетический нокаут MBD3 приводит к остановке эмбрионального развития у мышей сразу после имплантации. Напротив, отсутствие MBD2 не оказывает серьезного влияния на развитие. Более того, у мышей, не имеющих MBD2, не выявлено нарушений ни в процессах импринтинга или X-инактивации, ни в репрессии мобильных элементов.

MBD4 — белок размером около 60 кДа и имеющий два функциональных домена: MBD домен и гликозилазный домен (Рис. 2). Так же как MBD1, MBD2 и MeCP2, он связывается с метилированной ДНК *in vitro* и локализуется в ядре в районах гетерохроматина, однако не участвует в регуляции экспрессии генов. Удаление MBD4 приводит к повышенной вероятности

опухолеобразования (Klose and Bird, 2006). Это объясняется тем, что данный белок принадлежит к системе репарации.

У MeCP2 на N-конце содержится MBD домен (Рис. 2), на С-конце — TRD домен. MeCP2 экспрессируется во всех тканях, особенно его много в клетках мозга. Молекулярная масса данного фактора приблизительно равна 70 кДа, а для эффективного связывания MeCP2 с ДНК достаточно всего одного симметрично метилированного цитозина в CpG-динуклеотиде. Было показано, что MeCP2 взаимодействует с комплексами Sin3A и HDAC2. MeCP2 может взаимодействовать и с другими транскрипционными факторами или ко-репрессорами, например, с комплексом SMRT (Klose and Bird, 2006). Однако, при исследовании эффекта нокдауна и увеличении экспрессии MeCP2 в гипоталамусе, было показано, что этот белок участвует не только в репрессии, но и в активации транскрипции (Chahrour et al., 2008).

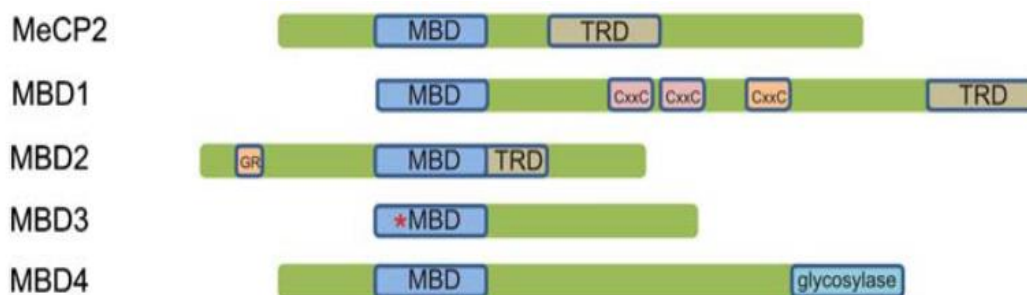


Рис. 2. Семейство MBD белков. MBD — метил-ДНК-связывающий домен, TRD — репрессивный домен, CxxC — домен «цинковые пальцы», Glycosylase — гликозилазный домен, GR — остатки глицина и аргинина (Bogdanović and Veenstra, 2009).

Ещё одно семейство метил-ДНК-связывающих белков представлено белками UHRF 1-2. Структура белков данного семейства включает в себя 5 функциональных доменов: убиквитин-подобный домен (Ubl) на N-конце, тьюдор домен TD, PHD (plant homeodomain) домен, SRA-домен (SET and RING associated) и RING finger домен на С-конце. За связывание с метилированной ДНК отвечает домен PHD (Zhang et al., 2011a).

1.1.3 Роль эпигенетики и метил-ДНК связывающих белков в нервной системе

Эпигенетические механизмы могут быть вовлечены в регулирование таких процессов в нервной системе, как дифференцировка нейронов и глии, пластичность нейронов, а также регулирование высшей нервной деятельности (памяти и познания) (Ravi and Kannan, 2013).

На ранних сроках беременности, нейрональные стволовые клетки ассиметрично делятся и дифференцируются в нейроны, а на поздних стадиях в астроциты и олигодендроциты (Fujita, 2003). Интерлейкин 6-подобные сигнальные цитокины (IL-6) являются главными внешними факторами, направляющими клетки на астроцитарную дифференцировку. Ингибирующий фактор лейкемии (LIF) и цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), относящиеся к интерлейкин 6-подобным цитокинам, влияют на дифференцировку астроцитов через JAK (Janus kinase) сигнальный путь и активационный транскрипционный фактор STAT3. Гипометилирование сайта связывания для STAT3 в промотере *GFAP* (glial fibrillary acidic protein), который является астроцитарным маркером, запускает экспрессию астроцитарных генов на поздних стадиях беременности (Takizawa et al., 2001).

Ключевыми эпигенетическими переключателями, которые запускают астроцитарную дифференцировку, являются *de novo* метилтрансферазы DNMT3a и DNMT3b (Feng et al., 2005). Уровень экспрессии этих метилтрансфераз отличается в разных типах клеток ЦНС. Отсутствие поддерживающей метилтрансферазы DNMT1 приводит к преждевременному астроглиогенезу (Fan et al., 2005), что подтверждает тот факт, что деметилирование способствует дифференцировке астроцитов.

MBD-белки тоже играют важную роль при нейрональной дифференцировке и экспрессируются в нейронах, но не в астроцитах и олигодендроцитах. Так, эктопическая экспрессия MBD1 ингибирует дифференцировку астроцитов и запускает нейрональную дифференцировку у

нейроэпителиальных клеток (клеток-предшественников нервной ткани) (Setoguchi et al., 2006).

На эпигеноме взрослого организма может влиять эффект материнской заботы, так как именно в раннем детстве устанавливаются эпигенетические марки, которые впоследствии влияют на поведение. Подобные эпигенетические эффекты были хорошо исследованы на животных моделях. Было показано, что качество родительской заботы и стрессовые события в раннем детстве могут значительно влиять на развитие мозга и функционирование нейронов. От окружающей среды в раннем детстве зависит развитие способности приспосабливаться к стрессовым условиям и развитие когнитивных нарушений уже у взрослого организма (McEwen et al., 2012).

Было показано, что изменение эпигенетики в раннем детстве приводит к изменениям в нейроэндокринном ответе, нарушениям функционирования метаболической и иммунной системы (Weaver et al., 2005). Например, механизм, определяющий поведенческий фенотип потомства с различным уровнем материнского ухода, заключается в различии уровня метилирования и ацетилирования гистона H3 в области промотора гена глюкокортикоидных рецепторов в нейронах гиппокампа. Было показано, что у животных, окруженных заботой в детстве, ген глюкокортикоидного рецептора оставался незаметилированным и активно транскрибировался, что коррелировало с высоким уровнем ацетилирования гистонов (Weaver et al., 2004, 2006). У животных, не получивших нужного ухода в детстве, напротив, наблюдалось метилирование цитозинового остатка и пониженное количество экспрессируемой мРНК.

Стабильность метилированных цитозинов тоже влияет на эпигенетическую пластичность нейронов и долговременную память, которая предполагает, что следы событий в жизни сохраняются в качестве различных модификаций ДНК (Bali et al., 2011). При обучении и формировании воспоминаний о пережитом стрессе происходит метилирование и замолкание гена *phosphatase 1* и деметилирование и активация генов синаптической

пластичности *reelin* и *BDNF* (Brain-derived neurotrophic factor) (Lubin et al., 2008; Roth, 2012). Белок *BDNF* интересен тем, что стимулирует и поддерживает развитие нейронов, а также является ключевым регулятором синаптической пластичности и формирования памяти, а также способствует возникновению антидепрессантного эффекта. При подавлении экспрессии гена *BDNF* возникает тревожное и депрессивное состояние (Björkholm and Monteggia, 2015).

Изменения в процессе метилирования ДНК связаны с различными заболеваниями человека, такими как рак и умственные расстройства, включающие синдром Ретта, синдром ICF, ломкость X-хромосомы и другие (Robertson and Wolffe, 2000). Немаловажную роль в причине этих заболеваний играют метил-ДНК связывающие белки.

Например, при возникновении точечных мутаций в гене *MeCP2* у человека развивается психоневрологическое наследственное заболевание — синдром Ретта. У больных, преимущественно девочек, происходят: замедление психического развития, необратимые нарушения мозга, стереотипия, затруднение дыхания и т.д. (Roux and Villard, 2010). Потеря гена *MeCP2* у мышей также ведёт к значительным нейрональным нарушениям, сходных с признаками синдрома Ретта у человека, которые сопровождаются нарушениями двигательной активности, изменением уровней биогенных аминов и экспрессии генов *BDNF* и *Dcx5*, кодирующего в нейронах одну из субъединиц рецептора глутамата (Panayotis et al., 2011; Roux et al., 2010). С другой стороны, гиперэкспрессия *MeCP2* в нейронах у мышей приводит к тяжелой двигательной дисфункции и судорогам. Кроме того, примерно 30% животных с гиперэкспрессией *MeCP2* погибают на первом году жизни (Collins et al., 2004).

До сих пор неясно, как метил-ДНК связывающий белок *MBD1* вовлечён в регуляцию экспрессии нейрональных генов и какова его роль в поддержании стабильности генома. Однако известно, что хотя *MBD1* нокаутные мыши здоровы и фертильны, у них наблюдается пониженный нейрогенез, ухудшение

пространственного обучения и повышенная нестабильность генома в нервных клетках (Zhao et al., 2003). Тройной генетический нокаут *MeCP2/MBD2/Kaiso* приводит к временному нарушению дифференцировки нейронов на ранних этапах (Martín Caballero et al., 2009). Единственным выраженным фенотипическим проявлением нокаута *MBD2* является нарушение материнского поведения, а *MBD3* нокауты гибнут в эмбриональном периоде (Hendrich et al., 2001).

1.2 Участие метил-ДНК связывающих белков в воспалении

Воспаление — часть неспецифического иммунного ответа, происходящего вследствие воздействия на организм факторов различного происхождения. Во время воспалительного процесса происходит увеличение притока крови, повышение клеточного метаболизма, расширение сосудов, секреция медиаторов воспаления. При нарушении воспалительного процесса, который в нормальных условиях является самоограничивающимся, развиваются хронические воспалительные заболевания (Ferrero-Miliani et al., 2007).

Развитие воспалительного процесса начинается с того, что к месту повреждения привлекаются многочисленные клетки врождённой иммунной системы (нейтрофилы, лейкоциты, макрофаги, моноциты и др.). Клетки иммунной системы выделяют многочисленные цитокины, небольшие пептидные информационные молекулы, которые регулируют межклеточные взаимодействия, выживаемость клеток, пролиферацию и апоптоз. Они также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия. Цитокины синтезируются моноцитами, лимфоцитами, макрофагами, а также фибробластами, эндотелиальными, эпителиальными и другими клетками. В зависимости от типа продуцирующих клеток (лейкоциты, моноциты) цитокины обозначают как интерлейкины, монокины и др. (Moldoveanu et al.,

2015). Цитокины разделяют на несколько групп относительно их особенностей и биологического действия:

- 1) Провоспалительные — обеспечивают мобилизацию воспалительного ответа (интерлейкины (IL) 1, 2, 6, 8, ФНО α (TNF α), интерферон γ (IFN- γ));
- 2) Противовоспалительные — ограничивают развитие воспаления (интерлейкины 4,10, TGF β)
- 3) Регуляторы клеточного и гуморального иммунитета — обладают собственными эффекторными функциями (противовирусными, цитотоксическими).

Известно, что метил-ДНК связывающие белки принимают активное участие в развитии воспалительных процессов. Было показано, что ключевым в контроле активации Т-хелперных клеток 2 (Th2) является метил-ДНК связывающий белок MBD2, который регулирует экспрессию генов, участвующих в процессировании антигенов (Cook et al., 2015).

При мутациях гена *MECP2* и развития Ретт-синдрома происходит нарушение регуляции цитокинов. Например, происходит увеличение экспрессии цитокинов (кроме IL-4), продуцируемых Th1 и Th2, а также уменьшается уровень IL-22 (Leoncini et al., 2015). Более того, *MECP2* необходим для поддержания экспрессии в регуляторных Т-лимфоцитах гена *Foxp3*, который регулирует транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в подавлении иммунного ответа. Удаление *MeCP2* приводит к спонтанной иммунной активации у мышей и нарушениям защиты от аутоиммунитета. Более того, у мышей, лишенных *MeCP2*, нарушается способность подавлять Т-клеточно-опосредованные колиты. Таким образом, в норме *MeCP2* обеспечивает правильное функционирование регуляторных Т-лимфоцитов, которые контролируют силу и продолжительность иммунного ответа через регуляцию функции Т-эффекторных клеток (Т-хелперов и Т-киллеров) (Li et al., 2014).

В результате хронического воспалительного процесса развивается около 15 % всех раковых заболеваний (Balkwill and Mantovani, 2001). Так, например, гепатоцеллюлярная карцинома возникает от вирусного гепатита, аденокарциномы пищевода возникают от заболевания пищевода Баретта, раку желудка даёт начало гастрит, вызванный *Helicobacter Pylori*, а рак толстой кишки может быть результатом воспалительного заболевания кишечника - язвенного колита (Quante and Wang, 2008).

При долгих и обширных колитах вероятность появления колоректального рака (рака толстой кишки) возрастает, а при воздействии противовоспалительной терапии такая вероятность уменьшается (Nieminen et al., 2014). Колоректальный рак обычно начинается как доброкачественный полип, который разрастается из слизистой оболочки, а со временем преобразуется в злокачественную опухоль (Рис. 3).

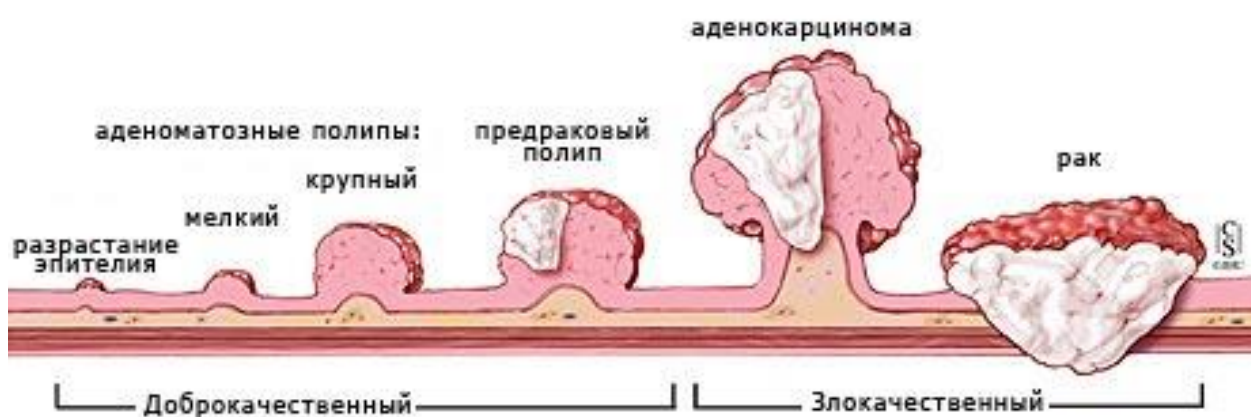


Рис. 3. Развитие колоректального рака.

Известно, что тканеспецифичный нокаут гена *MBD3* в кишечнике мыши приводит к увеличению пролиферации клеток. При воздействии азоксиметана и ДСН (использующихся совместно для индукции колит-ассоциированного канцерогенеза) у мышей, лишённых гена *MBD3* в кишечнике, возрастает количество и размер опухолей (Aguilera et al., 2011).

1.3 Изучение воспалительных процессов кишечника

Активному изучению воспаления в кишечнике способствует возрастающее количество моделей экспериментальных животных с клиническими проявлениями, сходными с наблюдаемыми у человека. Конкретные причины таких воспалительных заболеваний кишечника, как язвенный колит и болезнь Крона, остаются неизвестными. Предполагается, что причинами могут быть: генетическая предрасположенность, экологические факторы, нарушение барьерной функции, дисбаланс микрофлоры, а также нарушенный кишечный иммунный ответ.

Существует много разнообразных методов, позволяющих смоделировать развитие воспалительных заболеваний кишечника на животных.

Модель с использованием декстрана сульфата натрия (ДСН) является одной из самых популярных и широко используемых моделей для индукции язвенного колита благодаря простоте использования и воспроизводимости результатов. ДСН — это водорастворимый, негативно заряженный сульфатированный полисахарид, состоящий из декстрана и сульфатированной ангидроглюкозы (Ishioaka et al., 1987).

У животных, подвергшихся воздействию декстрана сульфата натрия, наблюдается потеря веса, жидкий стул и кровотечение в прямой кишке. При гистологическом анализе в кишечнике выявляются эрозия подслизистой основы, истощение клеток Гоблетта, язвы, инфильтрация воспалительными клетками и гиперплазия (Huang et al., 2010).

Точный механизм, благодаря которому ДСН вызывает воспаление кишечника, до сих пор не ясен. Возможно, колит, опосредованный воздействием ДСН, развивается из-за токсичности этого вещества для эпителия толстого кишечника, где он нарушает комплекс плотных контактов. В результате, нарушается барьерная функция кишечника и внутрь проникают бактерии, что способствует синтезу воспалительных цитокинов и развитию воспаления (Poritz et al., 2007). Кроме того, антикоагулянтное действие ДСН

усугубляет кишечное кровотечение. Недавно было показано, что ДСН формирует в толстой кишке нано-липокомплексы с цепочками жирных кислот MCFAs (medium-chain-length fatty acids) (Laroui et al., 2012). Специфичность эффекта воздействия ДСН исключительно на толстую кишку может быть связана с активной абсорбцией электролитов в присутствии многочисленных бактерий именно в этом отделе.

1.4 ВТВ/ВОZ-семейство белков

ВТВ/ВОZ-семейство (Bric a bras, Tramtrack, Broad complex/Pox virus and Zinc finger) включает транскрипционные факторы, играющие важную роль в эмбриональном развитии и в раке, а также белки, принимающие участие в регуляции формирования цитоскелета и ионных каналов. Классическая структура представителей этого семейства подразумевает наличие двух функциональных доменов: ВТВ/ВОZ домен на N-конце и домен «цинковые пальцы» С₂Н₂ типа на С-конце. Многие представители данного семейства являются транскрипционными репрессорами, например, Tramtrack, PLZF, BCL6 и др. Некоторые из них, например GAGA, могут принимать участие в перестройке хроматина (Ahmad et al., 1998).

Некоторые из белков ВТВ/ВОZ (NIC-1, Bcl-6, PLZF, ZF5, MIZ-1) выполняют роль онкогенов или опухолевых супрессоров у позвоночных. Например, Bcl-6 (B cell leukemia/lymphoma 6) — протоонкоген, связан с возникновением ряда лимфом у человека и является транскрипционным репрессором различных генов, включая циклины D1 и D2. Белок PLZF (promyelocytic leukemia ZF) является онкогеном, вовлечённым в развитие острой промиелоцитарной лейкемии (Carbone et al., 2006). Другие представители ВТВ/ВОZ-семейства транскрипционных факторов могут связываться с метилированной ДНК (Рис. 4). Такими белками являются Каизо, а также каизоподобные белки ZBTV4 и ZBTV38, которые при помощи доменов «цинковые пальцы» связывают метилированную ДНК *in vitro* и *in vivo* (Filion et al., 2006; Prokhortchouk and Hendrich, 2002; Prokhortchouk et al., 2001).

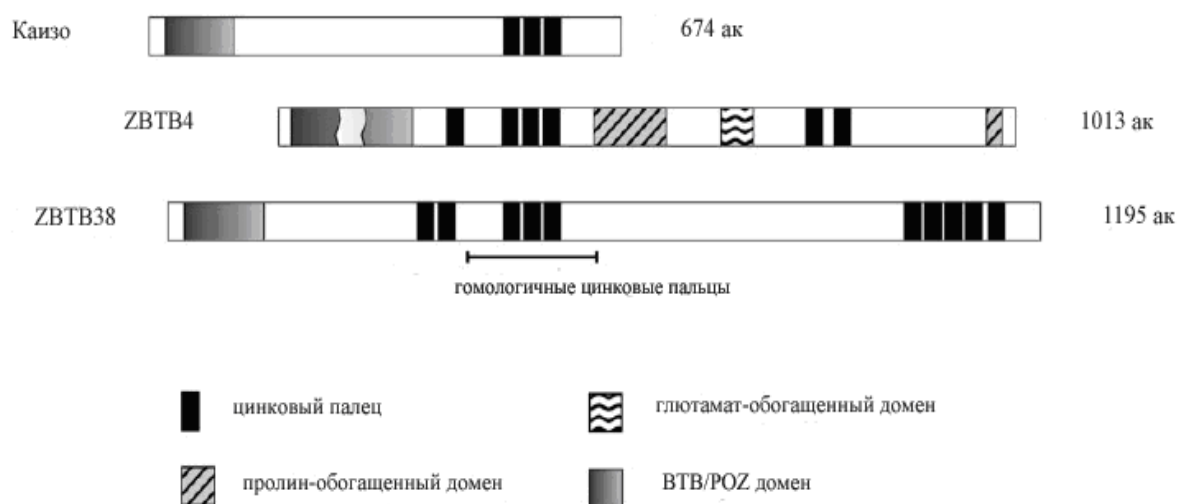


Рис. 4. Каизоподобные белки (Filion et al., 2006).

VTB/POZ белки вовлечены в регуляцию различных аспектов Т-клеточного адаптивного иммунитета. Например, BCL6 является ключевым фактором для дифференцировки и выживания фолликулярных Т-хелперов (Th), а также регулятором Т- и В-лимфоцитов (Hollister et al., 2013). В линии $Bcl6^{-/-}$ не подавляется Th2-тип иммунного ответа *in vivo*, что приводит к сильному воспалению лёгких (Sawant et al., 2012). Белок PLZF необходим для развития и функционирования натуральных киллеров (NK-клетки) и других клеток врождённого иммунитета, а также может сдерживать воспалительный ответ (Sadler et al., 2015). Белок Miz-1 (Myc-interacting ZF protein 1) необходим для раннего развития линии Т-клеток и обеспечивает правильное распознавание и процессирование антигенов Т-клеточными рецепторами и регулирование P53 генов-мишеней в тимоцитах (Saba et al., 2011).

1.5 Структура метил-ДНК-связывающего белка Каизо

Метил-ДНК-связывающий белок Каизо относится к VTB/POZ семейству и содержит два функциональных домена: N-концевой VTB/POZ домен и три «цинковых пальца» C_2H_2 типа на C-конце (Filion et al., 2006). Домен «цинковые пальцы» может легко формировать гибкую структуру, адаптирующуюся к структуре ДНК (Рис. 5). Каждый цинковый палец является структурно независимой единицей, благодаря чему комбинация из нескольких пальцев со

средством к разным последовательностям может обеспечить высокоспецифичное взаимодействие с участками ДНК (Isalan et al., 1998).

Белок Каизо был открыт в 1999 году учеными Джульеттой Даниэль и Альбертом Рейнольдсом. Они показали, что Каизо образует комплекс с p120-катенином в дрожжевой двугибридной системе (Daniel and Reynolds, 1999; Prokhortchouk et al., 2001).

Каизо обладает бимодальной ДНК-связывающей активностью, то есть с помощью домена «цинковые пальцы» связывается не только с метилированными CpG динуклеотидами, но и с неметилованной последовательностью (TCCTGCNA, где N-A, T, C, G), названной Каизо связывающим сайтом — KCC (Zhigalova et al., 2015). Последовательность KCC характерна для промоторов таких генов, как *wnt11*, *matrilysin* и *siamois* у *Xenopus laevis* (Kim et al., 2002; Park et al., 2005; Spring et al., 2005). Связывание Каизо с ДНК происходит с помощью первых двух доменов «цинковые пальцы» в большой бороздке, в то время как высокоспецифичное связывание происходит благодаря связыванию третьего «цинкового пальца» в малой бороздке (Buck-Koehntop et al., 2012; Daniel et al., 2002; Prokhortchouk et al., 2001). При помощи ВТВ/POZ домена Каизо может взаимодействовать с репрессивным комплексом, состоящим из корепрессора N-CoR (nuclear receptor corepressor 1) и гистоновой деацетилазы HDAC3 (Рис. 5). *In vitro* Каизо/N-CoR комплекс способен связываться с CpG-богатыми последовательностями за счёт метилирования и специфических последовательностей. Предполагается, что способы связывания Каизо с метилированной и неметилованной ДНК не являются взаимоисключающими. Так было показано, что Каизо может связываться и регулировать ген *cyclinD1* как путем присоединения к специфическим сайтам связывания, так и связываясь с метилированной ДНК (Pierre et al., 2015). Было показано, что Каизо связывает одиночные метилированные CpG в промоторе и экзоне гена *S100A3* (Zhigalova et al., 2015).

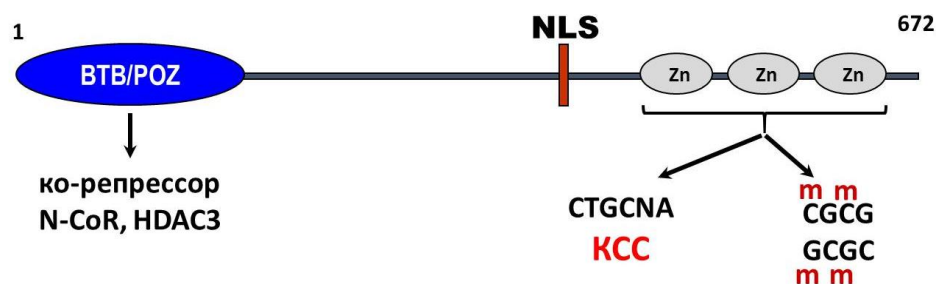


Рис. 5. Строение белка Каизо. Белок Каизо состоит из 672 аминокислотных остатков и включает N-концевой POZ/BTB домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия, и три цинковых пальца C2H2 типа, ответственных за связывание с ДНК.

У Каизо существует последовательность NLS, являющаяся сигналом ядерной локализации. Каизо перемещается в ядро путём взаимодействия NLS с ядерным рецептором-импортёром Importin-alpha2 (Kelly et al., 2004).

Недавно было показано, что белок Каизо не может связываться с гидроксиметилированной ДНК, в частности с KCC, содержащим 5hmC. Однако, сродство Каизо и ДНК сохраняется в случае полуметилированной или полугидроксиметилированной последовательности (Qin et al., 2015; Zhenilo et al., 2013).

1.6 Роль белка Каизо у позвоночных животных

У земноводных и рыб белок Каизо необходим для развития мезодермы при участии белков β -катенина и Siamos (Park et al., 2005). На ранних стадиях развития эмбриона лягушек и рыб уровень метилирования зиготической ДНК очень высок, из-за чего транскрипция генов зародыша не происходит, а для синтеза белка используются запасённые материнские мРНК (Kim et al., 2004; Ruzov et al., 2004). Уменьшение количества Каизо у *Xenopus laevis* и у рыбы *Danio rerio* приводит к активации транскрипции генов зиготы на две стадии раньше стадии средней бластулы эмбриогенеза, поэтому эмбрионы не могут преодолеть стадию гаструляции и погибают (Ruzov et al., 2004, 2009a, 2009b).

В отличие от лягушек, генетический нокаут *Kaizo* у мышей (*Mus musculus*) не приводит к ярко выраженному фенотипу, они остаются живыми и фертильными (Prokhortchouk et al., 2006). Единственное изменение при

нокауте гена *Kaizo* заключается в повышенной пролиферативной активности мышечных эмбриональных фибробластов по сравнению с клетками дикого типа (Koh et al., 2014). При этом, нейрональные стволовые клетки, нокаутные по гену *Kaizo*, не отличаются ни по морфологии, ни по эффективности пролиферации от стволовых клеток нейронов мышечной дикого типа (Prokhortchouk et al., 2006).

У мышечной мРНК *Kaizo* убиквитарно экспрессируется в различных органах *in vitro*, а также в клеточных линиях, полученных из прямой кишки, легких, простаты и почек (Daniel and Reynolds, 1999; Della Ragione et al., 2006). В самых ранних работах описывалась ядерная локализация *Kaizo* в различных клеточных культурах млекопитающих *in vitro*, например, в MDCK (линия клеток почки собаки) и в NIH 3T3 (клетки соединительной ткани мышечной) (Daniel and Reynolds, 1999; Daniel et al., 2001). Однако, о локализации белка *Kaizo* в тканях и органах мышечной *in vivo* практически нет информации.

Kaizo может взаимодействовать с белком p120-катенином (Рис. 6), который был описан как субстрат для Src- и рецепторных тирозинкиназ и относится к семейству многофункциональных белков Armadillo (α -, β -, γ -катенины) (Anastasiadis and Reynolds, 2000; Reynolds et al., 1994). В норме p120-катенин локализуется преимущественно в цитоплазме, где взаимодействует и стабилизирует белок E-кадгерин. Белок p120-катенин связывается с околочелювочным доменом E-кадгерина и влияет на его стабильность, участвуя таким образом в клеточной адгезии (Daniel and Reynolds, 1999) (Рис. 6). p120-катенин связывает C-концевой домен E-кадгерина благодаря 1-5 Arm доменам. При гиперэкспрессии p120-катенина возможно его взаимодействие с C-концевой частью *Kaizo* через 1-7 Arm домены. *Kaizo* не взаимодействует ни с одним из членов кадгерин-катенинового комплекса (т.е. ни с одним из перечисленных белков: E-кадгерин, β -катенином, плакоглобином (γ -катенином) или α -катенином (Daniel and Reynolds, 1999), хотя было показано, что в мозге возможно взаимодействие *Kaizo* с δ -катенином, белком родственном p120-катенину (Rodova et al., 2004).

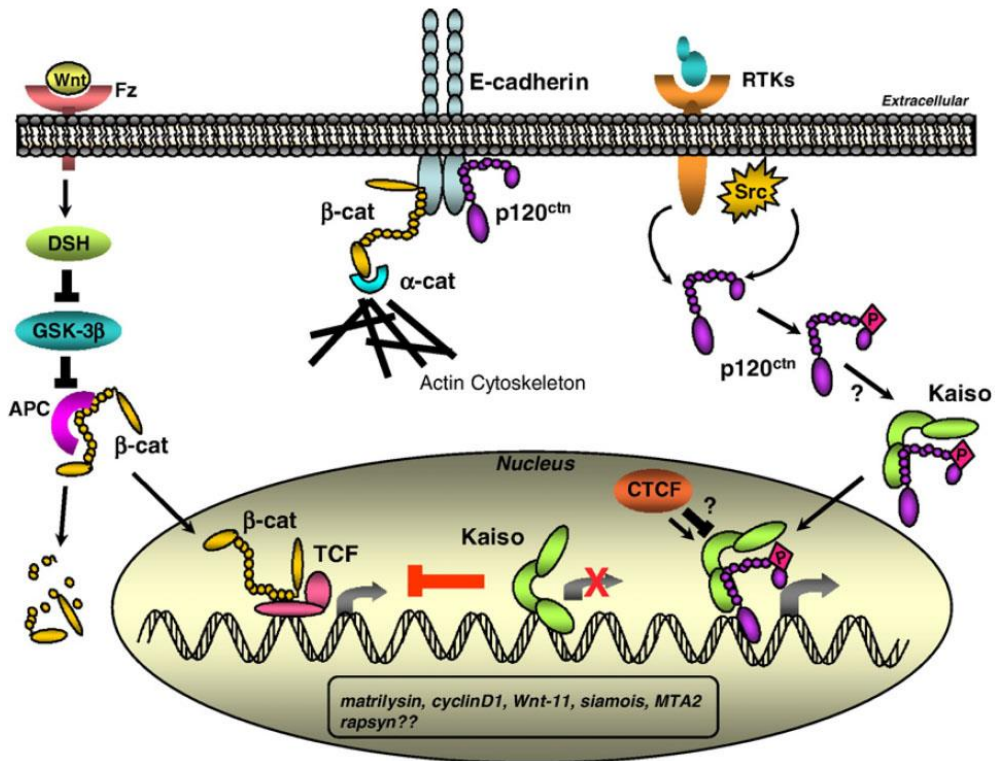


Рис. 6. Участие p120-катенина в клеточной адгезии и сигналинге (Daniel, 2007).

Было показано, что p120-катенин, при гиперэкспрессии, может взаимодействовать с Каизо в ядре и влиять на его перемещения в клетке (Daniel, 2007; van Hengel et al., 1999; Zhang et al., 2011b). Ядерная локализация p120-катенина может объясняться либо изменением его экспрессии, либо нарушением адгезивных контактов (van Hengel et al., 1999; Ireton et al., 2002). В ядре p120-катенин связывается с 2 и 3 доменом «цинковые пальцы» белка Каизо, что ослабляет его связывание с ДНК и препятствует репрессии транскрипции (Daniel and Reynolds, 1999; Daniel et al., 2002; Zhigalova et al., 2010). Физическое взаимодействие p120-катенина и Каизо, приводит к делокализации Каизо из ядра (Dai et al., 2010; Zhigalova et al., 2010) и образованию в цитоплазме комплекса Каизо/p120-катенин (van Hengel et al., 1999; Spring et al., 2005). Удаление Каизо из ядра приводит к повышению экспрессии генов, ответственных за пролиферацию и метастазирование. Например, активация экспрессии гена *cyclin D1* приводит к увеличению пролиферации клеток рака лёгкого (Jiang et al., 2012).

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). Было показано, что в человеческих опухолях Каизо может локализоваться как в цитоплазме, так и в ядре клеток. Цитоплазматический Каизо характеризует хроническую миелоидную лейкемию (Cofre et al., 2012), метастазирующий рак легких (Dai et al., 2009, 2010), карциному тимуса (Wang et al., 2012) и инвазивную лобулярную карциному (Vermeulen et al., 2012). Ядерная экспрессия наблюдалась при злокачественной карциноме протоков молочной железы (Vermeulen et al., 2012), при начальных стадиях рака лёгких (Dai et al., 2009) и карциномы желудка (Qin et al., 2015).

1.7 Белок Каизо как регулятор транскрипции

Несмотря на то, что Каизо обычно действует как репрессор транскрипции, например, генов-мишеней канонического и неканонического Wnt пути в *Xenopus laevis* (Donaldson et al., 2012; Kim et al., 2004; Park et al., 2005), он может связываться с неметилированными и транскрипционно активными генами в лимфобластоидной клеточной линии (GM12878) (Blattler et al., 2013). Более того, Каизо может действовать как активатор транскрипции гена *rapsyn* в культуре мышинных клеток, что предполагает двоякую роль Каизо в регуляции экспрессии генов (Rodova et al., 2004).

Благодаря своему POZ/ВТВ домену на N-конце Каизо может взаимодействовать с инсуляторным белком CTCF (CTC-binding factor), который является ДНК связывающим белком и играет важную роль в регуляции экспрессии генов в качестве блокатора энхансеров через его POZ домен (Defossez et al., 2005). CTCF модифицирует 3D организацию хроматина, открывая доступ к большому спектру генов. Изначально CTCF был найден как опухолевый супрессор при раке груди (Fiorentino and Giordano, 2012). Каизо может связываться с неметилированной ДНК рядом с сайтом связывания для

CTCF в человеческом инсуляторе 5' β -глобина, что снижает способность CTCF блокировать энхансер (Defossez et al., 2005).

Транскрипционная репрессия при помощи Каизо может играть важную роль в развитии канцерогенеза (Lopes et al., 2008; Prokhortchouk et al., 2006), ведь некоторые гены, подавляемые при помощи Каизо связаны с клеточной пролиферацией и метастазированием: *MTA2* (metastasis-associated gene 2) (Yoon et al., 2003), *Mmp-7* (matrix metalloproteinase, *matrilysin*) (Spring et al., 2005), *siamois*, *c-мус* и *cyclin D1* (Donaldson et al., 2012; Park et al., 2005; van Roy and McCrea, 2005). К тому же существуют данные о том, что мишенью белка Каизо является ген *S100A4/metastasin*, тоже связанный с метастазированием (Prokhortchouk et al., 2001).

In vivo Каизо направляет N-CoR-HDAC3 корепрессорный комплекс к нескольким метилированным промоторам, например к гену *MTA2* (Yoon et al., 2003). Известно, что при искусственном понижении экспрессии Каизо *in vitro* усиливаются пролиферативные и инвазивные характеристики клеточных линий, что связывают с активацией экспрессии гена *matrilysin (Mmp7)* (Dai et al., 2009, 2010).

Каизо также может напрямую репрессировать метилированный ген ретинобластомы *Rb* (De La Rosa-Velázquez et al., 2007). Более того, было показано, что Каизо регулирует экспрессию главного регулятора гипоксии *HIF1A*, что подразумевает участие Каизо в онкологических процессах, связанных с гипоксией (Pierre et al., 2015).

Было показано, что бактерии *Helicobacter pylori*, которые дают начало воспалению, гастриту и аденокарциноме желудка, провоцируют перемещение p120-катенина в ядро эпителиальных клеток желудка человека, что нарушает Каизо-опосредованную репрессию гена *Mmp-7* (Ogden et al., 2008). *Mmp7* является эффекторным белком Wnt-пути, который участвует в прогрессии многих типов раков, особенно колоректального рака (Adachi et al., 1999; Bloomston et al., 2002; Crawford et al., 1999).

Развитие колоректального рака может быть результатом хронического воспаления слизистой оболочки кишечника или наследственных синдромов: аденоматозного полипоза толстой кишки и наследственного рака толстой кишки без полипоза (синдром Линча). Аденоматозный полипоз толстой кишки часто провоцируется нарушениями экспрессии опухолевого супрессора APC (adenomatous polyposis coli). Линия мышей $Apc^{Min/+}$ обладает предрасположенностью к возникновению рака кишечника, так как несет аллель Apc^{Min} с мутированным геном Apc , что приводит к образованию нефункционального APC полипептида, ядерной аккумуляции β -катенина и активации генов канонического Wnt-пути (Fodde et al., 2001).

При скрещивании Каизо-нокаутных мышей с линией мышей $Apc^{Min/+}$, у полученных двойных нокауты, происходит увеличение продолжительности жизни и уменьшение опухолеобразования в прямой кишке (Prokhortchouk et al., 2006).

При локальной гиперэкспрессии Каизо в кишечнике, путём создания модели с трансгенным Каизо ($Kaiso^{Tg/+}$) под промотором гена *villin*, наблюдалось спонтанное развитие воспаления и увеличение дифференцировки клеток-предшественников в секреторные клетки (Chaudhary et al., 2013). При скрещивании модели с гиперэкспрессией Каизо и линии $Apc^{Min/+}$, у потомства ($Kaiso^{Tg/+}/Apc^{Min/+}$) наблюдалось значительное увеличение воспаления, экспрессии генов-мишеней Wnt-пути, количества полипов в кишечнике, а также снижение продолжительности жизни по сравнению с линией $Apc^{Min/+}$ (Pierre et al., 2015).

На *Xenopus laevis* было показано, что гиперэкспрессия Каизо способствует ингибированию связывания HDAC1 с β -катенином, в результате чего образуется комплекс β -катенина с TCF/LEF1, который активирует гены Wnt-пути. Предполагается, что гены-мишени Каизо частично перекрываются с генами, регулируемые при помощи TCF. Таким образом, у мышей и *Xenopus laevis* могут быть сходные механизмы регуляции генов Wnt/ β -катенинового пути, способствующие онкообразованию (Iioka et al., 2009).

В другой работе, было показано, что Каизо может участвовать в прогрессии рака кишечника не через Wnt-зависимый механизм, а связываясь и напрямую репрессируя метилированные опухолевые супрессоры и гены, участвующие в репарации. Например, Каизо может участвовать в репрессии гена *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) в раковой линии человеческих клеток прямой кишки (Lopes et al., 2008). Более того, при инактивации Каизо при помощи РНК интерференции в раковых клетках человека начинается экспрессия опухолевых супрессоров без изменения статуса метилирования. В результате, в отсутствие Каизо опухолевые клетки вступают в состояние покоя, становятся более чувствительными к химиотерапии и гибнут (Lopes et al., 2008).

Помимо возможной роли в канцерогенезе, Каизо принимает участие в активации апоптоза. Было показано, что при повреждении ДНК Каизо усиливает p53-опосредованный арест клеточного цикла и апоптоз, за счёт взаимодействия с p53-p300 комплексом (Koh et al., 2014). В мышинных эмбриональных фибробластах при отсутствии Каизо нарушается экспрессия генов апоптоза. Известно, что Каизо усиливает p53-опосредованный апоптоз путём увеличения экспрессии гена *APAF1*, а RelA/p65 снижает апоптоз путём нарушения взаимодействия между Каизо и p53 (Koh et al., 2015).

Таким образом, Каизо является важным объектом для изучения генетических, молекулярных и нейробиологических механизмов эпигенетической регуляции.

Глава 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Экспериментальные животные

В работе использовали мышей линии C57BL/6 (WT) и нокаутных по гену Каизо мышей линии C57BL/6/Kaiso^{-/-} (КО) (Prokhortchouk et al. 2006), которые содержались в питомнике лабораторных животных «ПУЩИНО». Для иммуногистохимических исследований использовались самцы и самки в возрасте 2-4 месяца линий WT и КО.

Для проведения эксперимента с ДСН использовались только самцы в возрасте 2 месяца WT (n = 6) и КО (n = 6). Все эксперименты проводились на животных, содержащихся в конвенциональных условиях и получающих неограниченный доступ к еде и воде (или 2%-му р-ру декстран сульфата натрия).

Для проведения поведенческих тестов использовались животные в возрасте 10 недель и весом 28.5 ± 1 г. За два дня до поведенческих экспериментов животные WT (n = 15) и КО (n = 10) помещались в клетки 40 x 25 x 15 для исключения группового эффекта и содержались в стандартных лабораторных условиях с дневным-ночным циклом (14 часов света 10 часов темноты) при температуре $22 \pm 0.2^\circ\text{C}$, получая неограниченный доступ к еде и воде. Исследования поведения проводили в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI61914X0010). 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.).

2.2. Генотипирование мышей

Геномную ДНК выделяли из биопсий уха или хвоста исследуемого животного. Образец ткани гомогенизировали в лизирующем буфере (100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 25 мМ ЭДТА, 0.5% SDS, 0.1 мг/мл протеиназа К) из расчёта 1 мл на 100 мг ткани и инкубировали 12 – 18 часов при температуре 37°C. Затем проводили очистку ДНК смесью фенол/хлороформ (1:1): добавляли 1 объём смеси фенол/хлороформ, тщательно перемешивали, центрифугировали 5 минут в настольной центрифуге при максимальных оборотах. Затем отбирали верхнюю фазу и добавляли к ней 1 объём хлороформа. Повторяли центрифугирование, отбирали водную фазу и добавляли 1/20 объёма 5М NaCl и два объёма 96% этанола. Инкубировали в течение 1 часа при –20°C, после чего центрифугировали раствор в настольной центрифуге при максимальных оборотах в течение 10 минут. Супернатант отбирали и осадок промывали 75% этанолом, дополнительно центрифугировали в течение 5 минут и отбирали супернатант. Полученную ДНК высушивали в термостате при 37°C и растворяли в деионизованной воде (mQ H₂O).

Генотипирование осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проводилось 25 циклов ПЦР (первичная денатурация ДНК при t 94°C 3 минуты, денатурация цикла при 94°C 30 сек, отжиг праймеров при 65°C 30 сек, элонгация при 72°C 35 сек.) с использованием следующих последовательностей праймеров (Табл. 1).

Таблица 1. Последовательность праймеров для генотипирования.

Kaiso LS3	5' GACACACAGTCAAAAGCTAGTG 3'
Kaiso BTBrev	5' AGGCTGAAAGGATGTTCCSTATG 3'
KaisoRev	5' AGAAGGCTGATCTCCATTTGGA 3'

Разделение продуктов ПЦР осуществлялось в 1.5% агарозном геле, приготовленном на 0.5xTBE буфере с добавлением бромистого этидия (10мг/мл). Перед нанесением образцы смешивались с 1 мкл краски,

содержащей 0.25% бромфенола, 0.25% ксиленианола и 30% глицерина. Электрофорез производили при силе тока в 40А в 0.5х TBE буфере. Данные электрофоретического исследования фиксировались при помощи цифровой камеры с УФ трансиллюминатором, длина волны УФ — 280 нм. Сканирование геля производили на приборе для документирования гелей (Typhoon trio Amersham, Англия).

Результаты генотипирования показали, что все мыши WT и КО имели соответствующий генотип (Рис. 7). Размеры продуктов амплификации соответствовали 338 п.о. (WT, Kaiso LS3 – Kaiso BTBRev) и 403 п.о. (КО, Kaiso LS3 – KaisoRev).

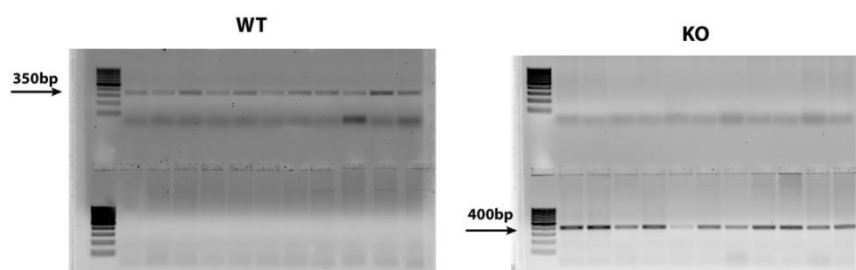


Рис.7. Генотипирование. WT 350 п.о., КО 400 п.о.

2.3. Гистологическое исследование

Получение парафиновых срезов и окрашивание гематоксилином/эозином

Для гистологического исследования материал фиксировали в растворе mDf (смесь 37%-ного формалина, этанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 6:3:1:10) в течение 1 сут при температуре 4°C, отмывали от фиксатора в растворе 70%-ного этанола и дегидратировали в спиртах 70% этанол (1 час), 96% этанол (1 час), 100% этанол (2 часа). Затем материал перекладывали в хлороформ (40 минут) и погружали в смесь гистомикс/хлороформ в соотношении 1:1 при температуре 37°C на 3 часа, далее переносили в гистомикс и оставляли при температуре 56°C на ночь. После этого ткани заливали в парафиновые блоки, состоящие из среды HISTOMIX («БиоВиртум», Москва). Приготовление срезов осуществлялось на микротоме (Microm HM 430). Серийные срезы толщиной

5-7 мкм помещали на поли-L-лизиновые стекла (Menzel Glazer, Германия), после чего срезы высушивали 5-24 ч при +37°C. Для окрашивания срезов, проводилась депарафинизация в двух сменах ксилола и регидратация в спиртах понижающейся концентрации (100% этанол, 96% этанол, 70% этанол) по 5 минут. Затем стёкла со срезами помещались в дистиллированную воду на 5 минут. Далее материал окрашивали гематоксилином (Biovitrum, Россия), промывали в дистиллированной воде и осветляли в 10% растворе аммиака для подсинения. Затем стёкла вновь промывались в дистиллированной воде и окрашивались спиртовым раствором эозина (Biovitrum, Россия). Потом стёкла промывались дистиллированной водой и обезвоживались путём проводки по спиртам с возрастающей концентрации (70% этанол, 96% этанол, 100% этанол) и ксилоле, после чего заключали в синтетическую монтирующую среду «Био маунт» (BioOptica, Италия). Анализировались препараты с помощью микроскопа DP71 (Olimpus, Япония).

2.4 Иммуногистохимическое окрашивание

Парафиновые срезы

При проведении иммунофлуоресцентного анализа для демаскировки эпитопов антигенов стёкла со срезами после депарафинизации и регидратации помещались в буфер Tris-EDTA (10mM Tris-base, 1mM EDTA, pH = 9) или 10mM цитратном буфере (pH = 6) и кипятились 20 минут в СВЧ-печи на минимальной мощности. Затем стёкла трижды промывались в PBS и инкубировались в блокирующем растворе, содержащем 3% BSA и 10% бычьей сыворотки (AMRESCO, США), в течение 1 часа при комнатной температуре для уменьшения фонового свечения. После этого срезы оставались инкубироваться на +4°C с первичными антителами в течение ночи. Затем стёкла со срезами трижды промывались в PBS и инкубировались с вторичными антителами и DAPI для окрашивания ядер (Vector Laboratories, США) при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Далее препараты

заклучали в мовиол под покровное стекло. Визуализировались препараты с помощью флуоресцентного микроскопа DP71 (Olimpus, Япония).

Криосрезы

Кусочки материала заклучали в среду для оптимальной резки криоблоков Killik (Bio-Optica, Италия) и замораживали в парах азота, далее хранили при -70°C . Срезы производили на криотоме HM 525 (Thermo Scientific, США). Для иммуногистохимического анализа использовали срезы, толщиной 5-7 мкм, которые фиксировали в 4% параформальдегиде (ПФА) в течение 15 мин, затем промывали 3 раза по 5 мин PBS и 5 мин инкубировали в растворе детергента 0.05% TRITON X-100/PBS (Хеликон, Россия) для пермеабилзации. Неспецифический сигнал блокировали с помощью инкубации в растворе, содержащем 3% BSA и 10% бычьей сыворотки, в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого срезы инкубировались в течение ночи на $+4^{\circ}\text{C}$ с первичными антителами, разведёнными в блокирующем растворе в течение ночи. Затем стёкла трижды промывались в PBS и инкубировались со вторичными антителами и DAPI для окрашивания ядер (Vector Laboratories, США) при комнатной температуре в темноте в течение 1 ч. Далее препараты заклучались в мовиол под покровное стекло. Визуализировались препараты с помощью флуоресцентного микроскопа DP71 (Olimpus, Япония).

2.5 Получение и иммуногистохимическое окрашивание тотального препарата семенных канальцев

Для получения тотальных препаратов семенных канальцев семенники изолировали из мыши, освобождали от белочной оболочки *tunica albuginea*, промывали раствором PBS. Далее семенные трубочки инкубировали 5 минут в термостате (5% CO₂) в 20 мл буфера EKRB (Bellvé e al. 1977), содержащем 1 мг/мл коллагеназы. (Gibco, США). Затем семенные канальцы промывали дважды по 5 минут в растворе PBS и фиксировали в растворе 10% формалина/10% метанола в течение 60 минут на 4°C . Далее семенные

канальцы промывались в растворе PBS и 5 минут в растворе PBS/0.05% TRITON X-100 (Хеликон, Россия) для пермеабилзации. Далее канальцы выдерживались в течение 1 часа при комнатной температуре в блокирующем растворе, содержащем 3% BSA (AMRESCO, США) и 10% бычьей сыворотки (Thermo Scientific, США). После этого срезы покрывались первичными антителами, разведёнными в блокирующем растворе и окрашивались в течение ночи на +4°C. Затем препараты трижды промывались в растворе PBS и окрашивались вторичными антителами и DAPI (Vector Laboratories, США) в течение 1 часа в темноте и заключались в мовиол под покрывное стекло. Визуализировались препараты с помощью флуоресцентного микроскопа DP71 (Olimpus, Япония).

Таблица 2. Список использованных антител.

Название антител	Изготовитель	Рабочее разведение
Первичные антитела		
Каизо	Предоставлены А.Рейнольдсом, США (Daniel et al. 2001)	1/2500
PCNA	Santa Cruz Biotechnology, США	1/100
GATA-4	Santa Cruz Biotechnology, США	1/100
PLZF	EMD Millipore, Германия	1/50
Vmi-1	Abcam, Англия	1/50
K8	Abcam, Англия	1/1000
p-120 катенин	Invitrogen, США	1/500
CD34	BD Pharmingen	1/500
anti-β-actin	Sigma-Aldrich, США	1/30000
Вторичные антитела		
Alexa Fluor 488	Sigma-Aldrich, США	1/1000
Alexa Fluor 555	Sigma-Aldrich, США	1/1000
F(ab) ₂ -FITC	Santa Cruz Biotechnology, США	1/100
Вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой	Sigma-Aldrich, США	1/20000

2.6 Иммуноблоттинг

Замороженные в жидком азоте кусочки кишки (50 мг) помещали в стерильные пробирки для гомогенизации с металлическим шариком, гомогенизацию проводили с добавлением 1 мл холодного буфера RIPA (1% NP-40, 50 mM Tris, pH = 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% SDS) в охлаждённом гомогенизаторе TissueLyser II (Qiagen, Германия). Затем лизаты инкубировали на льду в течение 30 минут и центрифугировали на 13 000 об/мин в течение 10 минут на +4°C. Затем супернатант перемещали в новую пробирку. Около 25 мг белка ресуспендировали в буфере для нанесения на денатурирующий полиакриламидный гель (50 mM трис-HCl, pH = 6.8, 100 mM β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 10% глицерина), кипятили в течение 5 минут и наносили в лунки полиакриламидного геля для электрофореза белков. После этого, белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану, используя аппарат для полусухого переноса белков Hoeffler (Amersham Biosciences, Англия). Для предотвращения неспецифического связывания белков, мембраны помещались в блокирующий раствор, содержащий 5% сухого молока в буфере TBS-T (pH = 7.4, 10mM Трис-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) и инкубировались 1 час при комнатной температуре. Далее мембрана переносилась в раствор 3% сухого молока/TBS-T с первичными поликлональными кроличьими антителами на белок Каизо (предоставлены А. Рейнольдсом, США) до конечной концентрации 1 мкг/мл и инкубировалась в течение ночи на 4°C. В качестве контроля использовали моноклональные антитела на β-actin (Sigma-Aldrich, США). Потом мембрана отмывалась в растворе TBS-T 5 раз по 5 минут и инкубировалась в течение 1 часа при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Sigma-Aldrich, США), разведенными 1:20 000 в 3% сухом молоке/TBS-T. Далее мембрана отмывалась в растворе TBS-T 5 раз по 5 минут и обрабатывалась усилителями хемилюминисценции ECL+ (Amersham

Biosciences, Англия) согласно протоколу производителя. Люминисцентное излучение было детектировано на рентгеновской плёнке Kodak-BioMAX.

2.7 Магнитно-резонансная томография

Для магнитно-резонансной томографии использовалось по 8 мышей WT и 8 мышей KO. Для исследования морфологических различий в размерах мозга у животных *in vivo* использовался горизонтальный томограф с напряженностью магнитного поля 11.7 Тесла (Bruker, BioSpec 117/16 USR, Германия) согласно протоколу (Tikhonova et al., 2013).

Для получения T2-взвешенных изображений головного мозга мыши в аксиальной проекции был использован метод спинового эха многосрезового сканирования MSME (Multi Slice Multi spin Echo) с параметрами TR = 5500 мсек, TE = 33 мсек. Чтобы охватить весь мозг, было сделано 55 срезов толщиной 0.2 мм и межсрезовой толщиной 0.2 мм, полем обзора 2 см x 2 см² и размером матрицы 256 x 256 точек, продолжительность сканирования 5 мин 54 сек. Для получения T2-взвешенных изображений головного мозга мыши в коронарной и аксиальной проекциях был использован метод RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement). Исследуемые структуры мозга были определены и выделены с помощью программного обеспечения “Интересующий Регион” (ROI) и атласа мышинового мозга.

Высокое разрешение магнитно-резонансного изображения четко показывает не только большие структуры мозга, но также позволяет визуализировать маленькие структуры. Разделение мозга на структуры проводилось вручную экспериментатором, который был не знаком с протоколом исследования.

Были исследованы структуры, связанные с поведенческой активностью, обучением и памятью: гиппокамп (сумма левой и правой части, 15 аксиальных срезов), стриатум (сумма правой и левой части, 14 коронарных срезов), латеральные желудочки (сумма боковых желудочков, 18 коронарных срезов) и объем коры (28 коронарных срезов). Объёмы представлены в мкл. Площадь

мозга на исследуемом срезе рассчитывалась как количество пикселей, помноженных на размер одного пикселя в мм². Общий объём мозга был посчитан как сумма площадей мозга на срезах, помноженная на 0.2 мм.

2.8 Исследование поведения животных в стандартных тестах

Для тестирования поведения использовался программно-аппаратный комплекс EthoStudio, созданный в ФГБУН «Институт автоматизации и электротехники СО РАН». Этот комплекс включал стенд для установки арен, освещение и цифровую видеокамеру Panasonic, расположенную в 80 см над ареной и присоединенную к компьютеру через интерфейс IEEE1394. В тестах «открытое поле», «новый объект», «принудительное плавание», «свет-темнота», «водный лабиринт Морриса» использовали обращенное освещение, когда источник света помещался под ареной. В проходящем свете животное любого окраса выглядело как темный силуэт, контрастирующий с фоном (Kulikov et al., 2008). В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» использовали измерение в отраженном свете, когда лабиринт освещали сверху рассеянным светом. Это позволяло автоматически трассировать животное черной масти в открытых рукавах и центре лабиринта. Изображения животного с частотой 10 кадров/сек обрабатывались программой EthoStudio, автоматически вычислялся путь, пройденный животным и создавалась карта пространственного распределения ассоциированных с животным пикселей. Вертикальные стойки, груминг, число болюсов, контакты с объектом и т.д. регистрировались наблюдателем (Kulikov et al., 2008). Продолжительность тестов «открытое поле», «новый объект», «приподнятый крестообразный лабиринт», «свет/темнота» и «водный лабиринт Морриса» составляла 5 минут, а теста «принудительное плавание» 6 минут. После тестирования каждого животного поверхность арены протирали влажной и сухой салфетками.

Все поведенческие эксперименты проводились между 10.00 и 13.00 часами. Исследовательские группы животных были зашифрованы. Поведенческие тесты проводили с интервалом в один день.

Тест «открытое поле»

Тест «открытое поле» используется для оценки тревожности (время, проведенное в центре поля, %), эмоционального поведения (груминг, число фекальных болюсов, оставленных животным на арене), двигательной (пройденный путь, см) и исследовательской (количество вертикальных стоек) активностей у грызунов. Тест проводили на аппарате с круглой ареной (диаметром 40 см) из полупрозрачного белого матового пластика с пластиковыми стенками высотой 25 см (Kulikov et al., 2008). Арена была ярко подсвечена с помощью двух галогеновых ламп (25 Вт каждая), которые располагались под ареной на расстоянии 40 см. Свет проходил через полупрозрачный белый матовый пластик (инвертированная подсветка). Животное помещали на арену рядом со стенкой, его движения регистрировали в течение 5 минут с помощью цифровой видеокамеры (Panasonic), расположенной на 80 см выше арены и подсоединенной к компьютеру через интерфейс IEEE1394. С помощью программно-аппаратного комплекса EthoStudio определяли пройденный путь (см) и время, проведенное в центральной части поля (%) (круг диаметром 20 см). Количество вертикальных стоек фиксировалось экспериментатором (Kulikov et al., 2008).

Тест «новый объект»

Тест «новый объект» используется у грызунов для оценки эмоционального поведения, двигательной и исследовательской активностей. Исследовательский ответ животного состоит в осмотре, обнюхивании, подъемах на задние лапы, прыжках, рытье, заглядывании вниз, перемещении доступных объектов. Тревожный ответ — в замирании, поиске убежища, обильной дефекации и уринации (Kulikov et al., 2008). За день до тестирования животное помещали в чистую арену (D = 40 см, бортики высотой 25 см) на 5 мин для привыкания. В день тестирования в центр арены помещали

пластиковый цилиндр (3 x 4.5см). Животное помещали на арену и в течение 5 мин фиксировали время, на протяжении которого мышь исследовала объекты (Desruisseaux et al., 2008). Учитывали пройденный путь (см), количество вертикальных стоек, латентное время до первого контакта с новым объектом (сек), количество и продолжительность контактов с новым объектом (сек), количество болюсов, количество и продолжительность грумингов (сек).

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» используют для исследования реакции животного на стимулы, вызывающие тревогу и страх (Pellow et al., 1985). В этом тесте экспериментатор регистрировал время, проведенное в открытых рукавах. Данный показатель негативно коррелирует с тревожностью, ведь зачастую у животных наблюдается конфликт между желанием остаться в безопасном месте или исследовать новое, но потенциально опасное пространство (ярко освещенное или открытое). Тест «приподнятый крестообразный лабиринт» проводили в аппарате, состоящем из двух открытых (потенциально опасных) и двух закрытых (безопасных) рукавов, размерами 37 x 6 см и приподнятых на высоту 60 см над уровнем пола, арена была тускло освещена с помощью рассеивающего света от галогеновых ламп (25 Вт). Закрытые рукава были защищены бортиками высотой 20 см. Животное помещали в центр головой к одному из закрытых рукавов и его движения в открытых рукавах и центре автоматически трассировали в течение 5 мин. Автоматически определяли число переходов через центр, латентное время захода в открытые рукава (сек), число заходов в открытые рукава, время (%) проведенное в открытых рукавах и центре (Alexander V. Kulikov, 2014).

Тест «принудительное плавание»

Тест «принудительное плавание» моделирует безвыходное положение для животного и является классическим для определения депрессивноподобного поведения (Porsolt et al., 1977). В этом тесте оценивается время, когда животное от активных попыток освободиться из

неприятного положения (погружение в воду), переходит к неподвижности, зависанию, которое исследователи ассоциируют с потерей животным надежды и поведением отчаяния. В ходе эксперимента мышь помещали в цилиндрический стеклянный резервуар (15 x 25 см), заполненный на 3/4 водой ($t=25^{\circ}\text{C}$) и подсвечиваемый через полупрозрачный пол. Мышь опускали в воду, в которой она находилась в течение 6 минут. Первые 2 минуты нахождения животного в воде считались адаптационными. Движения автоматически трассировали в течение 6 мин. Поведение животного начинали регистрировать с третьей минуты и оценивали латентное время первого замирания (сек), а также суммарное время неподвижности (сек) за последние 4 мин (Kulikov et al., 2010). Вода в сосудах менялась после тестирования каждого животного.

Тест «свет/темнота»

Данный тест широко используется для оценки тревожности грызунов. Установка для теста «свет-темнота» состояла из светлого и темного отсеков одинакового размера (20 x 20 x 25 см), соединенных перегородкой с отверстием (7 x 7 см). Светлый отсек был выполнен из белой пластмассы и освещен с помощью 25-W галогеновой лампы, а темный отсек был выполнен из черного пластика и покрыт черной крышкой. Мышь помещалась в темный или светлый отсек головой к отверстию на 5 минут. В ходе эксперимента определяли время нахождения мыши в светлом или темном отсеке (сек), латентное время перед первым входом в другую камеру (сек), число заходов и количество заглядываний в другую камеру.

Измерение реакции рефлекторного вздрагивания и ее престаимпульного торможения

Реакцию вздрагивания измеряли с использованием прибора SR-Pilot (San-Diego Instruments, USA), состоящего из пластиковой камеры (15 x 19 x 25 см), пол которой располагается на пьезодатчиках (Porova et al., 2009). Мышь помещали в камеру и давали 3 мин для адаптации. Для оценки престаимпульного торможения (PPI) каждые 15 сек подавали звуковой сигнал, чередуя 4

одиноким сигналом (P) (115 дБ, 40 мс, с интервалом около 15) с 4 комбинированными «предупреждающий сигнал + стандартный сигнал» (PP) (предупреждающий за 100 мс прерывистым сигналом силой 85 дБ, 40 мс и основным -115 дБ, 40 мс). Величина прерывистого торможения определялась по формуле: $PPI = (AP - APP) \times 100\% / AP$ (AP и APP – амплитуды для P и PP).

Тест «водный лабиринт Морриса»

Тест «Водный лабиринт Морриса» позволяет оценить когнитивные способности и основан на поиске кратчайшей дистанции до спрятанной под водой платформы на основании предыдущей памяти о ее местонахождении (D'Hooge and De Deyn, 2001). В данном эксперименте применяли регистрацию в проходящем свете (Куликов и др., 2007; Kulikov et al., 2008b; 2010a). Установка для тестирования животных в водном лабиринте Морриса в проходящем свете состояла из квадратного пластикового бака 70 x 70 x 25 см, в который вставлялся пластиковый цилиндрический вкладыш диаметром 70 см и высотой 25 см. Под баком располагались 4 галогеновые лампы по 12 Вт каждая. Бак заполнялся до 15 см водой, подкрашенной сухим молоком, температурой 25°C. Поверхность бака была виртуально разделена на 4 равных сектора (четверти). Стеклоплатформа, (диаметр 5 см, высота 14.5 см), скрытая под поверхностью воды и невидимая для животного, помещалась в центре одной из четвертей бака. Передвижение животных отслеживалось автоматически. В ходе обучения животное в течение 4 последовательных дней обучали находить скрытую под водой платформу. Для этого животное помещали в воду в фиксированной точке и давали ему возможность искать платформу в течение не более 60 сек. Момент нахождения платформы определяли, когда животное полностью выбиралось на нее (четырьмя лапами). Независимо от успеха, животное помещалось на платформу на 15 сек для осуществления положительного подкрепления и обозначения местоположения платформы. Каждый из тренировочных дней включал три последовательных попытки с интервалом 60 сек. В течение обучения фиксировались латентное время (сек), в течение которого животное находило

платформу и выбралось на нее; пройденный путь (см), который животное прошло, прежде чем найти платформу и выбраться на нее. По каждому тренировочному дню считались средние показатели из всех тестовых процедур.

2.10 Индукция острого воспалительного процесса с использованием декстран сульфата натрия

В эксперименте использовались 6 мышей КО и 6 мышей WT в возрасте 2 месяца и примерно одного веса. Животные пили питьевую воду, содержащую 2% декстран сульфата натрия (молекулярный вес 40000 г/моль, AppliChem, Германия) в течение 7 дней, после чего переводили на обычную питьевую воду. Восстановительный период продолжался до 30 дня. Контрольную группу животных поили питьевой водой без добавления декстран сульфата натрия (ДСН). На протяжении 7 дней проводил ежедневную оценку состояния мышей (массы, консистенции стула и наличия крови в стуле). Изменения веса рассчитывались в процентном соотношении с весом до воздействия ДСН. Индекс активности колита (ИАК) рассчитывался как суммы трёх проявлений воспаления на протяжении 7 дней согласно таблице (Табл. 3).

Таблица 3. Индекс активности колита (ИАК).

	Потеря веса %	Консистенция стула	Кровотечение
0	отсутствует	нормальная	отсутствует
1	1-5		
2	5-10	жидкая	скрытое кровотечение
3	10-20		
4	>20	диарея	Видимые признаки кровотечения

На 7 и 30 день мыши подвергались эвтаназии путём транслокации шейных позвонков. Проксимальный участок прямой кишки использовался для гистологического исследования, а для оценки уровней экспрессии генов

методом ПЦР в реальном времени использовали дистальный участок. Сравнительный анализ индекса гистологической активности (ИГА) рассчитывался как сумма четырёх проявлений воспаления (максимальная оценка 12) на протяжении 7 дней согласно таблице (Табл. 4).

Таблица 4. Индекс гистологической активности (ИГА).

Оцениваемые изменения	Градация	Описание
Распределение поражений	0	Нет
	1	Локальное
	2	Многоочаговое
	3	Диффузное
	4	Диффундирующее
Степень воспаления	0	Нет
	1	Лёгкое
	2	Умеренное
	3	Тяжёлое
	4	Воспалительные клетки в просвете кишечника
Глубина воспаления	0	Нет
	1	Только слизистая
	2	Слизистая и подслизистая оболочка
	3	Ограниченное трансмуральное
	4	Трансмуральное

2.11 Определение уровня экспрессии генов

Выделение тотальной РНК

Участки дистального отдела толстого кишечника мышей, полученные на 7 день и на 30 день после начала эксперимента с декстран сульфатом натрия замораживались в реагенте TRIZOL (Invitrogen, США) из расчёта 1 мл реагента на 100 мг ткани. Далее пробы измельчали на гомогенизаторе при помощи металлических шариков, после чего центрифугировали на охлаждающей центрифуге при 12000 g в течение 10 минут при температуре 4°C, затем отбирали свободную от дебриса фазу. инкубировали 5 минут при комнатной температуре и добавляли 0.2 мл хлороформа на 1 мл TRIZOL.

Тщательно перемешивали и дополнительно инкубировали при комнатной температуре в течение 3-х минут. Затем образцы центрифугировали в охлаждающей центрифуге при 12000 g в течение 15 минут при температуре +4°C. Водную фазу переносили в новую пробирку, туда же добавляли изопропиловый спирт из расчёта 0.5 мл на 1 мл TRIZOL, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После этого раствор центрифугировали в охлаждающей центрифуге при 12000 g в течение 10 минут при температуре +4°C. Осадок промывали 75% этанолом, высушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в деионизированной воде, предварительно обработанной диэтилпирокрбонатом (H_2O_{DEPC}) (Sigma-Aldrich, США). Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop2000 (ThermoScientific, США).

Для разрушения геномной ДНК проводили ДНКазную обработку. В образец добавляли 10xбуфер с $MgCl_2$, 1 ед. ДНКазы I (Fermentas, США). Инкубировали 1 час при температуре 37°C. Затем инактивировали фермент, инкубируя 10 минут при температуре 65°C.

Реакция обратной транскрипции

Для синтеза кДНК использовали набор RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, США). Условия реакции: 2 мкг РНК, 0.2 мкг случайных гексануклеотидов; доводили объём смеси деионизированной водой до 12.5 мкл и инкубировали в течение 5 минут при 70°C. Затем охлаждали образцы во льду. Далее добавляли 4 мкл 5x реакционного буфера для ревертазы, смесь 4-х дНТФ до концентрации 1 мМ и 20 единиц ингибитора рибонуклеаз; доводили объём деионизированной водой до 19-ти мкл и инкубировали в течение 5 минут при 25°C. После этого добавляли 200ед. обратной транскриптазы RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, США). Реакционную смесь инкубировали при 25°C в течение 10 минут, затем при 42°C в течение 60 минут, после чего останавливали реакцию нагреванием до 70°C в течение 10 минут и охлаждали во льду. Полученную

кДНК использовали как матрицу для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

ПЦР в реальном времени

Специфическую амплификацию фрагментов ДНК производили методом ПЦР в реальном времени. С помощью программ Primer3 и Oligo38 были определены праймеры и TaqMan зонды для выбранных генов таким образом, чтобы ПЦР-продукт получался из 2-х соседних экзонов, что исключало бы вероятное участие геномной ДНК в реакции.

Таблица. 5. Последовательности праймеров и зондов, выбранных для анализа экспрессии.

Ген	Праймеры, 5'-3'	Проба FAM 5'-3'
<i>GAPDH</i>	CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA ATGCCTGCTTCACCACCTTCT	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATGATG
<i>TGF-β1</i>	TGACGTCACTGGAGTTGTAC AAGAGCAGTGAGCGCTGAAT	TGGCTGAACCAAGGAGACGGAATAC
<i>IL-1α</i>	TCACTGAAGATGACCTGCAGT TGGTAGGTGTAAGGTGCTGA	ACCCATGATCTGGAAGAGACCATCCA
<i>IL-1β</i>	AAGGAGAACCAAGCAACGACAA AACTCTGCAGACTCAAACCTCCA	TTGCTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>IL-6</i>	TAGTCAATTCCAGAAACCGCTAT CTGGATGGAAGTCTCCTGCG	CTCTCTGCAAAGGCGCCCAACTG
<i>IL-10</i>	ATCAAGGAGCATTTGAATCCCT TGCTCCACTGCCTTGCTCTTA	CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTC
<i>IL-17A</i>	TCAGACTACCTCAACCGTTCC ACTGAGCTTCCCAGATCACAG	CTGGACTCTCCACCGCAATGAAGA
<i>TNFα</i>	CTCCCTCTCATCAGTTCTATG CGACGTGGGCTACAGGCT	ACCCTCACACTCAGATCATCTTCTC
<i>Kaiso</i>	TACTCAACTTCCCACTCCTG GTTAGGAGTCAGATGTGTTGA	ACTCTAAGCCAAACACAAGGAAGTGA

Полученные праймеры были проверены на специфичность в программе BLAST. При оптимизации ПЦР подбирали концентрации компонентов реакционной смеси и температурный режим амплификации, обеспечивающие максимальную чувствительность и специфичность обнаружения ДНК. Для постановки ПЦР в реальном времени в качестве референсного гена использовался *GAPDH*, а также праймеры и зонды (Табл. 5).

2.12 Выявление апоптоза с использованием метода TUNEL

Анализ TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) проводили на парафиновых срезах согласно общепринятой методике (Abcam, Англия, TUNEL Assay Kit). Принцип метода основан на выявлении 3'-ОН концов в молекуле ядерной ДНК, образующихся при её фрагментации в клетках, находящихся на стадии апоптоза.

После депарафинизации срезов толстой кишки, их инкубировали в 0.85% NaCl 5 мин при комнатной температуре; промывали 5 мин в PBS; проводили инкубацию 5 мин с раствором 20 мкг/мл Proteinase K (2 мкл Prot K 10 мг/мл + 998 мкл 100 mM TrisHCl pH = 8.0 + 50 mM EDTA); промывали 5 мин в PBS; инкубировали 5 мин в Wash Buffer; промывали 5 мин в PBS; покрывали срезы раствором для мечения ДНК с TdT и Br-dUTP и инкубировали на 37°C в течение 1 часа. Затем срезы промывали 5 мин в PBS; инкубировали с вторичными антителами BrdU 30 мин при комнатной температуре; добавляли буфер 7-AAD/RNase A Staining Buffer; промывали 5 мин в PBS и заключали в мовиол. Дополнительно проводили окрашивание ядер клеток красителем DAPI. Анализировали препараты с помощью флуоресцентного микроскопа DP71 (Olimpus, Япония). Уровень апоптоза определялся путем обсчета апоптотирующих клеток в эпителии и в собственной пластинке на 8 отдельных продольных срезах толстой кишки КО и WT. Обсчёт проводился двумя независимыми исследователями.

2.13 Статистическая обработка

Полученные в работе значения представлены +/-SEM и проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA (GraphPad) и ANCOVA с последующим сравнением по Фишеру. Время и путь в секторах водного лабиринта Морриса выражали в процентах и сравнивали со случайным посещением (25%) с помощью одностороннего критерия Стьюдента ($\alpha = 0.1$) с последующей коррекцией

уровня значимости по методу Бонферрони. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Глава 3: РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Исследование локализации белка Каизо в органах мыши

3.1.1 Анализ локализации белка Каизо в эпителиальных тканях

В настоящее время много работ посвящается исследованию роли белка Каизо в воспалении и опухолеобразовании кишечника мыши. В одной из статей авторы утверждают, что Каизо локализуется в цитоплазме клеток кишечника (Chaudhary et al., 2013). Данные результаты вызывали сомнения, так как окрашивание проводили с использованием DAB, более того, отсутствовал отрицательный контроль. В связи с этим, было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание толстой и тонкой кишки линий мышей дикого типа (WT) и нокаутных по гену *Каизо* (KO) с использованием специфичных поликлональных антител на Каизо (Daniel et al., 2001).

Было показано, что 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 линии. 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. В тонкой и толстой кишке мышей KO белок Каизо отсутствует, что позволяет исключить принятие фонового свечения за истинный сигнал (Рис. 8А, Б). После окрашивания срезов гематоксилином и эозином морфологических нарушений в кишечнике у мышей KO выявлено не было. Результаты иммунофлуоресцентного анализа были подтверждены белковым иммуноблоттом с экстрактами из тонкой и толстой кишки WT и KO мышей, окраской антителами на Каизо, а также окраской контрольными антителами на β -актин (Рис. 8В). Для достоверности результата использовались два повтора с разным количеством лизата (20 и 10 мкл).

Таким образом, полученные наблюдения ядерной локализации Каизо в толстой и тонкой кишке расходятся с опубликованными данными о цитоплазматической локализации Каизо в ворсинках и криптах кишечника мыши (Chaudhary et al., 2013).

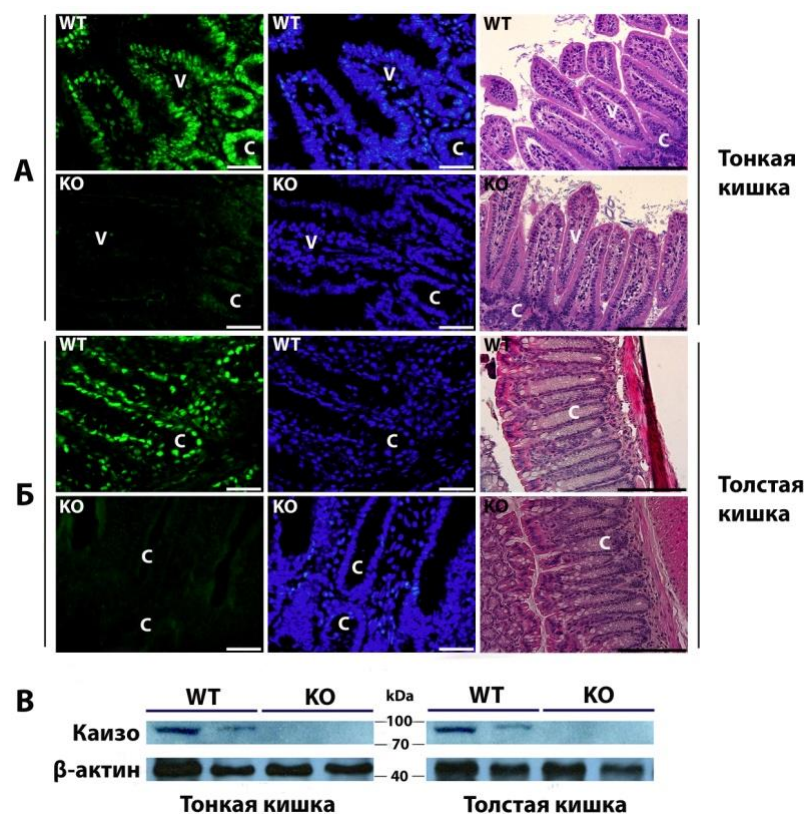


Рис. 8. Локализация Каизо в тонком (А) и толстом (Б) кишечнике мыши. Каизо (зелёный), DAPI (синий), правая панель окрашивание отдельных срезов гематоксилином/эозином. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. С: крипты; V: ворсинки. Криосрезы. Шкала 50 мкм. (В) Иммуноблоттинг ядерных экстрактов из толстого и тонкого кишечника WT и КО. Контрольные антитела — β -актин. Полосы демонстрируют разные количества лизата в каждой лунке (20 и 10 мкл).

Так как Каизо локализуется в ядрах эпителиальных клеток кишечника, решено было исследовать экспрессию Каизо в других эпителиальных тканях.

В результате иммуногистохимического анализа было показано, что Каизо локализуется в клетках эпидермиса (внешнего эпителия), дермы (слоя соединительной ткани) и волосяного фолликула (Рис. 9А, Б). Снимки высокого разрешения демонстрируют, что Каизо локализуется в ядрах

кератиноцитов, фибробластов и меланоцитов базального и супрабазального слоя эпидермиса (Рис. 9Б). Интересно, что Каизо локализуется в ядрах клеток дермальной папиллы, в клетках 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 (Trempe et al., 2007) (Рис. 9А).

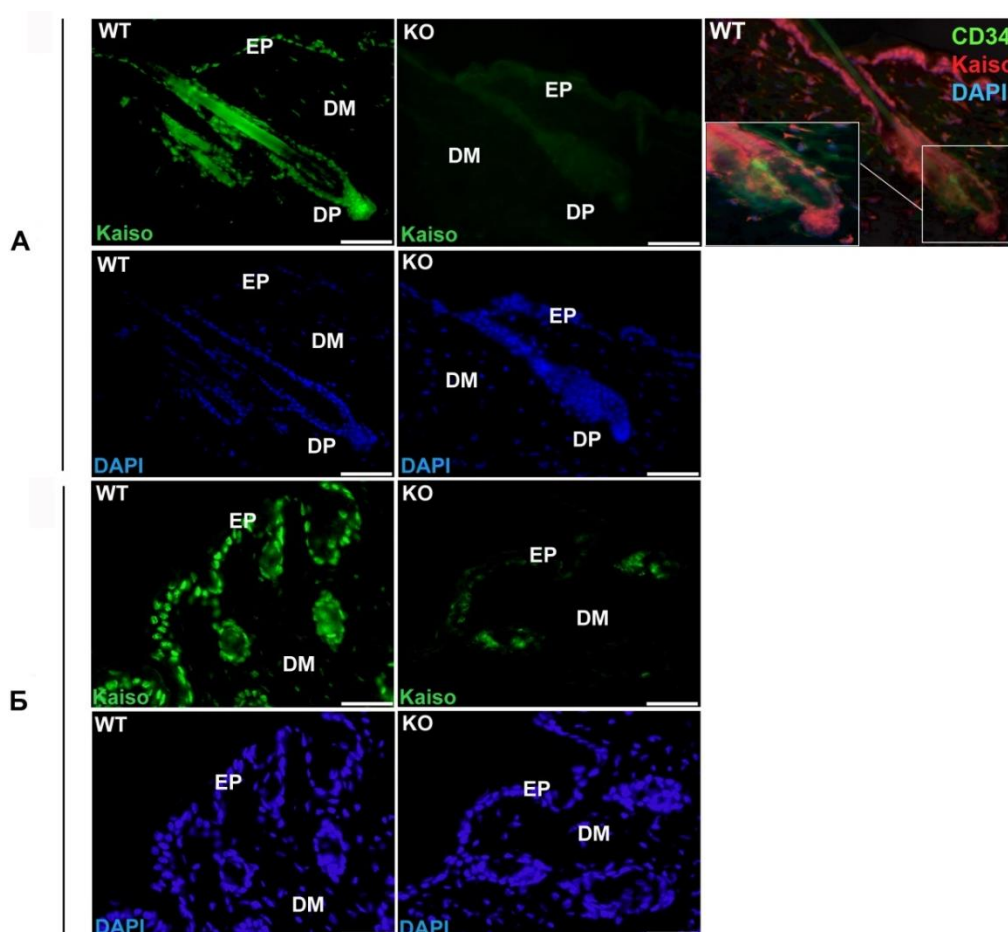


Рис. 9. Локализация Каизо в коже мыши. (А) Локализация Каизо (зелёный) и CD34 (красный) в клетках дермальной папиллы и волосяной луковицы WT мышей. Шкала 50 мкм. (Б) Локализация Каизо (зелёный) в базальном и супрабазальном слое эпидермиса WT мышей. DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. EP: эпидермис; DP: дермальная папилла; DM: дермальный матрикс. Криосрезы. Шкала 100 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. 10).

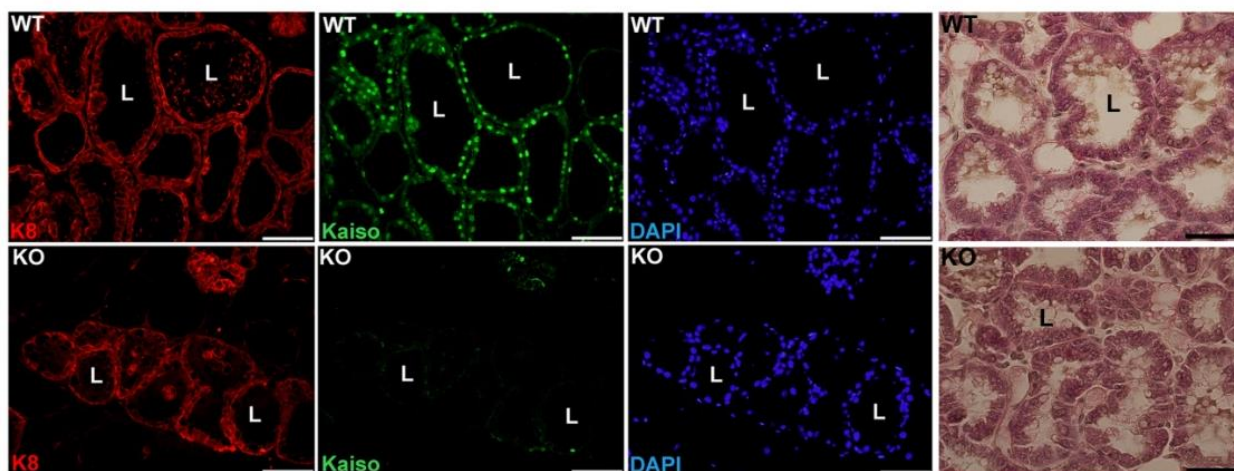


Рис. 10. Локализация Каизо в эпителии протоков молочной железы. К8 (красный), Каизо (зелёный), DAPI (синий). Правая панель: окрашивание отдельных срезов гематоксилином/эозином. L: просвет (люмен). Последовательные парафиновые срезы. Шкала 100мкм.

Иммунофлуоресцентный анализ других органов показал, что Каизо локализуется в ядре клеток многослойного неороговевающего плоского эпителия пищевода, многорядного призматического респираторного эпителия трахеи, в клетках переходного эпителия мочевого пузыря, железистом кубическом эпителии слёзных и слюнных желез, в обонятельном эпителии и в плоских эпителиальных клетках языка (Рис. 11).

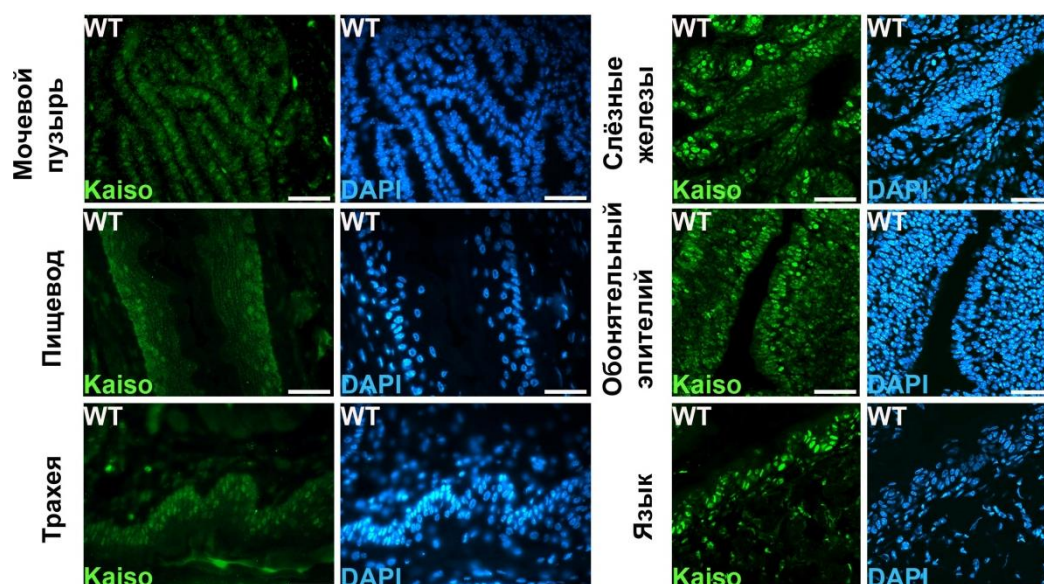


Рис. 11. Локализация Каизо в ядре эпителиальных клеток мочевого пузыря, пищевода, трахеи, слёзных желез, обонятельного эпителия и языка у мышей WT. Каизо (зелёный), DAPI (синий). Парафиновые срезы. Шкала 50мкм.

3.1.2 Анализ локализации белка Каизо в тканях глаза

Иммуногистохимический анализ показал, что в роговице глаза белок Каизо локализуется в ядре клеток многослойного плоского эпителия, а также в стромальных и эндотелиальных клетках (Рис. 12А).

Сетчатка глаза мыши состоит из пигментного эпителия, фоторецепторного слоя клеток (содержащего в основном палочки), наружного ядерного слоя (содержащего ядра фоторецепторных клеток), внешнего плексиформного слоя (сплетения нервных волокон со множеством синаптических контактов), внутреннего ядерного слоя (содержащего биполярные нейроны), внутреннего плексиформного слоя и слоя ганглиозных клеток. В сетчатке Каизо локализуется в цитоплазме внутренних сегментов фоторецепторных клеток и отсутствует в наружном ядерном слое, внутреннем ядерном слое и в слое ганглиозных клеток (Рис. 12Б). Специфичность цитоплазматического окрашивания была подтверждена контрольными окрашиваниями срезов глаз КО мышей (Рис. 12А, Б).

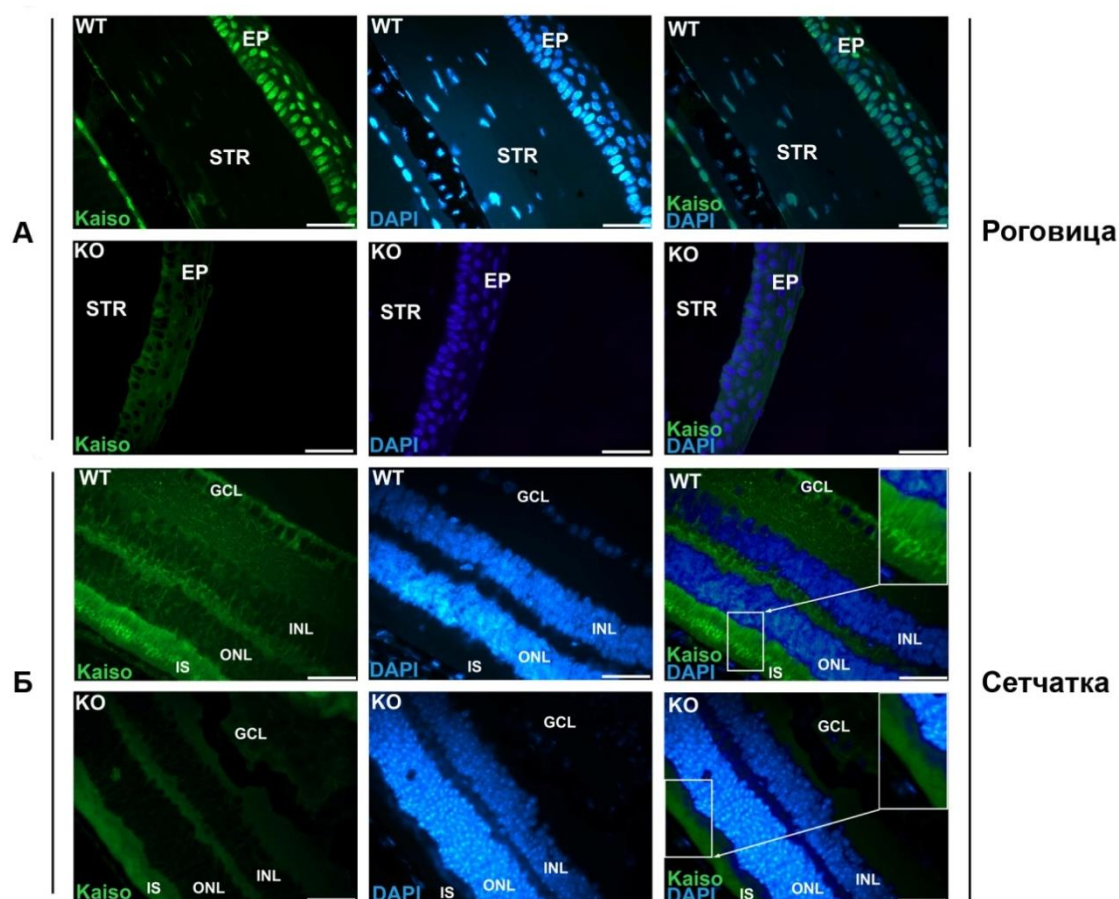


Рис. 12. Локализация Каизо в роговице (А) и сетчатке (Б) глаза. Первая колонка: Каизо (зелёный); вторая: DAPI (синий); третья: наложение. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. EP: эпителий роговицы; STR: строма; GCL: слой ганглиозных клеток; INL: внутренний ядерный слой (ядра биполярных клеток); ONL: наружном ядерном слое (ядра фоторецепторных клеток); IS: внутренние (цитоплазматические) сегменты фоторецепторных клеток. Парафиновые срезы. Шкала 50мкм.

3.1.3 Анализ локализации белка Каизо в органах кроветворения и иммуногенеза

В тимусе Каизо локализуется в клетках коркового и мозгового слоя (Рис. 13А), а в селезёнке в ядре клеток белой и красной пульпы (Рис. 13Б).

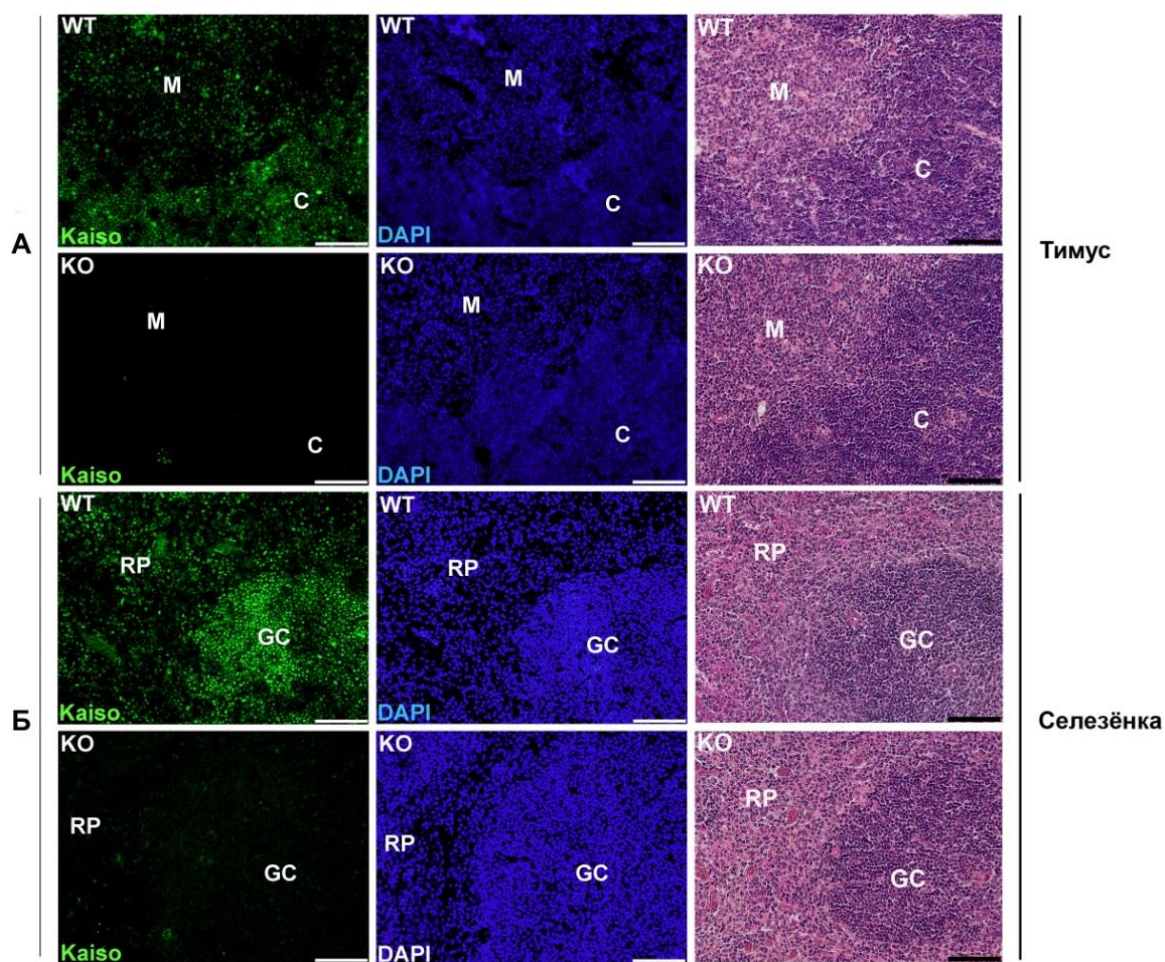


Рис. 13. Локализация Каизо в тимусе (А) и селезёнке (Б). Каизо (зелёный), DAPI (синий). Правая панель окрашивание гематоксилином/эозином. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. М: мозговой слой; С: корковый слой; RP: красная пульпа; GC: герминальный центр белой пульпы. Парафиновые срезы. Шкала 100 мкм.

3.1.4 Анализ локализации белка Каизо в репродуктивных органах самцов

Сперматогониальные стволовые клетки (ССК), так же, как и стволовые клетки кожи, являются постоянно самообновляющимися стволовыми клетками взрослого организма, ведь образование мужских половых клеток (сперматогенез) происходит непрерывно на протяжении всей жизни. У взрослых мышей недифференцированные ССК располагаются в семенных канальцах и подразделяются на несколько морфологических типов, которые последовательно сменяют друг друга: недифференцированный тип сперматогоний As (одиночные), Arg (парные), и Aal (линейные, 4–16 или 32 клеточных синцитиальных кластеров) и дифференцированный тип

сперматогоний A1, A2, A3, A4, In (промежуточный тип) и B (Рис. 14). В ряду митозов деление сперматогониев типа B — последнее, они образуют сперматоциты I порядка, которые вступают в сложную профазу I мейоза (de Rooij, 2001). После двух мейотических делений каждый сперматоцит I порядка, дает начало четырем гаплоидным сперматидам. Дозревание спермиев происходит в эпидидимисе (придатке семенника) (Wolgemuth et al., 2002).

Клетки Сертоли являются единственным типом соматических клеток, присутствующих в семенных канальцах млекопитающих. Они участвуют в формировании микроокружения (ниш) для ССК, гемато-тестикулярного барьера, паракринной регуляции сперматогенеза, фагоцитозе дегенерирующих половых клеток, в выполнении опорных и трофических функций (Huleihel and Lunenfeld, 2004).

Сперматогенез

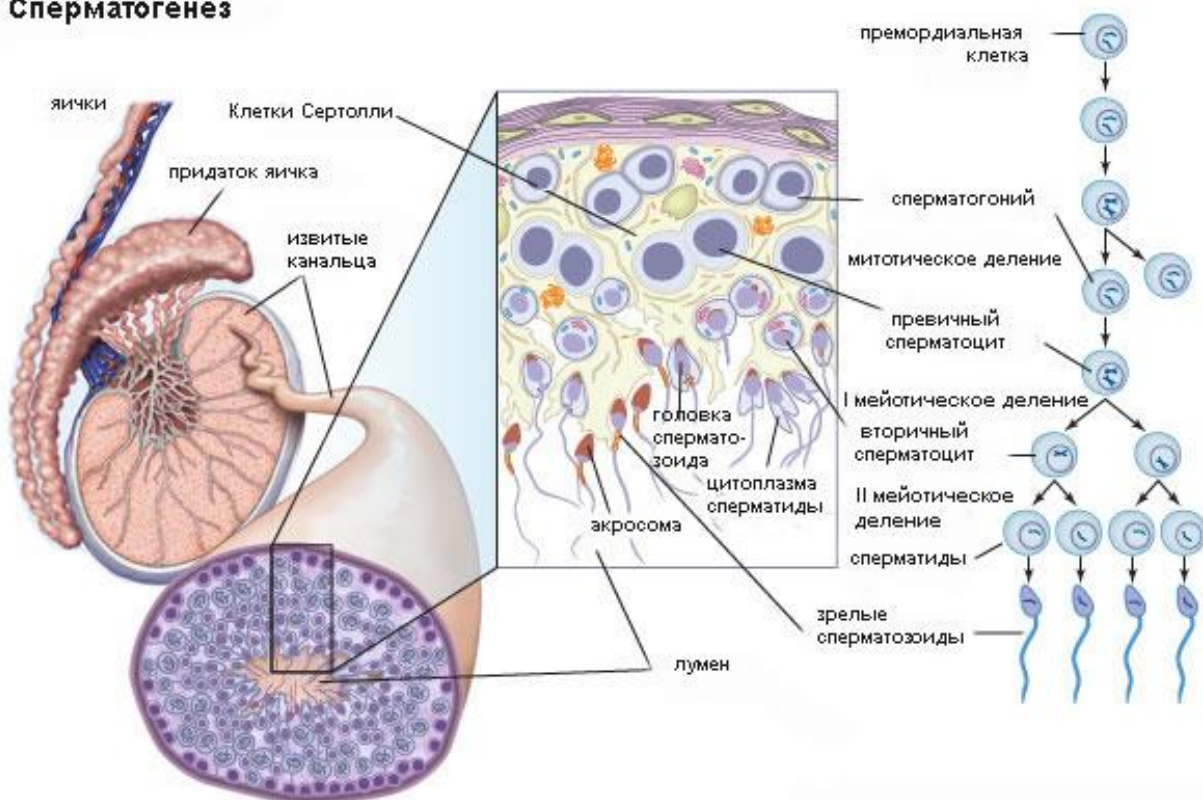


Рис. 14. Стоение семенников мыши и процесс сперматогенеза.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии Каизо в семенниках взрослых мышей показал, что белок Каизо локализуется в отдельных

клеточных популяциях, расположенных на базальной мембране семенных канальцев (Рис. 15А). В эпидидимисе Каизо локализуется в ядрах эпителиальных клеток (Рис. 15Б).

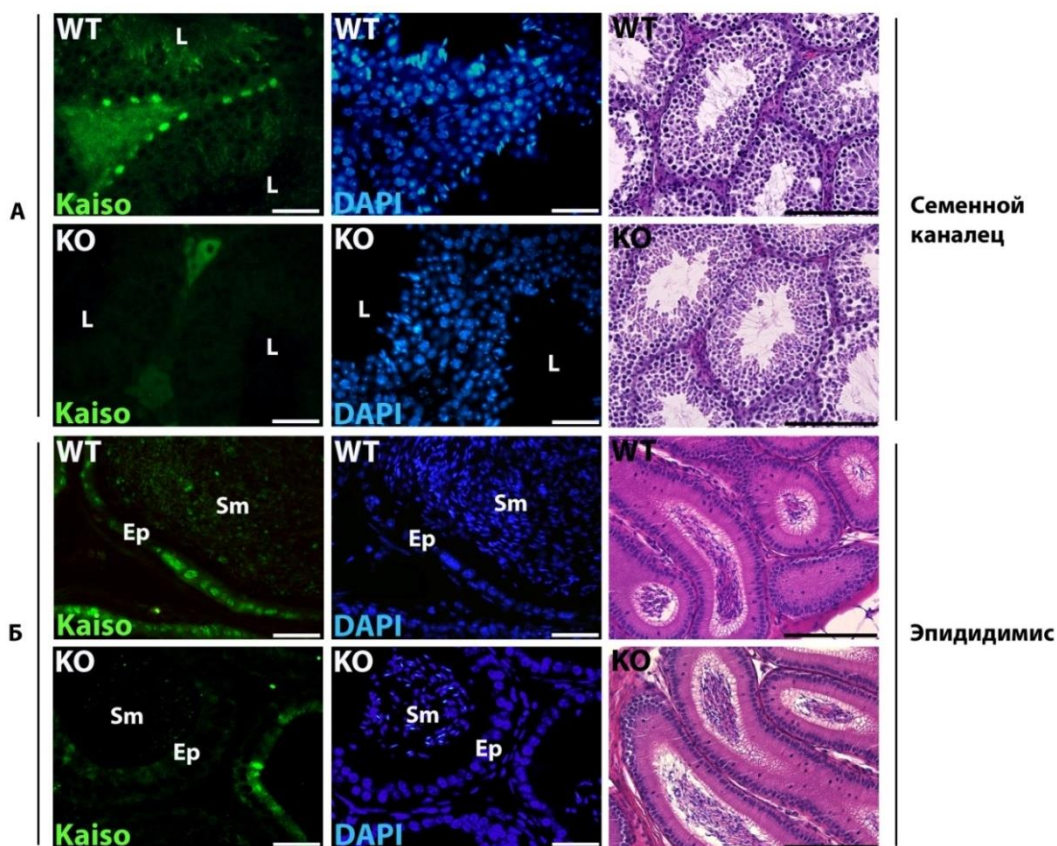


Рис. 15. Локализация Каизо в семенном канальце (А) и в эпидидимисе (Б). Каизо (зелёный), DAPI (синий). Правая панель окрашивание гематоксилином/эозином. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. L: просвет канальца (люмен); Sp: спермии; Ep: эпителий. Поперечные парафиновые срезы. Шкала 50мкм, 100 мкм.

Поскольку локализация на базальной мембране характерна для ССК и клеток Сертоли, было проведено совместное иммуногистохимическое окрашивание Каизо с различными маркерами клеток семенника: PLZF и BMI-1 (маркерами недифференцированных ССК), PCNA (маркером пролиферирующих сперматогониев) и GATA4 (маркером клеток Сертоли и Лейдига) (Buaas et al., 2004; Chapman and Wolgemuth, 1994; Huleihel and Lunenfeld, 2004; Komai et al., 2014). Для более точного анализа колокализации Каизо с маркерами клеток, проводились дополнительные окрашивания на изолированных семенных канальцах.

Иммунофлуоресцентный анализ окрашивания тотальных препаратов семенных канальцев показал, что клетки, экспрессирующие Каизо, формируют небольшие клеточные кластеры, которые являются характерными для ССК. При совместном окрашивании на Каизо и на маркёры ССК было показано, что экспрессия Каизо частично совпадает с маркёром PLZF (As, Arg и Aal) (Рис. 16) и не совпадает с BMI-1 (маркёром преимущественно As) (Komai et al., 2014) (Рис. 17). Таким образом, по полученным данным можно заключить, что Каизо экспрессируется в ССК типа Arg(парные) и Aal(линейные), так как его колокализация с BMI-1, который преимущественно экспрессируется в As(одиночные) (Komai et al., 2014), не наблюдается.

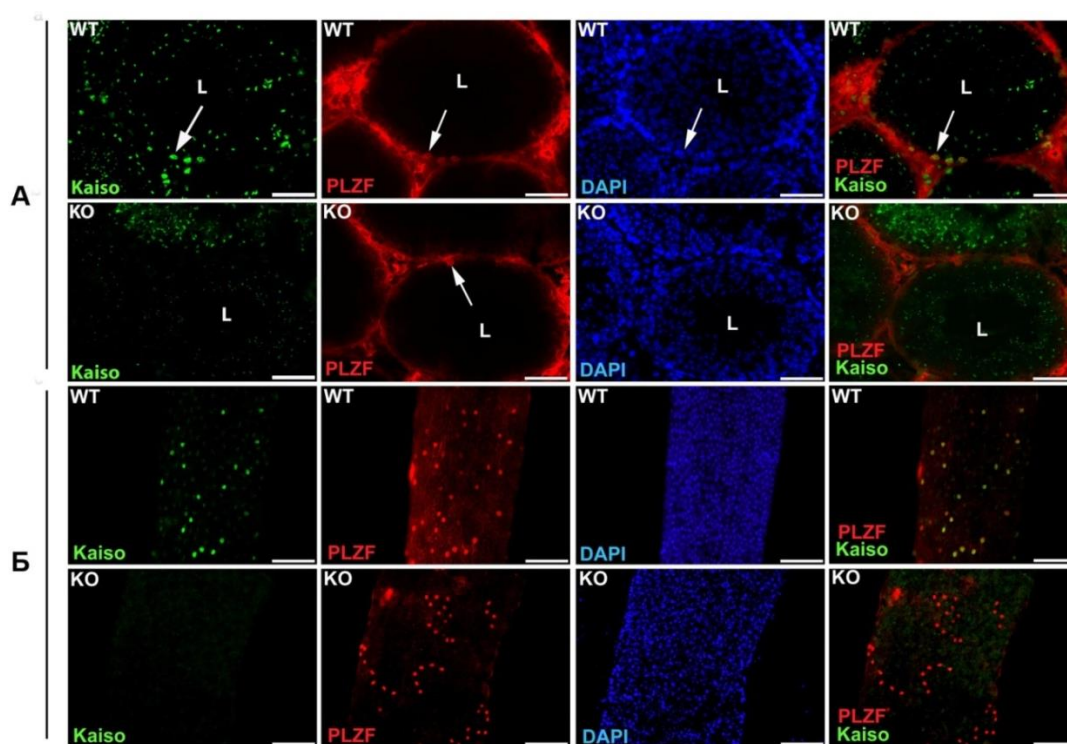


Рис. 16. Локализация Каизо и PLZF в мышиных семенниках. (А) Поперечные криосрезы семенных канальцев. (Б) Тотальные препараты изолированных семенных канальцев, продольный вид. Первая колонка: Каизо (зелёный); вторая: PLZF (красный); третья: DAPI (синий); четвёртая: наложение. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. L: просвет канальца (люмен). Шкала 100мкм.

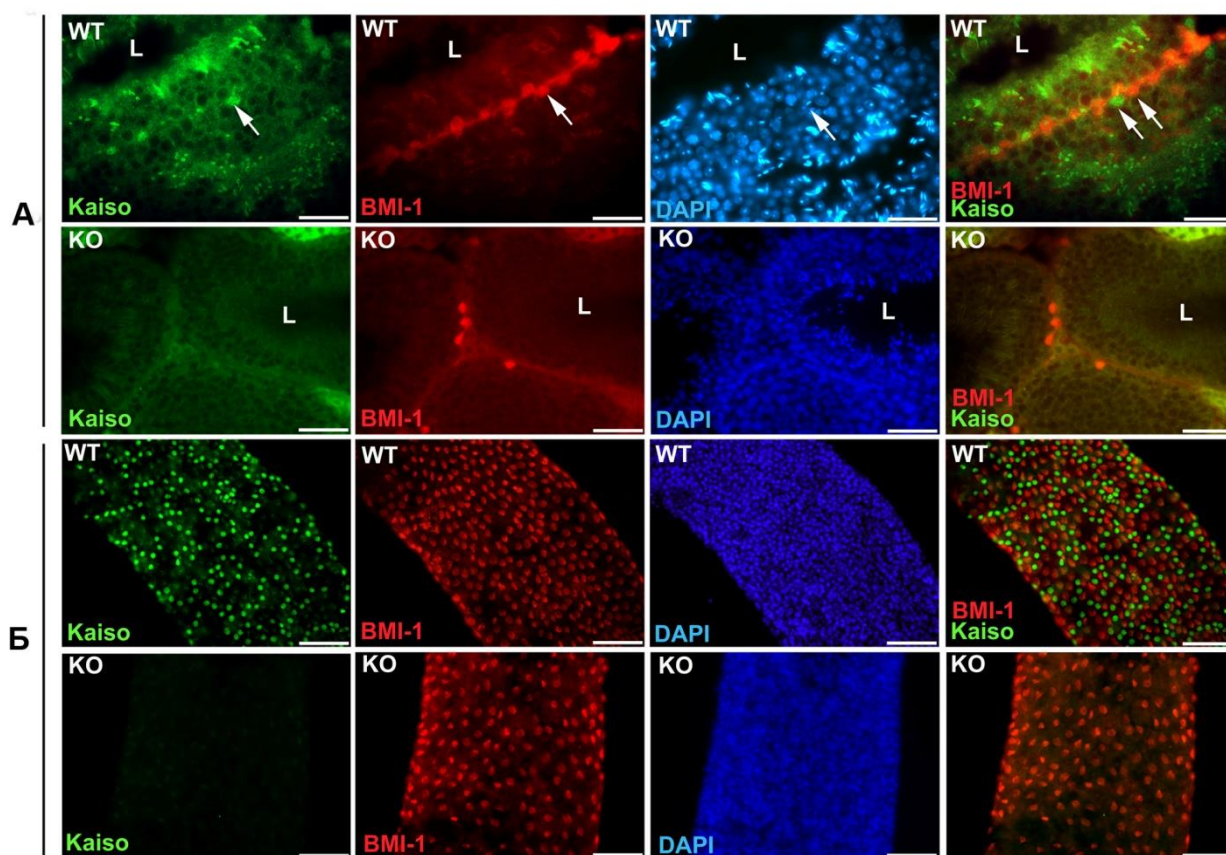


Рис. 17. Локализация Каизо и ВМІ-1 в мышинных семенниках. (А) Поперечные криосрезы семенных канальцев. (Б) Тотальные препараты изолированных семенных канальцев, продольный вид. Первая колонка: Каизо (зелёный); вторая: ВМІ-1 (красный); третья: DAPI (синий); четвёртая: наложение. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. L: просвет канальца (люмен). Шкала 100мкм.

Далее было показано, что Каизо частично колокализуется с PCNA, что подтверждает данные об экспрессии Каизо не во всех делящихся ССК (Рис. 18А). А при совместном окрашивании Каизо и GATA-4 колокализации не наблюдалось, что свидетельствует о том, что Каизо не экспрессируется в клетках Сертоли (Рис. 18А, Б).

В таблице представлены обобщённые результаты, демонстрирующие, что Каизо частично колокализуется с белком PLZF и PCNA, но не колокализуется с ВМІ-1 и GATA-4 (Табл. 6). Полученные результаты позволяют нам заключить, что Каизо экспрессируется на стадиях недифференцированных ССК типа Arg(парные) и Aal(линейные) у взрослых мышей.

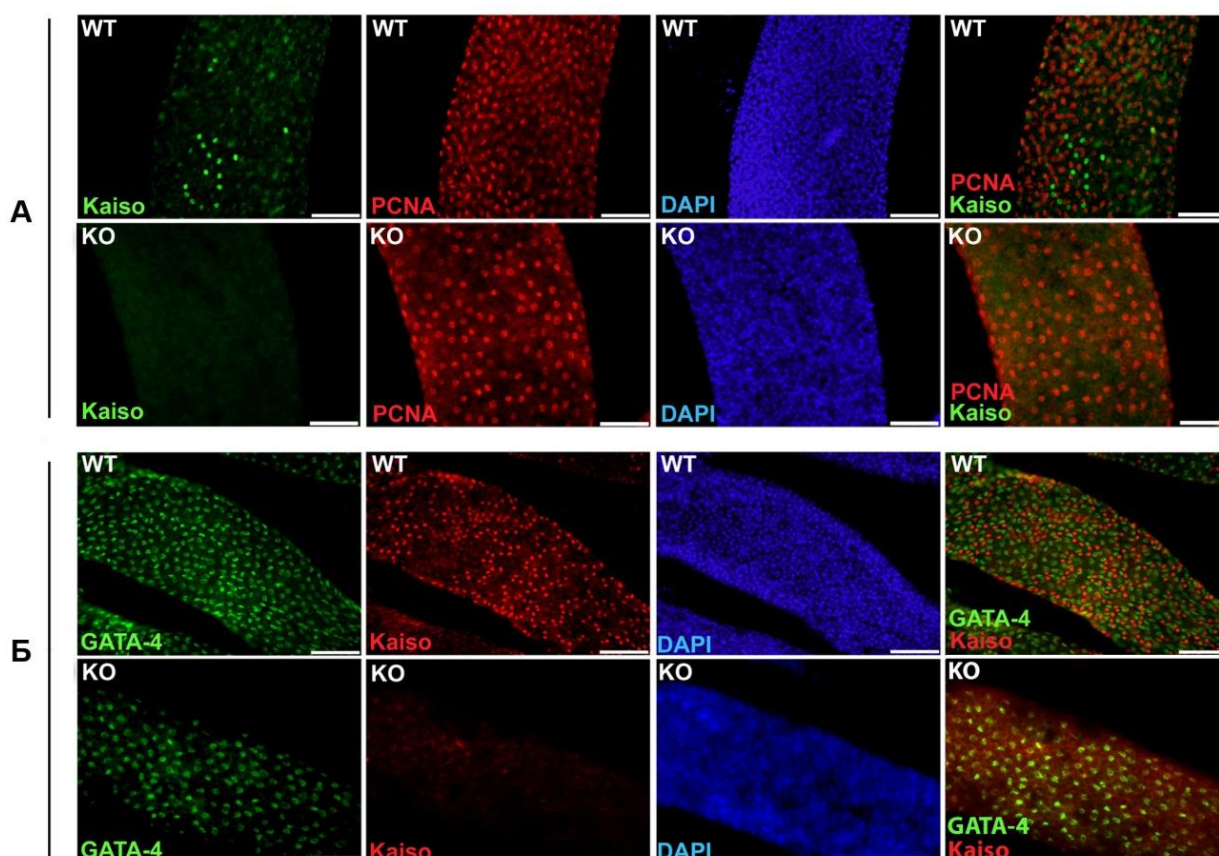


Рис. 18. Локализация Каизо, GATA-4 и PCNA в семенниках мыши. (А) Первая колонка: Каизо (зелёный); вторая: PCNA (красный); третья: DAPI (синий); четвёртая: наложение. (Б) Первая колонка: GATA-4 (зелёный); вторая: Каизо (красный); третья: DAPI (синий); четвёртая: наложение. Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Тотальные препараты изолированных семенных канальцев, продольный вид. L: просвет канальца (люмен). Шкала 100мкм.

Таблица. 6. Экспрессия Каизо с маркёрами различных клеток в семенниках.

Название специфических маркёров клеток семенников	Определяемые типы клеток в семенниках	Колокализация с Каизо
PLZF	As, Apr и Aal ССК	+/-
BMI-1	As ССК	-
PCNA	Пролиферирующие сперматогонии	+/-
GATA-4	Клетки Сертоли и Лейдига	-

3.1.5 Анализ локализации белка Каизо в структурах мозга

В исследовании о связи дисфункции гена *Kaizo* и Ретт-синдрома при помощи *in situ* гибридизации было показано, что мРНК *Kaizo* экспрессируется в различных отделах мозга (Della Ragione et al., 2006). В данной работе было решено изучить локализацию белка Каизо в мозге при помощи флуоресцентной иммуногистохимии.

Локализация Каизо была исследована в коре, обонятельных луковицах, гиппокампе и мозжечке. Было выявлено, что в коре головного мозга, 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 (Рис 19).

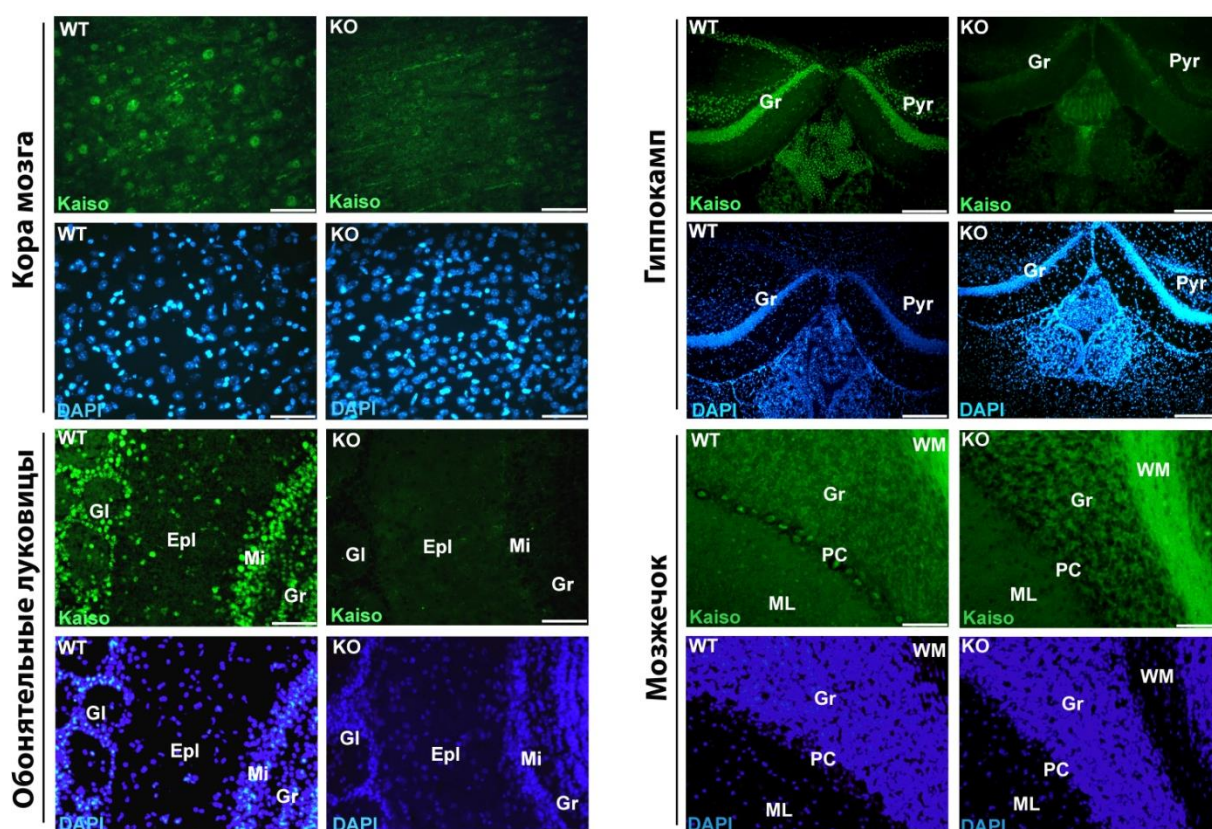


Рис. 19. Локализация Каизо в структурах мозга. Каизо (зелёный), DAPI (синий). Белок Каизо отсутствует у КО мышей. Epl: внешний плексиформный слой; Mi: слой митральных клеток; Gl: гломерулярный слой; Gr: зернистый слой; Pyr: пирамидальный слой; PC: клетки Пуркинье; ML: молекулярный слой; WM: белое вещество. Криосрезы. Шкала 50мкм. Гиппокамп — шкала 200мкм.

Показано, что в гиппокампе, Каизо локализуется в ядрах плотно упакованных круглых клеток зернистого слоя, а также в клетках пирамидального слоя, которые вместе формируют V- или U-образные структуры зубчатой извилины. В мозжечке Каизо локализуется в ядрах клеток Пуркинье, клеток зернистого (плотно упакованные клетки) и молекулярного слоёв (глиальные клетки, аксоны клеток зернистого слоя и дендриты клеток Пуркинье) (Рис. 19).

Таким образом, была обнаружена ядерная локализация Каизо в определённых типах клеток в тех же структурах мозга, которые были описаны при анализе *in situ* гибридизации *Kaizo* (Della Ragione et al., 2006).

3.2 Морфологические особенности мозга мышей с нокаутом гена *Kaizo*

Поскольку Каизо активно экспрессируется в ЦНС, были изучены морфологические особенности мозга КО мышей методами магнитно-резонансной томографии (МРТ). Нокаут гена *Kaizo* 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 (Табл. 7, Рис. 20).

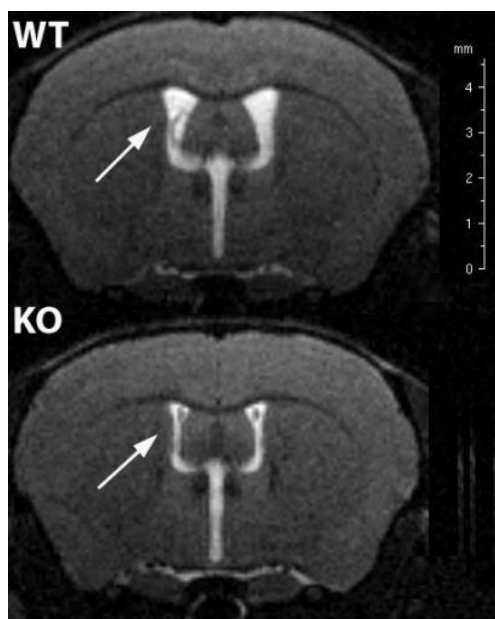


Рис. 20. Снимок МРТ боковых желудочков в мозге мышей WT и в КО. Срез мозга в коронарной проекции. ($F_{1,14}=28.55$, $p<0.0001$).

Боковые желудочки головного мозга представляют собой полости в головном мозге, содержащие ликвор (спинномозговую жидкость) и являются

наиболее крупными в желудочковой системе головного мозга. Ликвор предохраняет головной и спинной мозг от механических воздействий, обеспечивает поддержание постоянного внутричерепного давления, водно-электролитного гомеостаза, а также поддерживает обменные процессы между кровью и мозгом. Среди патологий желудочков чаще всего наблюдается их увеличение, что часто ассоциировано с психическими расстройствами, нарушением памяти, движений и мотиваций. У человека объём боковых желудочков изменяется с возрастом и увеличен у людей, страдающих болезнью Альцгеймера, шизофренией, биполярными расстройствами и т. д. (Wright et al., 2000). Предполагается, что уменьшение размера желудочков также может быть связано с различными психическими расстройствами (Roza et al., 2008). Учитывая полученные результаты, было решено провести стандартную серию тестов, рекомендованных для обязательного поведенческого фенотипирования нокаутных и трансгенных мышей (Crawley, 2008).

Таблица 7. Общий объём мозга (без мозжечка) а также объём (мкл) коры, гиппокампа, стриатума и боковых желудочков в WT и нокаутных по Каизо (КО) мышах.

Структура	WT	КО	P
Общий объём мозга	423.9 ± 2.53	411.33 ± 5.6	F _{1,14} = 4.19, p>0.05
Кора	89.47 ± 0.8	89.56 ± 5.6	F _{1,14} < 1
Гиппокамп	22.14 ± 0.97	21.89 ± 0.32	F _{1,14} < 1
Стриатум	14.42 ± 0.26	14.01 ± 0.21	F _{1,14} < 1
Боковые желудочки	5.78 ± 0.7	1.91 ± 0.2	F _{1,14} = 28.55, p<0.0001
Количество мышей	8	8	

3.3 Поведенческое фенотипирование мышей с нокаутом гена *Kauzo*

3.3.1 Тревожность, двигательная и исследовательская активность

Тест «открытое поле»

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 КО 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 ($F_{1,23} = 11.16$, $p < 0.003$) по сравнению с животными WT (Рис. 21).

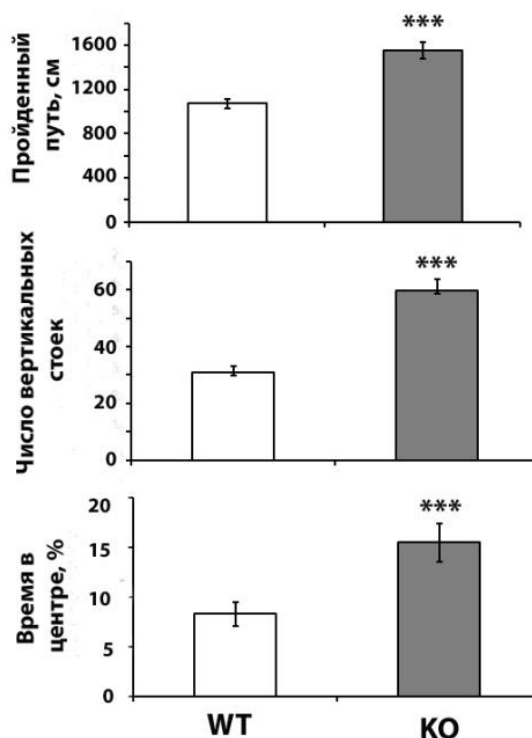


Рис. 21. Пройденный путь, число вертикальных стоек и время, проведённое в центре арены, в тесте «открытое поле» у мышей WT и КО. *** $p < 0.001$ достоверные различия с WT.

Таким образом, мышей КО отличают повышенная, по сравнению с животными WT, двигательная и исследовательская активности, а увеличение времени нахождения мышей КО в центре открытого поля можно, на первый взгляд, интерпретировать как анксиолитический (противотревожный) эффект

нокаута гена *Kauzo*, так как обычно мыши избегают ярких и открытых пространств, предпочитая держаться ближе к стенке.

Тест «новый объект»

Тест «новый объект» используется у грызунов для оценки тревожного поведения (груминг, число болюсов), двигательной (пройденный путь, см) и исследовательской (количество вертикальных стоек, контакты с объектом) активностей.

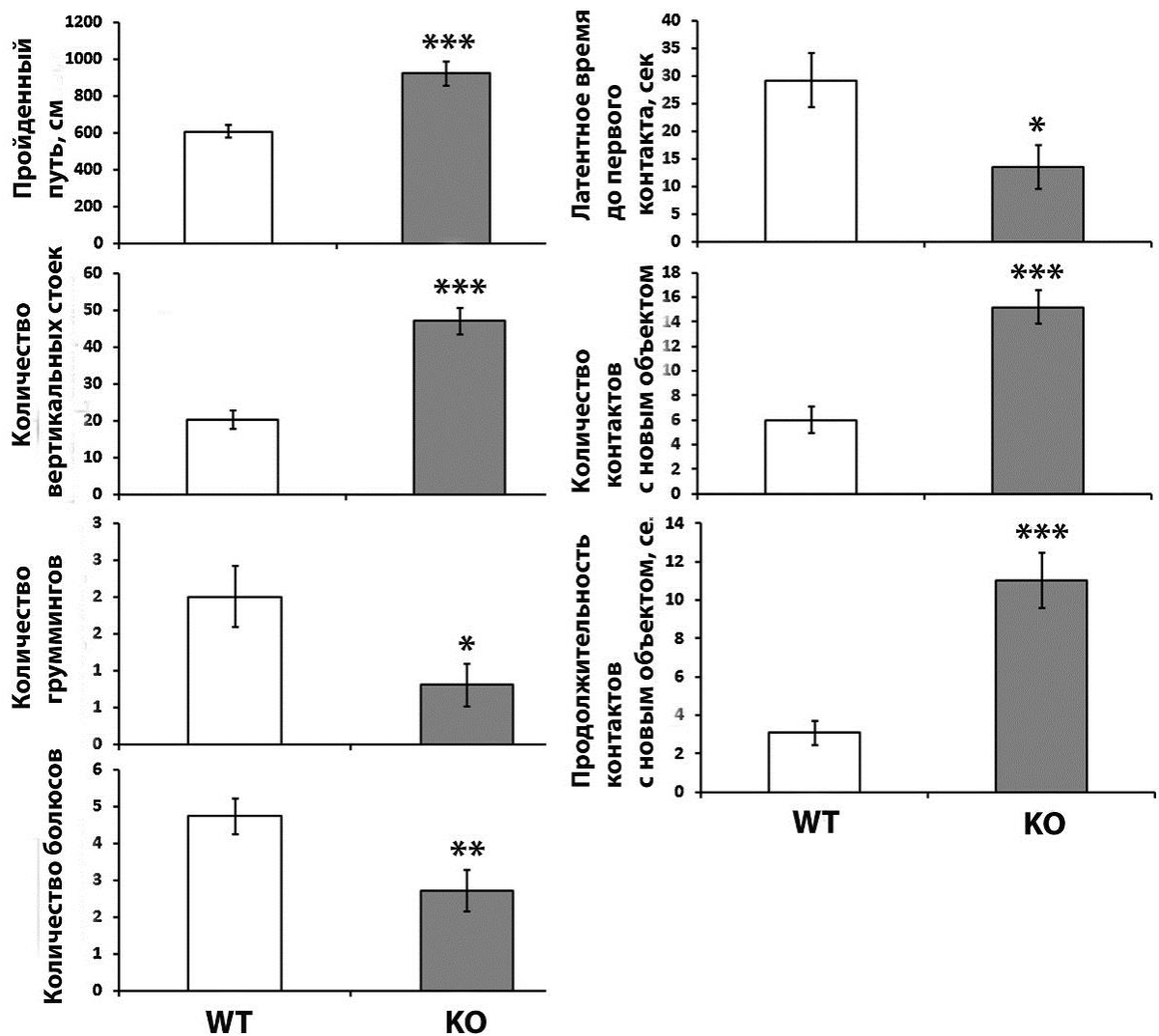


Рис. 22. Пройденный путь (см); количество вертикальных стоек; количество грумингов; количество болюсов; латентное время до первого контакта с новым объектом (сек); количество и продолжительность контактов с новым объектом (сек) в тесте «новый объект» у WT и KO мышей.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ достоверные различия с WT.

В тесте «Новый объект» у КО мышей возрастало общее пройденное расстояние ($F_{1,23} = 22.53$, $p < 0.0001$) и число вертикальных стоек ($F_{1,23} = 41.5$, $p < 0.0001$), а количество болюсов ($F_{1,23} = 7.4$, $p < 0.012$) и грумминга ($F_{1,23} = 4.56$, $p < 0.05$) уменьшалось по сравнению WT. У КО мышей в два раза ниже латентное время контакта с новым объектом ($F_{1,23} = 5.47$, $p < 0.05$), чем у WT. Однако, количество контактов ($F_{1,23} = 27.84$, $p < 0.0001$) и общая продолжительность контактов с новым объектом ($F_{1,23} = 32.56$, $p < 0.0001$) значительно выше, чем у WT (Рис. 22). Таким образом, данные этого теста подтверждают данные теста «открытое поле» о повышенной двигательной и исследовательской активности у мышей КО.

Тест «приподнятый крестообразный лабиринт»

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 (Belzung and Griebel, 2001; Milner and Crabbe, 2008; Pellow et al., 1985).

Мыши КО в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» пробегали 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. 23), что согласуется с высокой двигательной и исследовательской активностью у мышей КО в тесте «открытое поле». Однако, латентное время захода в открытые рукава 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 (Рис. 23).

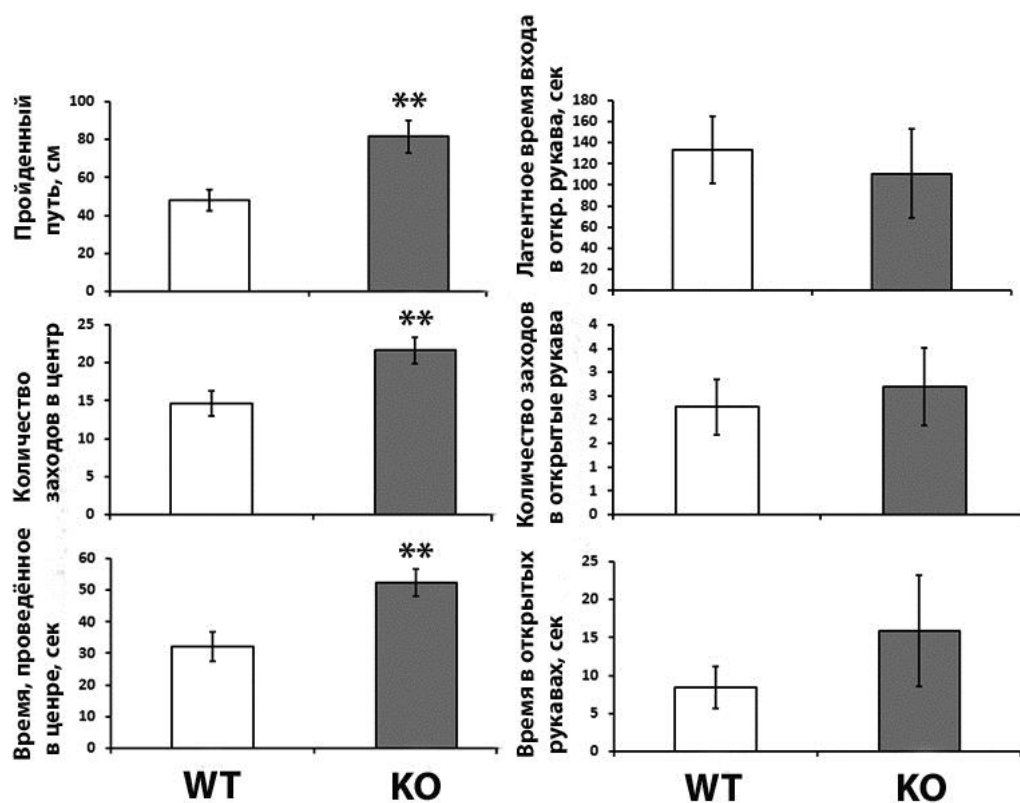


Рис. 23. Пройденный путь (см); количество заходов в центр; время, проведенное в центре лабиринта (сек); латентное время перед входом в открытые рукава (сек); количество заходов в открытые рукава; время, проведенное в открытых рукавах (сек) в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» у мышей WT и KO. ** $p < 0.01$ достоверные различия с WT.

Таким образом, возникает противоречие между сниженной тревожностью мышей KO в тесте «открытое поле» и отсутствием эффекта нокаута гена *Kaizo* на тревожность в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Возможно, что мыши обеих линий не различаются по их тревожности, а наблюдаемое увеличение времени пребывания в центре в тесте «открытое поле» отражает повышенную двигательную активность, а не пониженную тревожность мышей KO.

Тест «свет/темнота»

Традиционными показателями тревожности животного в тесте «свет/темнота» считается число переходов между камерами и общее время, проведенное животным в светлом поле (Crawely, 1985). В природе мышь

избегает освещённых пространств и стремится укрыться в тёмном защищённом месте.

В результате теста «свет/темнота», у КО мышей наблюдалось пониженное латентное время перед входом в тёмное поле ($F_{1,22} = 10.12$, $p < 0.005$), количество заглядываний в тёмное поле ($F_{1,22} = 13.98$, $p < 0.001$), но повышалось количество переходов между светлым и тёмным полем ($F_{1,22} = 10.87$, $p < 0.005$) и общее время, проведённое в тёмном поле ($F_{1,22} = 7.36$, $p < 0.02$) по сравнению с мышами WT (Рис. 24). В тоже время, количество выглядываний из тёмного поля не отличалось между линиями мышей. Повышенное количество переходов между камерами можно связать с высокой подвижностью животных КО, что согласуется с тестами «открытое поле», «новый объект» и «принудительное плавание». Данные о повышенном общем времени нахождения в тёмном поле не подтверждают данные о возможной пониженной тревожности мышей КО в тесте «открытое поле».

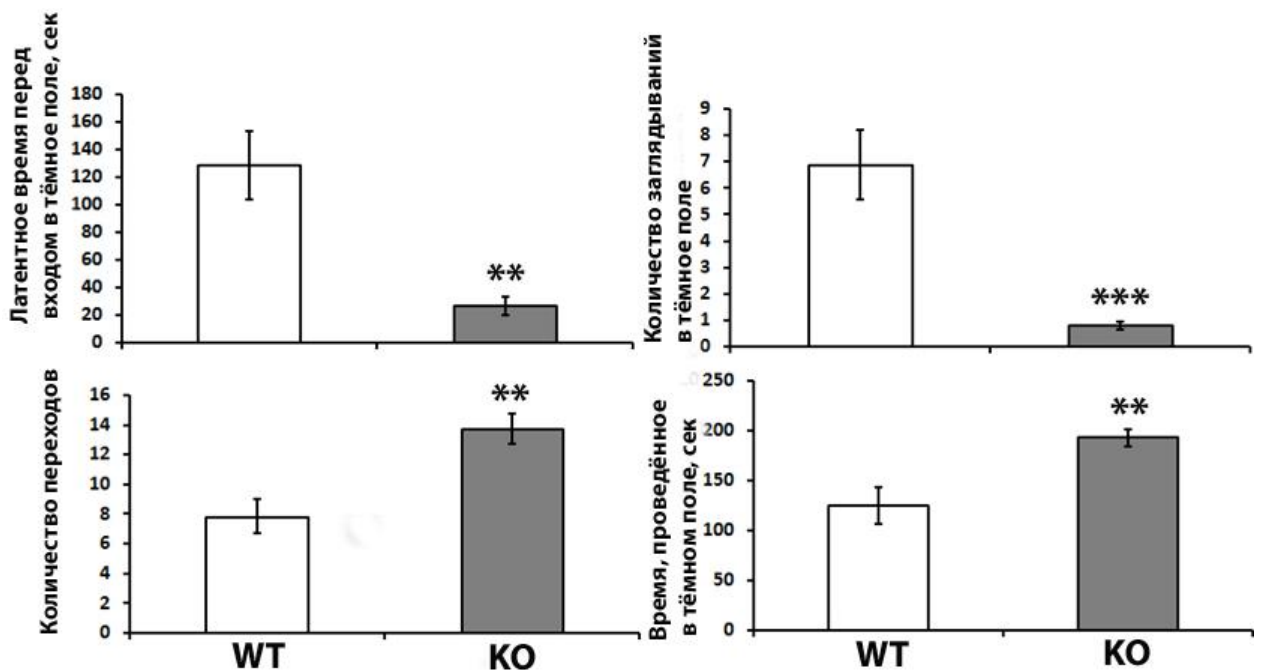


Рис. 24. Латентное время перед первым входом в тёмное поле (сек); количество переходов между камерами; количество заглядываний в тёмное поле; время, проведённое в тёмном поле (сек) в тесте «свет/темнота» у мышей WT и КО. Изначально мыши помещались в светлое поле. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ достоверные различия с WT.

3.3.2 Депрессивноподобное поведение

Тест «принудительное плавание»

Тест «принудительное плавание» широко используется для тестирования клинических антидепрессантов, поскольку большинство клинически эффективных антидепрессантов снижают время неподвижности в данном тесте (Cryan and Mombereau, 2004; Willner and Mitchell, 2002). В тесте «принудительное плавание» латентное время до первого замирания у КО мышей было вдвое больше ($F_{1,23} = 33.23$, $p < 0.0001$), а суммарное время неподвижности было втрое короче ($F_{1,23} = 54.72$, $p < 0.0001$), чем у животных WT (Рис. 25).

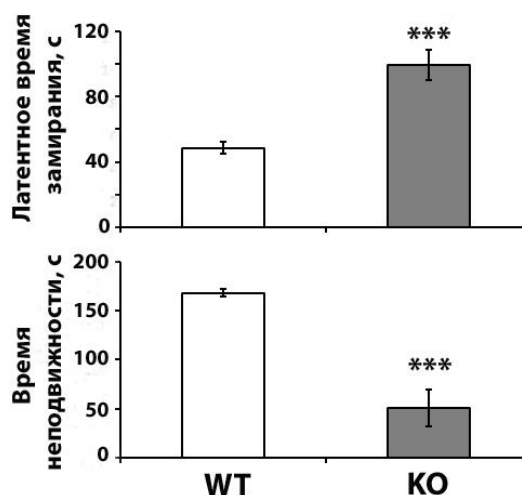


Рис. 25. Латентное время неподвижности и общее время неподвижности в тесте «принудительное плавание» у мышей WT и КО. *** $p < 0.001$ достоверные различия с WT.

Таким образом, мыши КО практически не проявляют неподвижности в данном тесте – они непрерывно плавают и ищут способ выбраться из сосуда. Данные результаты можно интерпретировать как некий «антидепрессантный эффект» нокаута гена *Каузо* (Cryan and Mombereau, 2004; Willner, 1990). Однако, интерпретация уменьшения времени неподвижности в тесте «принудительного плавания» как «антидепрессантный эффект» верифицирована только для фармакологических экспериментов, в нашем случае снижение времени неподвижности в тесте у мышей КО может быть также следствием высокой двигательной активности.

3.3.3 Реакция рефлекторного вздрагивания и её престаимпульное торможение

Далее у мышей WT и КО исследовалась амплитуда реакции рефлекторного вздрагивания на неожиданный звуковой сигнал и престаимпульное торможение реакции вздрагивания, если основному резкому акустическому стимулу предшествует слабый престаимпуль. Животные с высоким уровнем оборонительного поведения характеризуются высокой амплитудой рефлекторной реакции вздрагивания, а престаимпульное торможение является индикатором сенсоромоторной фильтрации, отражающим способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию (Braff and Geyer, 1990; Geyer et al., 1990). Известно, что у людей способность к сенсоромоторной фильтрации нарушена у больных шизофренией, что выражается в снижении престаимпульного торможения (Geyer et al., 1990; Swerdlow et al., 1994).

В результате, у КО мышей амплитуда акустической реакции вздрагивания ($F_{1,22} = 4.68$, $p < 0.05$) и престаимпульное торможение ($F_{1,23} = 6.58$, $p < 0.02$) оказались выше, чем у WT мышей (Рис. 26). Таким образом, удаление гена *Kauzo* приводит к увеличению престаимпульного торможения, что увеличивает, но не нарушает, способность ЦНС мышей к сенсоромоторной фильтрации.

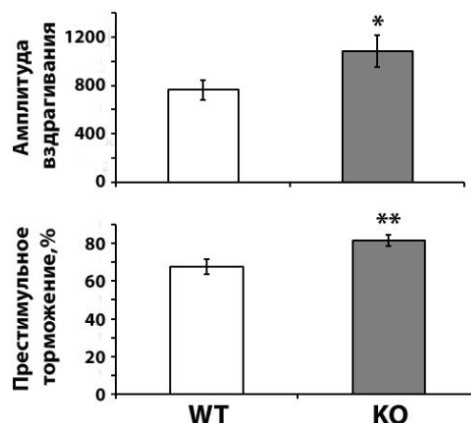


Рис. 26. Амплитуда рефлекса вздрагивания (условные единицы) и престаимпульное торможение (%) у мышей WT и КО. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ достоверные различия с WT.

3.3.4. Пространственная память и обучаемость

Тест «водный лабиринт Морриса»

Тест «Водный лабиринт Морриса» позволяет оценить когнитивные способности, пространственную память и обучаемость животных. Этот метод основан на поиске животными кратчайшей дистанции до спрятанной под водой платформы на основании памяти о ее предыдущем местонахождении (D'Hooge and De Deyn 2001). Обычно в процессе обучения поведение оптимизируется, а необходимый путь для поиска платформы уменьшается.

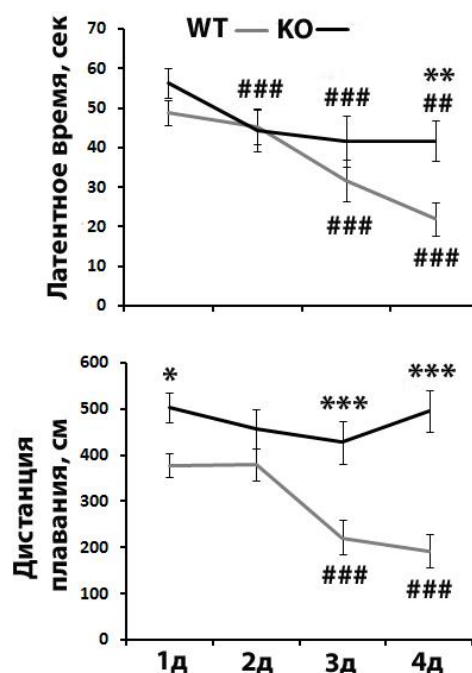


Рис. 27. Динамика латентного времени нахождения платформы (сек) и дистанции плавания (см) во время четырёх ежедневных тренировок в водном лабиринте Морриса у мышей WT и КО. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ достоверные различия с соответствующим днём у WT и КО. ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$ достоверные различия с первым днём одной и той же линии.

В результате теста Морриса были показаны отличия между КО и WT в латентном времени нахождения невидимой платформы ($F_{3,69} = 2.96$, $p < 0.05$) и в проплываемом расстоянии ($F_{3,69} = 5.43$, $p < 0.002$). 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 быдо 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 проплываемой 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.

Суммируя результаты исследования поведения животных в обоих тестах можно заключить, что в отсутствие Каизо 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.

3.6. Влияние нокаута гена *Каизо* на развитие острого колита, вызванного декстран сульфатом натрия

Острый воспалительный процесс в кишечнике мышей инициировали введением декстран сульфата 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. 29А). 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. 28А, Б). Несмотря на то, что в течение 7 дней приема 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. 28В).

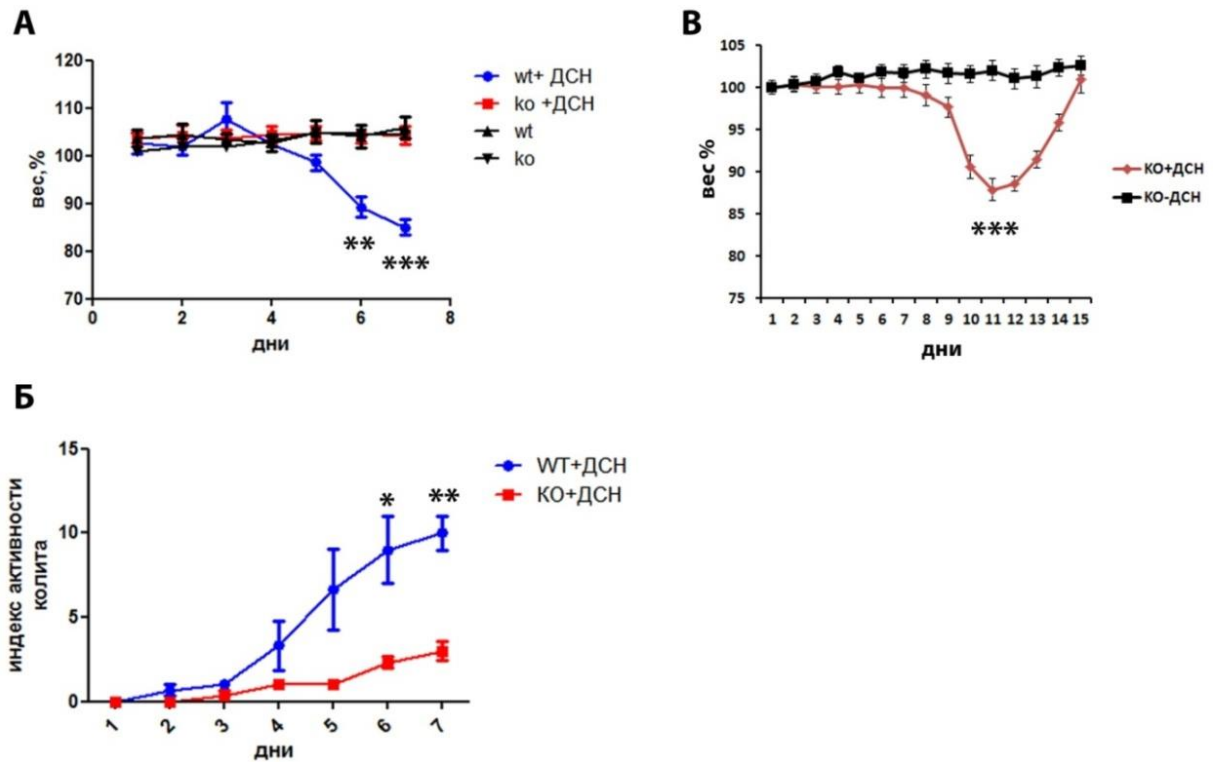


Рис. 28. Динамика веса и индекса активности колита (ИАК) у мышей WT по сравнению с КО при воздействии ДСН. (А) Динамика изменения веса мышей при воздействии 2% раствора ДСН в течение 7 дней по сравнению с контролем. **p-value = 0.002, *** p-value < 0.001 достоверные различия по сравнению с контрольными животными каждой линии. n=6 в каждой группе. (Б) Динамика изменения веса КО мышей после воздействия 2% раствора ДСН по сравнению с контролем, ***p-value < 0.001. (В) Сравнительный анализ ИАК, регистрируемый ежедневно в течение 7 дней, как комбинированная оценка массы тела, кровотечения и консистенции стула по шкале от 0 до 4. *p-value = 0.03, **p-value = 0.0037 достоверные различия между WT и КО, n = 6 в каждой группе.

Вскрытие мышей на 7 день после воздействия ДСН у WT выявило укорочение длины толстого кишечника и, соответственно, общей длины кишечника (Рис. 29В, Г). У КО мышей на 7 день укорочения кишечника не

наблюдалось (Рис 29В, Г). При гистологическом анализе кишечника у получавших ДСН мышей WT и КО были выявлены деформация, сглаженность, укорочение крипт кишечного эпителия, а также обильная лимфоцитарная инфильтрация (Рис. 29А). При этом у мышей WT лимфоцитарные скопления были крупнее, инфильтрация лимфоцитами обильнее, что подтвердил анализ индекса гистологической активности (ИГА) (Рис. 29Б). После восстановительного периода (на 30 день) морфология кишечника как у WT, так и у КО мышей полностью восстанавливалась. Различий в длине и морфологии кишечника между интактными мышами линий WT и КО выявлено не было (Рис. 29А).

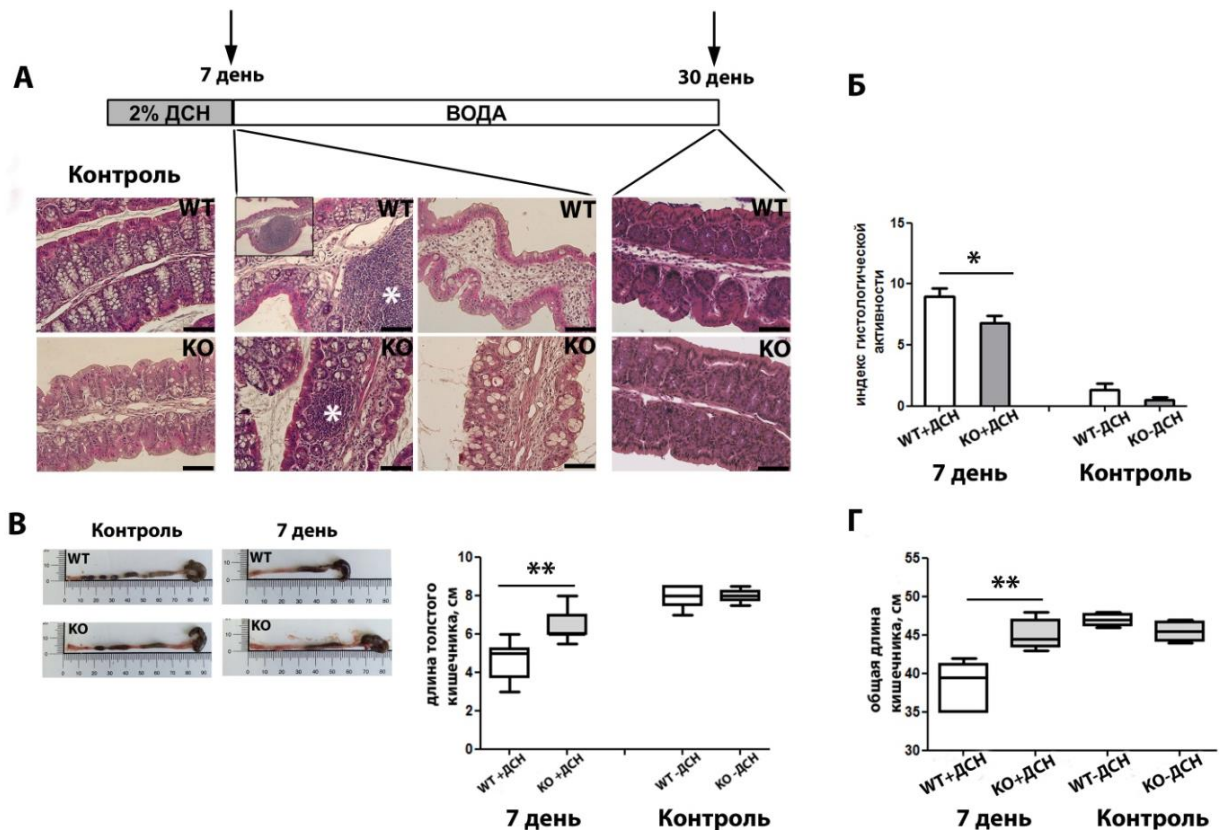


Рис. 29. Снижение уровня воспаления у мышей КО по сравнению с WT при воздействии ДСН. (А) Схема эксперимента с ДСН. Стрелками обозначены дни, в которые мышей подвергали эвтаназии. Окрашивание гематоксилином/эозином проксимального отдела прямой кишки. Звездочкой указаны участки скопления лимфоцитов. Продольные парафиновые срезы. Шкала 100 мкм. (Б) 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. (В) Длина толстого кишечника на 7 день. ** p -value = 0.0059 достоверные различия с WT, $n = 6$

каждой группе. (Г) Общая длина всего кишечника (толстого и тонкого) на 7 день после воздействия ДСН. **p-value = 0,002 достоверные различия с WT.

Известно, что при воспалении, вызванном ДСН, детектируется повышенный уровень апоптоза пролиферирующих клеток в криптах, ассоциированный с остановкой клеточного цикла в G₀ фазе (Araki et al., 2010). Так как Каизо участвует в активации p53, увеличивая его уровень ацетилирования, что приводит к повышению уровня экспрессии проапоптотических генов *Bax* и *Puma* (Koh et al., 2014), то вполне возможно, что Каизо может принимать участие в регуляции апоптоза, который развивается при воспалительных процессах.

Для того чтобы проверить это предположение, было проведено окрашивание TUNEL, выявляющее апоптоз. В результате, у животных контрольной группы уровень апоптоза был одинаков в обеих линиях мышей (Рис. 30А, Б). Однако на 7 день после воздействия ДСН в криптах и подслизистой основе у WT и у КО животных был детектирован апоптоз (Рис. 30А, Б). Более того, на 7 день у животных WT апоптоз детектировался в основном в собственной пластинке (*lamina propria*), в то время как у КО апоптоз активизировался помимо собственной пластинки в эпителиальных клетках (Рис. 30В).

Ранее было показано, что к 7 дню воздействия ДСН, т.е. в активной фазе воспаления, апоптоз детектируется в основном в собственной пластинке (Рис. 30Г) (Shichijo et al., 2008). Таким образом, можно заключить, что у мышей WT типа до 7 дня происходит активная фаза воспаления, в то время как у КО этот процесс отсрочен.

Учитывая взаимодействия Каизо и p120-катенина, участвующего в регуляции клеточной адгезии, в результате воспаления не исключаются изменения в проницаемости кишечной стенки у КО животных. Однако, иммуногистохимический анализ не выявил явных изменений в локализации белка p-120 катенина; он детектировался в цитоплазме и не перемещался в ядро, как было показано при хроническом воспалении (Chaudhary et al., 2013).

7-й день

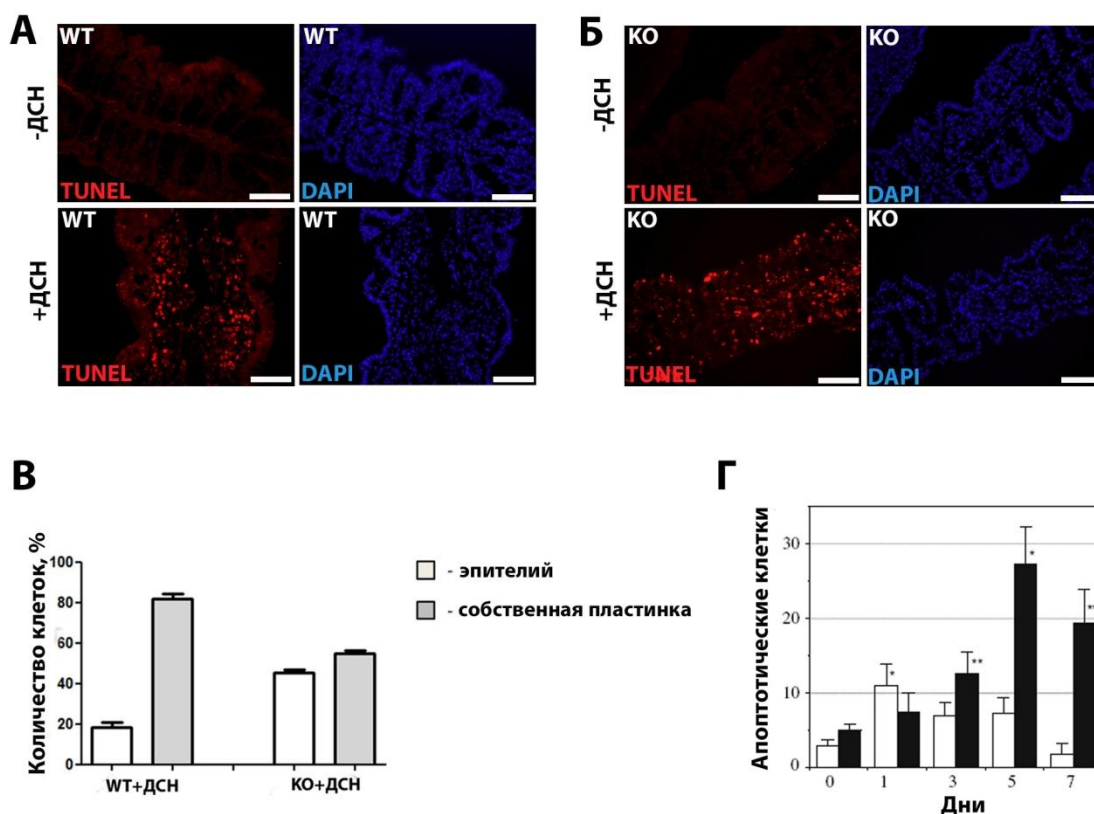


Рис. 30. Увеличение количества апоптотирующих клеток у мышей WT по сравнению с KO после воздействия ДСН. Окрашивание продольных срезов толстого кишечника мышей (А) WT и (Б) KO контрольной группы (питьевая вода) и на 7 день добавления ДСН методом TUNEL (красный). DAPI — окрашивание ядра. Шкала 100 мкм. (В) Взаимное соотношение всех апоптотических клеток в эпителии и в собственной пластинке (*lamina propria*) толстой кишки у WT и KO после воздействия ДСН на 7-й день. (Г) Количество TUNEL позитивных клеток в эпителии крипт (светлые столбики) и в собственной пластинке (чёрные столбики) после воздействия ДСН в течение 7 дней (Shichijo et al., 2008).

Каизо экспрессируется в эпителиальных клетках крипт кишечника, что подтверждается совместным окрашиванием с p-120 катенином (маркёром эпителиальных клеток кишечника) (Рис. 31А). По данным ОТ-ПЦР в реальном времени у мышей WT при активации воспаления в результате воздействия ДСН наблюдалось снижение уровня мРНК гена *Kaizo* примерно на 36% (Рис. 31Б).

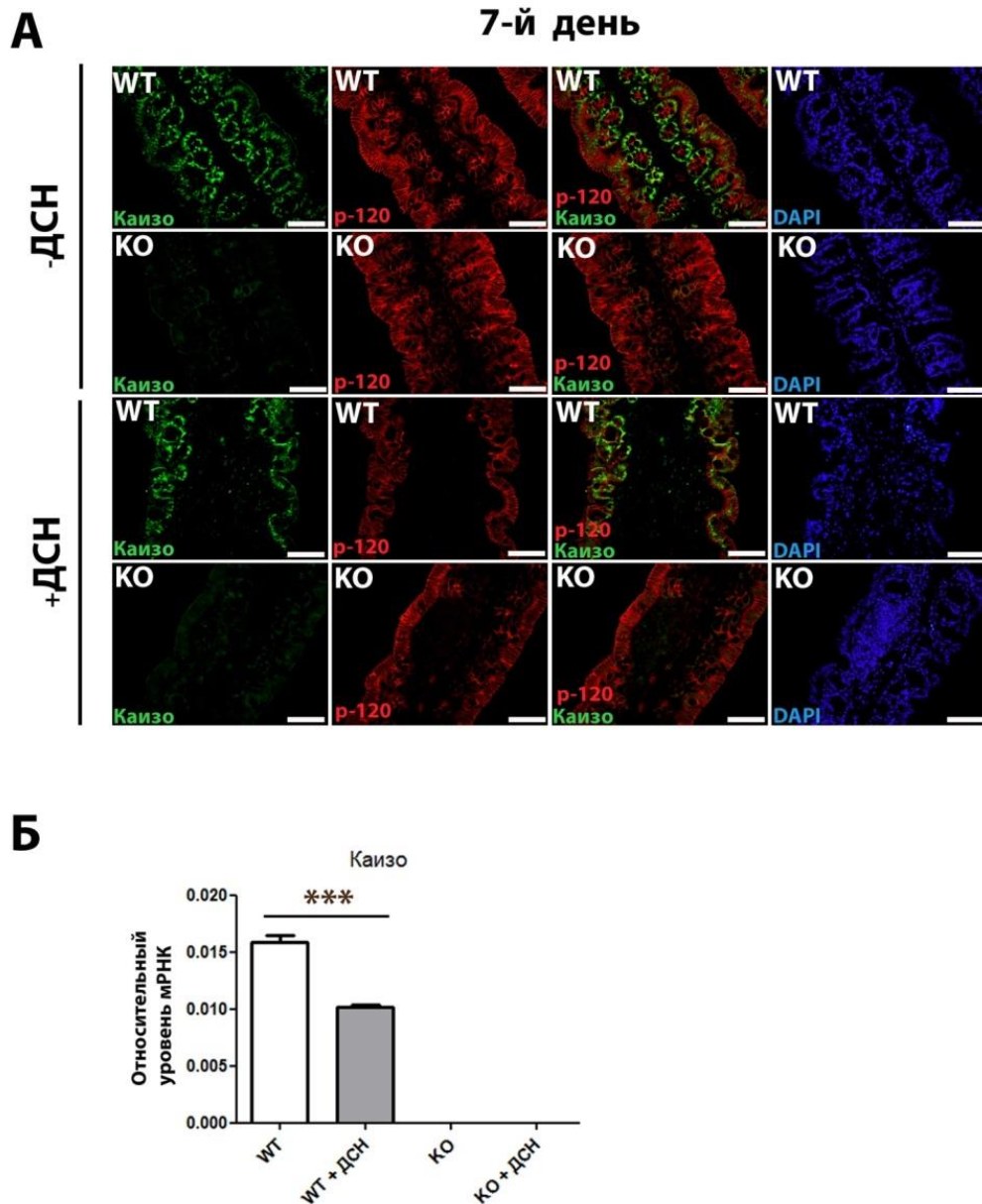


Рис. 31. Снижение уровня Каизо у мышей WT после воздействия ДСН. (А) Окрашивание продольных срезов толстого кишечника контрольной группы мышей и на 7 день эксперимента Каизо (зелёный), p-120 катенин (красный), DAPI (синий). Парафиновые срезы. Шкала 100 мкм. (Б) Анализ экспрессии мРНК *Kaizo* в толстой кишке на седьмой день после воздействия ДСН с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. ***p-value < 0.0001 достоверная разница между отмеченными образцами, n = 4 в каждой группе, +/- стандартная ошибка среднего.

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. 32А-Ж). Считается, что *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-17a* и *TNFα*

являются провоспалительными цитокинами, а TGF- β 1 и IL-10 — противовоспалительными (Akdis et al., 2011). Однако, в некоторых работах было показано, что IL-6, TNF α и TGF- β 1 могут участвовать как в про-, так и противовоспалительных процессах (Han et al., 2012; Sanjabi et al., 2009; Tilg et al., 1994). Таким образом, биологические активности цитокинов часто перекрываются, а оценка их экспрессии позволяет судить о тяжести воспалительного процесса.

После 7 дней воздействия ДСН уровень мРНК генов *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*, *TNF- α* и *TGF- β 1* 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- β 1* в 1.5 раза, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-10* и *IL-17A* в 3–7 раз, а *IL-6* в 14 раз (Рис. 32А-Ж). После восстановительного периода экспрессия цитокинов у мышей WT и КО снижалась до нормы (Рис. 32А, Б).

Таким образом, более активное развитие воспаления у WT после воздействия ДСН подтвердили повышенные уровни экспрессии генов цитокинов (*TGF- β 1*, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*) по сравнению с КО. Так как известно, что механизмы эпигенетической регуляции играют доминантную роль в контроле активации различных иммунных клеток (Cook et al., 2015; Leoncini et al., 2015; Zhang et al., 2015), то вполне возможно, что во время индукции воспаления белок Каизо может участвовать не только в регуляции апоптоза, но и в регуляции иммунитета, как врожденного (макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, эпителиальные клетки и пр.), так и приобретенного (активация Т- и В-клеток, секреция цитокинов и т.д.).

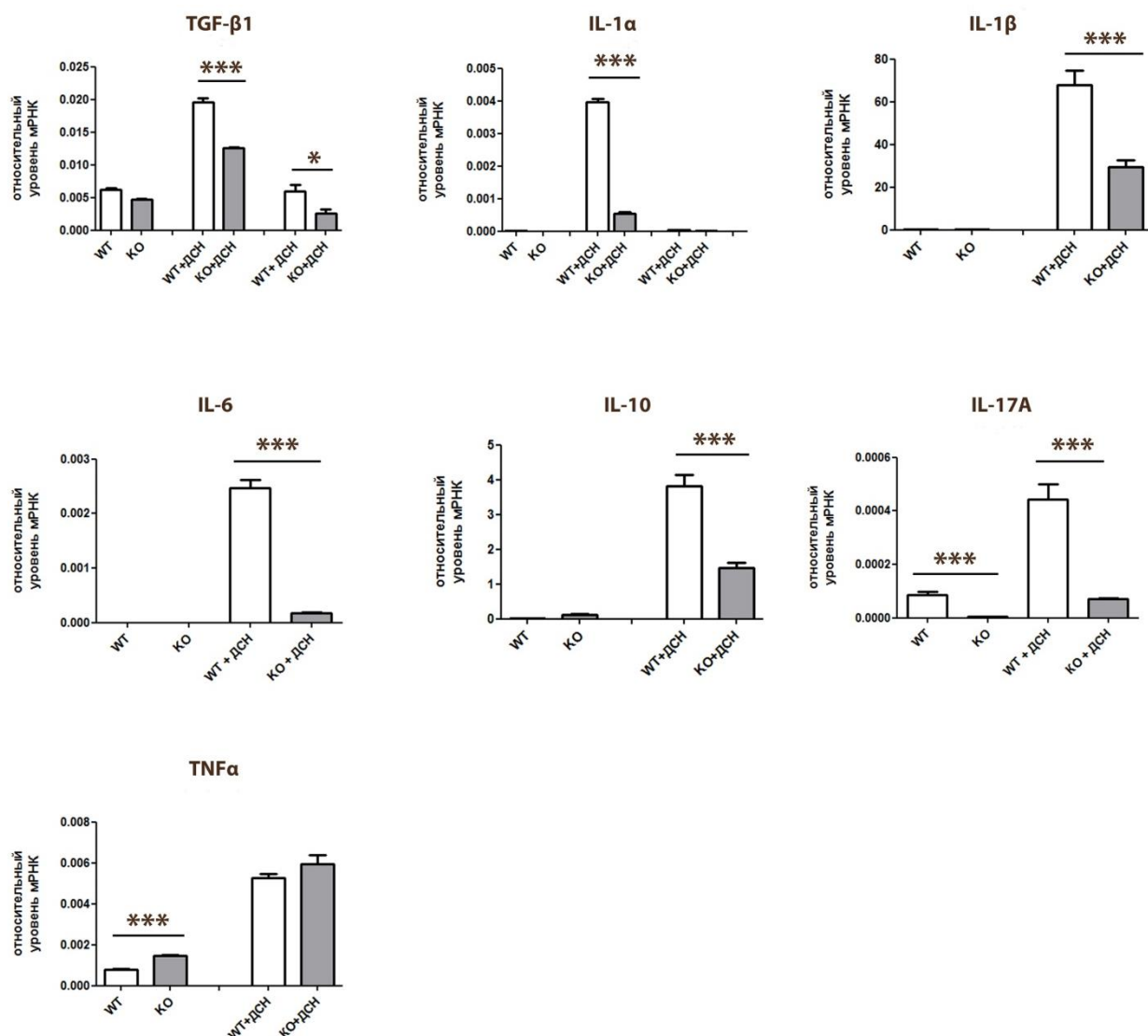


Рис. 32. Изменение экспрессии провоспалительных и анти-воспалительных цитокинов в толстой кишке после воздействия ДСН. Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР в реальном времени генов *TGF-β1* (А), *IL-1α* (Б), *IL-1β* (В), *IL-6* (Г), *IL-10* (Д) *IL-17A* (Е) и *TNFα* (Ж) в толстой кишке, до и после воздействия 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.

Согласно полученным данным, белок Каизо участвует в развитии острого воспаления в кишечнике в ответ на воздействие ДСН, а его отсутствие изменяет временные параметры и выраженность этого процесса. Полученные результаты коррелируют с опубликованными данными о том, что удаление гена *Kaizo* приводит к задержке прогрессирования опухолеобразования в кишечнике в модели *Kaizo*^{-y}/*Apc*^{Min/+} (Prokhortchouk et al., 2006). С другой

стороны, эктопическая гиперэкспрессия *Kaiso* ($Kaiso^{Tg/+}$) в кишечнике ведет к развитию хронического воспаления (Chaudhary et al., 2013), а при скрещивании линии $Kaiso^{Tg/+}$ с линией $Apc^{Min/+}$, происходит снижение продолжительности жизни, усугубление воспалительного процесса и увеличение количества полипов в кишечнике (Pierre et al., 2015). Обобщённые данные работ по исследованиям роли *Kaiso* в воспалительном процессе и опухолеобразовании представлены в таблице (Табл. 9).

Таблица 9. Влияние *Kaiso* на развитие острого или хронического воспаления в различных моделях.

Мышиные модели	Фенотип
WT +ДСН (Модель острого воспаления)	<ul style="list-style-type: none"> • Признаки острого воспаления: деформация, сглаженность и укорочение крипт кишечного эпителия, а также обильная лимфоцитарная инфильтрация и крупные лимфоцитарные скопления.
КО +ДСН (Модель острого воспаления)	<ul style="list-style-type: none"> • Нокаут по гену <i>Kaiso</i> ($Kaiso^{-/-}$); • Признаки острого воспаления менее выражены по сравнению с WT: деформация, сглаженность и укорочение крипт кишечного эпителия лимфоцитарная инфильтрация.
$Apc^{Min/+}$ (Velcich et al., 2002)	<ul style="list-style-type: none"> • Несёт аллель Apc^{Min}, с мутацией в гене опухолевого супрессора <i>Apc</i> (adenomatous polyposis coli) (Min-multiple intestinal neoplasia); • Предрасположены к образованию спонтанных кишечных аденом.
$Kaiso^{-/-}/Apc^{Min/+}$ (Prokhortchouk et al., 2006)	<ul style="list-style-type: none"> • Увеличение продолжительности жизни; • Снижение опухолеобразования.
$Kaiso^{Tg/+}$ (Chaudhary et al., 2013)	<ul style="list-style-type: none"> • Гиперэкспрессия <i>Kaiso</i> в кишечнике; • Признаки хронического воспаления: слияние крипт, инфильтрация нейтрофилами и их активация, слияние ворсинок, гиперплазия крипт.
$Kaiso^{Tg/+}/Apc^{Min/+}$ (Pierre et al., 2015)	<ul style="list-style-type: none"> • Снижение продолжительности жизни; • Увеличение количества полипов по сравнению с $Apc^{Min/+}$; • Усиление воспаления.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе использовалась мышьяная модель с генетическим нокаутом *Каизо* в качестве отрицательного контроля, что позволило подтвердить специфичность антител и определить точную локализацию белка в органах и тканях взрослых мышей. Впервые удалось показать, что Каизо в основном детектируется в ядрах клеток кожи, кишечника, роговицы, эпидидимиса, языка и других эпителиальных тканях, выстилающих протоки желёз и поверхности различных органов. Белок Каизо экспрессируется и в ядрах других клеток: в клетках тимуса и селезёнки, в клетках волосяных фолликулов, дермы и др. В структурах головного мозга Каизо локализуется в ядрах нейральных и глиальных клеток обонятельных луковиц, гиппокампа и мозжечка.

В репродуктивных органах самцов белок Каизо локализуется в ядрах сперматогониальных стволовых клеток (ССК). Каизо частично колокализуется с PLZF, маркёром ССК типа As(одиночные), Apr(парные) и Aal(линейные) и не колокализуется с BMI-1, маркёром ССК типа As, поэтому возможно Каизо является новым маркёром ССК типа Apr(парные) и Aal(линейные). До сих пор не известны специфические маркёры, позволяющие идентифицировать отдельные популяции ССК типа А. Так, было показано, что маркёр ССК BMI-1, частично колокализуется с PLZF и с Thy-1 (Zhang et al., 2008), но в дальнейшем была определена его локализация преимущественно в ССК типа As(одиночные) (Komai et al. 2014). PLZF также частично колокализуется с другим маркёром ССК — Oct4 (Buaas et al., 2004), из чего следует, что данные маркёры экспрессируются на нескольких стадиях ССК и пересекаются только на отдельных. Использование Каизо как нового маркёра сперматогониальных стволовых клеток типа Apr(парные) и Aal(линейные), может облегчить идентификацию и изучение недифференцированных сперматогоний в организме взрослых мышей.

Особый интерес представляют данные о единственной цитоплазматической локализации белка Каизо в сетчатке глаз мышей. В данной работе показано, что цитоплазматический Каизо встречается во внутренних сегментах фоторецепторных клеток, где находятся все органеллы, включая митохондрии, множество ионных каналов и мембранные полудиски с фоторецепторными белками, которые обеспечивают восприятие света за счёт поглощения фотонов и образуют электрический сигнал. Возможно, белок Каизо вовлечён в осуществление процессов восприятия и передачи зрительной информации в мозг.

Детальное морфологическое исследование мозга при помощи МРТ показало, что объём боковых желудочков у мышей КО примерно в три раза меньше, чем у мышей WT линии. У человека изменения объёма боковых желудочков могут быть связаны с различными психическими и нейродегенеративными заболеваниями: болезнью Альцгеймера, шизофренией, биполярным расстройством и т. д. (Wright et al., 2000).

Подробное поведенческое фенотипирование выявило, что нокаут гена *Каизо* приводит к увеличению двигательной активности в тестах «открытое поле», «новый объект», «приподнятый крестообразный лабиринт», «принудительное плавание», «водный лабиринт Морриса» и повышению способности к сенсомоторной фильтрации. Таким образом, у мышей с отсутствием гена *Каизо* наблюдаются изменения поведения, которые обычно характерны для детей с синдромом двигательной расторможенности, одними из проявлений которого являются неусидчивость и нарушения способности к обучению.

Отсутствие жизненно важных паталогических изменений мозга у мышей с нокаутом гена *Каизо* может быть связано с активацией компенсаторных функций других метил-ДНК связывающих белков. Известно, что генетический нокаут одного из метил-ДНК связывающих белков МЕСР2 вызывает снижение двигательной активности у мышей (Tropea et al., 2009).

Однако мы показали, что нокаут гена *Kaizo* никак не влияет на уровень экспрессии *MECP2* в структурах мозга.

Полученные данные об изменениях в морфологии мозга и в поведении мышей позволяют применять линию мышей с генетическим нокаутом *Kaizo* в качестве экспериментальной модели синдрома двигательной расторможенности, а также для дальнейшего изучения механизмов эпигенетической регуляции функций нервной системы.

Ещё одним интересным результатом данной работы является то, что нокаут гена *Kaizo* приводит к изменению развития острого воспаления, что выражается в меньшем проявлении всех признаков острого колита при воздействии ДСН: отсроченное снижение веса, появление жидкого стула и кровотечения, незначительное укорочение толстой кишки, менее выраженная деформация крипт и инфильтрация лимфоцитами по сравнению с WT линией мышей. У КО мышей после воздействия ДСН понижается уровень экспрессии генов цитокинов (*TGF- β 1*, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*), по сравнению с линией мышей WT типа. Сходный эффект устойчивости к заболеванию кишечника, а именно к образованию полипов, наблюдался при скрещивании нокаутных по *Kaizo* мышей с мышами линии *Arc^{Min/+}*. Кроме того, полученные данные согласуются с исследованиями о корреляции повышенного уровня экспрессии *Kaizo* с развитием хронического воспаления (Chaudhary et al., 2013; Pierre et al., 2015). Таким образом, *Kaizo* может быть вовлечён в развитие как острого, так и хронического воспаления.

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 в мозге, исключение составила цитоплазматическая локализация Каизо в фотосенсорных клетках сетчатки. Более того полученные в этой работе данные свидетельствуют о том, что Каизо может являться новым маркёром ССК типа Arg(парные) и Aal(линейные).

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

Обнаружено, что Каизо 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 Каизо 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 Каизо локализуется в цитоплазме.
3. Выявлено, что Каизо может являться новым маркёром стволовых сперматогониальных клеток типа *Arg*(парные) и *Aal*(линейные) у половозрелых мышей. Обнаружена частичная колокализация Каизо с *PLZF* (маркёром ССК типа *As*(одиночные), *Arg*(парные) и *Aal*(линейные)) и *PCNA* (маркёром пролиферации ССК), а также выявлено отсутствие колокализации с *VM1-1* (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- β 1*, *IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17A*) у мышей, нокаутных по гену *Каизо*, ниже по сравнению с мышами дикого типа.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Shumskaya (Коростина), V.S.** Distribution of Kaiso protein in mouse tissues / **V.S. Shumskaya (Коростина)**, 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 Prokhortchouk // *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. Девяткин, А.А., Сравнительная характеристика чувствительности линий мышей, несущих делеции генов *Muc2* и *Zbtb33*, к действию воспалительного агента – сульфата декстрана / А.А. Девяткин, **В.С. Шумская (Коростина)** //

XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2012». – Москва, 2012. – С. 10-11.

8. **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.

9. **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.

10. **Шумская (Коростина), В.С.** Влияние осмотического шока на формирование колоний индуцированных стволовых клеток из клеток мышинных эмбриональных фибробластов линий C57BL/6 и C57BL/6Kaiso / **В.С. Шумская (Коростина), Н.А. Жигалова, Е.Б. Прохорчук** // XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов - 2014». – Москва, 2014. – С. 21-2.

11. **Шумская (Коростина), В.С.** Влияние нокаута по гену Каизо на репрограммирование мышинных эмбриональных фибробластов / **В.С. Шумская (Коростина), Н.А. Жигалова, С.В. Женило, Е.Б. Прохорчук** // IV Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». – Казань, 2014. – С. 126.

12. **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. Prokhortchouk** // 21st Multidisciplinary International

Neuroscience and Biopsychiatry Conference «Stress and Behavior». – St-Petersburg, 2014. – Vol.1. – P. 28.

13. **Shumskaya (Korostina), V.S.** Influence of osmotic stress on the epigenetic changes during the induction of pluripotent stem cells from somatic cells / **Shumskaya (Korostina), V.S.**, Zhigalova NA, Artemov AV, Prokhortchouk E.B. // EMBO Conference «Chromatin and Epigenetics». – Heilderberg, 2015. – P. 300.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abraham, C. Inflammatory bowel disease / C. Abraham, J.H. Cho // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 361. — P. 2066–2078.
2. Adachi, Y. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers / Y. Adachi, H. Yamamoto, F. Itoh, Y. Hinoda, Y. Okada, K. Imai // *Gut.* — 1999. — Vol. 45. — P. 252–258.
3. Aguilera, C. c-Jun N-terminal phosphorylation antagonises recruitment of the Mbd3/NuRD repressor complex / C. Aguilera, K. Nakagawa, R. Sancho, A. Chakraborty, B. Hendrich, A. Behrens // *Nature.* — 2011. — Vol. 469. — P. 231–235.
4. Ahmad, K.F. Crystal structure of the BTB domain from PLZF / K.F. Ahmad, C.K. Engel, G.G. Privé // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1998. — Vol. 95. — P. 12123–12128.
5. Akdis, M. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases / M. Akdis, S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2011. — Vol. 127 — P. 701–721.
6. Kulikov, A. V. Antidepressant Activity of 8-(trifluoromethyl)-1,2,3,4,5-benzopentathiepin- 6-amine hydrochloride (TC-2153): Comparison with Classical Antidepressants/ A. V. Kulikov // *Lett. Drug Des. Discov.* — 2014. — Vol. 11 — P. 169–173.
7. Allen, I.C. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer / I.C. Allen, E.M. TeKippe, R.-M.T. Woodford, J.M. Uronis, E.K. Holl, A.B. Rogers, H.H. Herfarth, C. Jobin, J.P.-Y. Ting // *J. Exp. Med.* — 2010. — Vol. 207 — P. 1045–1056.
8. Amir, R.E. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 / R.E. Amir, I.B. Van den Veyver, M. Wan, C.Q. Tran, U. Francke, H.Y. Zoghbi // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 23. — P. 185–188.

9. Anastasiadis, P.Z. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer / P.Z. Anastasiadis, A.B. Reynolds, // *J. Cell Sci.* — 2000. — Vol 113. — P. 1319–1334.
10. Araki, Y. Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice / Y. Araki, K. Mukaisyo, H. Sugihara, Y. Fujiyama, T. Hattori // *Oncol. Rep.* — 2010. — Vol. 24. — P. 869–874.
11. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut / D. Artis // *Nat. Rev. Immunol.* — 2008. — Vol. 8. — P. 411–420.
12. Bali, P. Methylation, memory and addiction. *Epigenetics Off* / P. Bali, H.-I. Im, P.J. Kenny // *J. DNA Methylation Soc.* — 2011. — Vol. 6, — P. 671–674.
13. Balkwill, F. Inflammation and cancer: back to Virchow? / F. Balkwill, A. Mantovani // *Lancet.* — 2001. — Vol. 357. — P. 539–545.
14. Baubec, T. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family / T. Baubec, R. Ivánek, F. Lienert, D. Schübeler // *Cell.* — 2013. — Vol. 153. — P. 480–492.
15. Beaulieu, A.M. The BTB-ZF family of transcription factors: key regulators of lineage commitment and effector function development in the immune system / A.M. Beaulieu, D.B. Sant'Angelo // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* — 2011. — Vol. 187. — P. 2841–2847.
16. Belzung, C. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review / C. Belzung, G. Griebel // *Behav. Brain Res.* — 2001. — Vol. 125. — P. 141–149.
17. Berg, D.J. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses / D.J. Berg, N. Davidson, R. Kühn, W. Müller, S. Menon, G. Holland, L. Thompson-Snipes, M.W. Leach, D. Rennick // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98. — P. 1010–1020.

18. Bernstein, B.E. The mammalian epigenome / B.E. Bernstein, A. Meissner, E.S. Lander // *Cell*. — 2007. — Vol. 128 — P. 669–681.
19. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory / A. Bird // *Genes Dev*. — 2002. — Vol. 16. — P. 6–21.
20. Bird, A. Perceptions of epigenetics / A. Bird // *Nature* — 2007. — Vol. 447. — P. 396–398.
21. Bishop, J.B. Genetic toxicities of human teratogens / J.B. Bishop, K.L. Witt, R.A. Sloane // *Mutat. Res*. — 1997. — Vol. 396. — P. 9–43.
22. Björkholm, C. BDNF - a key transducer of antidepressant effects / C. Björkholm, L.M. Monteggia // *Neuropharmacology*. — 2015. — Vol. 102. — P 72–79.
23. Blattler, A. ZBTB33 binds unmethylated regions of the genome associated with actively expressed genes / A. Blattler, L. Yao, Y. Wang, Z. Ye, V.X. Jin, P.J. Farnham // *Epigenetics Chromatin*. — 2013. — V. 6 — P. 13.
24. Bloomston, M. Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials / M. Bloomston, E.E. Zervos, A.S. Rosemurgy // *Ann. Surg. Oncol*. — 2002. — Vol. 9 — P. 668–674.
25. Bogdanović, O. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function / O. Bogdanović, G.J.C. Veenstra // *Chromosoma*. — 2009. — Vol. 118. — P 549–565.
26. Braff, D.L. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies / D.L. Braff, M.A. Geyer // *Arch. Gen. Psychiatry*. — 1990. — Vol. 47. — P. 181–188.
27. Branco, M.R. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome / M.R. Branco, G. Ficz, W. Reik // *Nat. Rev. Genet*. — 2012 — Vol. 13. — P. 7–13.
28. Bredy, T.W. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear / T.W. Bredy, H. Wu, C.Crego, J. Zellhoefer, Y.E.Sun, M. Barad // *Learn. Mem. Cold Spring Harb*. — 2007. — Vol. 14. — 268–276.

29. Buaas, F.W. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal / F.W. Buaas, A.L.Kirsh, M. Sharma, D.J. McLean, J.L. Morris, M.D. Griswold, D.G. de Rooij, R.E. Braun // *Nat. Genet.* — 2004. — Vol. 36. — P. 647–652.
30. Buck-Koehntop, B.A. Molecular basis for recognition of methylated and specific DNA sequences by the zinc finger protein Kaiso / B.A. Buck-Koehntop, R.L. Stanfield, D.C.Ekiert, M.A. Martinez-Yamout, H.J. Dyson, I.A. Wilson, P.E. Wright // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2012. — Vol. 109 — P. 15229–15234.
31. Carbone, R. Recruitment of the histone methyltransferase SUV39H1 and its role in the oncogenic properties of the leukemia-associated PML-retinoic acid receptor fusion protein. / R. Carbone, O.A. Botrugno, S. Ronzoni, A. Insinga, L. Di Croce, P.G. Pelicci, S. Minucci // *Mol. Cell. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 1288–1296.
32. Chahrour, M. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription / M. Chahrour, S.Y. Jung, C. Shaw, X. Zhou, S.T.C. Wong, J. Qin, H.Y. Zoghbi // *Science.* — 2008. — Vol. 320. — P. 1224–1229.
33. Chang, Q. The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression / Q. Chang, G. Khare, V. Dani, S. Nelson, R. Jaenisch // *Neuron.* — 2006. — Vol. 49. — P. 341–348.
34. Chapman, D.L. Expression of proliferating cell nuclear antigen in the mouse germ line and surrounding somatic cells suggests both proliferation-dependent and -independent modes of function / D.L. Chapman, D.J. Wolgemuth // *Int. J. Dev. Biol.* — 1994. — Vol. 38. — P. 491–497.
35. Chaudhary, R. The POZ-ZF transcription factor Kaiso (ZBTB33) induces inflammation and progenitor cell differentiation in the murine intestine / R. Chaudhary, C.C. Pierre, K. Nanan, D. Wojtal, S. Morone, C. Pinelli, G.A. Wood, S. Robine, J.M. Daniel // *PloS One.* — 2013. — Vol. 5. — P. 8.
36. Cofre, J. Knock-down of Kaiso induces proliferation and blocks granulocytic differentiation in blast crisis of chronic myeloid leukemia / J. Cofre, J.R.L. Menezes, L. Pizzatti, E Abdelhay // *Cancer Cell Int.* — 2012. — Vol. 12. — P. 28.

37. Collins, A.L. Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice / A.L. Collins, J.M. Levenson, A.P. Vilaythong, R. Richman, D.L. Armstrong, J.L. Noebels, J. David Sweatt, H.Y. Zoghbi // *Hum. Mol. Genet.* — 2004. — Vol. 13. — P. 2679–2689.
38. Contractor, N.V. Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice / N.V. Contractor, H. Bassiri, T. Reya, A.Y. Park, D.C. Baumgart, M.A. Wasik, S.G. Emerson, S.R. Carding // *J. Immunol. Baltim. Md 1950 — 1998.* — Vol. 160 — P. 385–394.
39. Cook, P.C. A dominant role for the methyl-CpG-binding protein Mbd2 in controlling Th2 induction by dendritic cells / P.C. Cook, H. Owen, A.M. Deaton, J.G. Borger, S.L. Brown, T. Clouaire, G.-R. Jones, L.H. Jones, R.J. Lundie, A.K. Marley et al. // *Nat. Commun.* — 2015. — Vol. 6. — p. 6920.
40. Crawford, H.C. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors / H.C. Crawford, B.M. Fingleton, L.A. Rudolph-Owen, K.J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis, L.M. Matrisian // *Oncogene* — 1999. — Vol.18. — P. 2883–2891.
41. Crawley, J.N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice / J.N. Crawley // *Neuron.* — 2008. — Vol. 57. — P. 809–818.
42. Cryan, J.F. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice / J.F. Cryan, C. Mombereau // *Mol. Psychiatry.* — 2004. — Vol. 9. — P. 326–357.
43. Dai, S.-D. Cytoplasmic Kaiso is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer / S.-D. Dai, Y. Wang, Y. Miao, Y. Zhao, YZhang, G.-Y. Jiang, P.-X. Zhang, Z.-Q. Yang, E.-H. Wang // *BMC Cancer.* — 2009. — Vol. 9. — P. 178.
44. Dai, S.-D. Kaiso is expressed in lung cancer: its expression and localization is affected by p120ctn / S.-D. Dai, Y. Wang, G.-Y. Jiang, P.-X. Zhang, X.-J. Dong, Q. Wei, H.-T. Xu, Q.-C. Li, C. Zhao, E.-H. Wang // *Lung Cancer Amst. Neth.* — 2010. — Vol. 67. — P. 205–215.

45. Daniel, J.M. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso / J.M. Daniel // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2007. — Vol. 1773. — P. 59–68.
46. Daniel, J.M. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor / J.M. Daniel, A.B. Reynolds // *Mol. Cell. Biol.* — 1999. — Vol. 19. — P. 3614–3623.
47. Daniel, J.M. Monoclonal antibodies to Kaiso: a novel transcription factor and p120ctn-binding protein / J.M. Daniel, R.C. Ireton, A.B. Reynolds // *Hybridoma.* — 2001. — Vol. 20. — P. 159–166.
48. Daniel, J.M. The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides / J.M. Daniel, C.M. Spring, H.C. Crawford, A.B. Reynolds, A. Baig // *Nucleic Acids Res.* — 2002. — Vol. 30. — P. 2911–2919.
49. Davies, W. Imprinted gene expression in the brain / W. Davies, A.R. Isles, L.S. Wilkinson // *Neurosci. Biobehav. Rev.* — 2005. — Vol. 29. — P. 421–430.
50. Defossez, P.-A. Biological functions of methyl-CpG-binding proteins / P.-A. Defossez, I. Stancheva // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* — 2011. — Vol. 101. — P. 377–398.
51. Defossez, P.-A. The human enhancer blocker CTC-binding factor interacts with the transcription factor Kaiso / P.-A. Defossez, K.F. Kelly, G.J.P. Filion, R. Pérez-Torrado, F. Magdinier, H. Menoni, C.L. Nordgaard, J.M. Daniel, E. Gilson // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 43017–43023.
52. De La Rosa-Velázquez, I.A. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF / I.A. De La Rosa-Velázquez, H. Rincón-Arano, L. Benítez-Bribiesca, F. Recillas-Targa // *Cancer Res.* — 2007. — Vol. 67. — P. 2577–2585.
53. Della Ragione, F. The X-linked methyl binding protein gene Kaiso is highly expressed in brain but is not mutated in Rett syndrome patients / F. Della Ragione, A. Tiunova, M. Vacca, M. Strazzullo, E. González, J. Armstrong, R. Valero, C. Campanile, M. Pineda, M. Hulten et al. // *Gene.* — 2006. — Vol. 373. — P. 83–89.

54. Desruisseaux, M.S. Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA / M.S. Desruisseaux, M. Gulinello, D.N. Smith, S.C. Lee, M. Tsuji, L.M. Weiss, D.C. Spray, H.B. Tanowitz // *J. Infect. Dis.* — 2008. — Vol. 197. — P. 1621–1627.
55. D’Hooge, R. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory / R. D’Hooge, P.P. De Deyn // *Brain Res. Brain Res. Rev.* — 2001. — Vol. 36. — P. 60–90.
56. Donaldson, N.S. Kaiso represses the cell cycle gene cyclin D1 via sequence-specific and methyl-CpG-dependent mechanisms / N.S. Donaldson, C.C. Pierre, M.I. Anstey, S.C. Robinson, S.M. Weerawardane, J.M. Daniel // *PloS One.* — 2012. — Vol. 7. — P. 50–68.
57. Eaden, J.A. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis / J.A. Eaden, K.R. Abrams, J.F. Mayberry // *Gut.* — 2001. — Vol. 48. — P. 526–535.
58. Ehrlich, M. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells / M. Ehrlich, M.A. Gama-Sosa, L.H. Huang, R.M. Midgett, K.C. Kuo, R.A. McCune, C. Gehrke // *Nucleic Acids Res.* — 1982. — Vol. 10. — P. 2709–2721.
59. Engle, S.J. Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice / I. Ormsby, S. Pawlowski, G.P. Boivin, J. Croft, E. Balish, T. Doetschman, S.J. Engle // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 6362–6366. (2002).
60. Fan, G. DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling / G. Fan, K. Martinowich, M.H. Chin, F. He, S.D. Fouse, L. Hutnick, D. Hattori, W. Ge, Y. Shen, H. Wu et al. // *Dev. Camb. Engl.* — 2005. — Vol. 132. — P. 3345–3356.
61. Fatemi, M. MBD family proteins: reading the epigenetic code / M. Fatemi, P.A. Wade // *J. Cell Sci.* — 2006. — Vol. 119. — P. 3033–3037.

62. Feng, J. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system / J. Feng, H. Chang, E. Li, G. Fan // *J. Neurosci. Res.* — 2005. — Vol. 79. — P. 734–746.
63. Ferrero-Miliani, L. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation / L. Ferrero-Miliani, O.H. Nielsen, P.S. Andersen, S.E. Girardin // *Clin. Exp. Immunol.* — 2007. — Vol. 147. — P. 227–235.
64. Filion, G.J.P. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription / G.J.P. Filion, S. Zhenilo, S. Salozhin, D. Yamada, E. Prokhortchouk, P.-A. Defossez // *Mol. Cell. Biol.* — 2006. — Vol. 26. — P. 169–181.
65. Fiorentino, F.P. The tumor suppressor role of CTCF / F.P. Fiorentino, A. Giordano // *J. Cell. Physiol.* — 2012. — Vol. 227. — P. 479–492.
66. Fodde, R. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer / R. Fodde, R. Smits, H.Clevers // *Nat. Rev. Cancer* — 2001. — Vol.1. — P. 55–67.
67. Fraga, M.F. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins / M.F. Fraga, E. Ballestar, M.F. Paz, S. Ropero, F. Setien, M.L. Ballestar, D. Heine-Suñer, J.C. Cigudosa, M. Urioste, J. Benitez // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2005. — Vol. 102. — P. 10604–10609.
68. Fujita, S. The discovery of the matrix cell, the identification of the multipotent neural stem cell and the development of the central nervous system / S. Fujita // *Cell Struct. Funct.* — 2003. — Vol. 28. — P. 205–228.
69. Gersemann, M. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases / M. Gersemann, E.F. Stange, J. Wehkamp // *World J. Gastroenterol.* — 2011. — Vol. 17. — P. 3198–3203.
70. Geyer, M.A. Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia / M.A. Geyer, N.R. Swerdlow, R.S. Mansbach, D.L.Braff // *Brain Res. Bull.* — 1990. — Vol. 25. — P. 485–498.
71. Gonzalo, S. Role of Rb family in the epigenetic definition of chromatin / S. Gonzalo, M.A. Blasco // *Cell Cycle Georget.* — 2005. — Vol 4. — P. 752–755.

72. Gowher, H. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites / H. Gowher, A. Jeltsch // *J. Mol. Biol.* — 2001. — Vol. 309. — P. 1201–1208.
73. Grady, W.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis / W.M. Grady, J.M. Carethers // *Gastroenterology.* — 2008. — Vol. 135. — P. 1079–1099.
74. Grisham, M.B. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species / M.B. Grisham, C. Volkmer, P. Tso, T. Yamada // *Gastroenterology.* — 1991. — Vol. 101. — P. 540–547.
75. Grivennikov, S.I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia / S.I. Grivennikov // *Semin. Immunopathol.* — 2013. — Vol. 35. — P. 229–244.
76. Gu, T.-P. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes / T.-P. Gu, F. Guo, H. Yang, H.-P. Wu, G.-F. Xu, W. Liu, Z.-G. Xie, L. Shi, X. He, S. Jin et al. // *Nature.* — 2011. — Vol. 477. — P. 606–610.
77. Haffner, M.C. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers / M.C. Haffner, A. Chaux, A.K. Meeker, D.M. Esopi, J. Gerber, L.G. Pellakuru, A. Toubaji, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, W.G. Nelson et al. // *Oncotarget.* — 2011. — Vol. 2. — P. 627–637.
78. Haines, T.R. Allele-specific non-CpG methylation of the *Nf1* gene during early mouse development / T.R. Haines, D.I. Rodenhiser, P.J. Ainsworth // *Dev. Biol.* — 2001. — Vol. 240. — P. 585–598.
79. Han, G. The pro-inflammatory role of TGF β 1: a paradox? / G. Han, F. Li, T.P. Singh, P. Wolf, X.-J. Wang // *Int. J. Biol. Sci.* — 2012. — Vol. 8. — P. 228–235.
80. Hashimoto, H. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res.* — 2012. — Vol. 40. — P. 4841–4849.

81. Hawkins, J.V. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats / J.V. Hawkins, E.L. Emmel, J.J. Feuer, M.A. Nedelman, C.J. Harvey, H.J. Klein, H. Rozmiarek, A.R. Kennedy, G.R. Lichtenstein, P.C. Billings // *Dig. Dis. Sci.* — 1997. — Vol. 42. — P. 1969–1980.
82. Heard, E. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms / E. Heard, R.A. Martienssen // *Cell.* — 2014. — Vol. 157. — P. 95–109.
83. Heller, F. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells / F. Heller, I.J. Fuss, E.E. Nieuwenhuis, R.S. Blumberg, W. Strober // *Immunity.* — 2002. — Vol 17. — P. 629–638.
84. Hendrich, B. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals / B. Hendrich, S. Tweedie // *Trends Genet.* — 2003. — Vol. 19. — P. 269–277.
85. Hendrich, B. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development / B. Hendrich, J. Guy, B. Ramsahoye, V.A. Wilson, A. Bird // *Genes Dev.* — 2001. — Vol. 15. — P. 710–723.
86. van Hengel, J. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression / J. van Hengel, P. Vanhoenacker, K. Staes, F. van Roy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1999. — Vol. 96. — P. 7980–7985.
87. Hibi, T. Animal models of inflammatory bowel disease / T. Hibi, H. Ogata, A. Sakuraba // *J. Gastroenterol.* — 2002. — Vol. 37. — P. 409–417.
88. Hollister, K. Insights into the role of Bcl6 in follicular Th cells using a new conditional mutant mouse model / K. Hollister, S. Kusam, H. Wu, N. Clegg, A. Mondal, D.V. Sawant, A.L. Dent // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* — 2013. — Vol. 191. — P. 3705–3711.
89. Huang, T.-C. Effect of *Arctium lappa* L. in the dextran sulfate sodium colitis mouse model / T.-C. Huang, S.-S. Tsai, L.-F. Liu, Y.L. Liu, H.-J. Liu, K.P. Chuang // *World J. Gastroenterol.* — 2010. — Vol. 16. — P. 4193–4199.

90. Huleihel, M. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors / M. Huleihel, E. Lunenfeld // *Asian J. Androl.* — 2004. — Vol. 6. — P. 259–268.
91. Hung, M.S. Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases / M.S. Hung, N. Karthikeyan, B. Huang, H.C. Koo, J. Kiger, C.J. Shen // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1999. — Vol. 96. — P. 11940–11945.
92. Iioka, H. Kaiso is a bimodal modulator for Wnt/beta-catenin signaling / H. Iioka, S.K. Doerner, K. Tamai // *FEBS Lett.* — 2009. — Vol. 583. — P. 627–632.
93. Ireton, R.C. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function / R.C. Ireton, M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy et al. // *J. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 159. — P. 465–476.
94. Isalan, M. Comprehensive DNA recognition through concerted interactions from adjacent zinc fingers / M. Isalan, A. Klug, Y. Choo // *Biochemistry (Mosc.)*. — 1998. — Vol. 37. — P. 12026–12033.
95. Ishioka, T. Induction of colorectal tumors in rats by sulfated polysaccharides / T. Ishioka, N. Kuwabara, Y. Oohashi, K. Wakabayashi // *Crit. Rev. Toxicol.* — 1987. — Vol. 17. — P. 215–244.
96. Ito, S. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification / S. Ito, A.C. D'Alessio, O. V Taranova, K. Hong, L.C. Sowers, Y. Zhang // *Nature*. — 2010. — Vol. 466. — P. 1129–1133.
97. Jiang, G. P120-catenin isoforms 1 and 3 regulate proliferation and cell cycle of lung cancer cells via β -catenin and Kaiso respectively / G. Jiang, Y. Wang, S. Dai, Y. Liu, M. Stoecker, E. Wang, E. Wang // *PloS One*. — 2012. — Vol. 7. — P. 30–43.
98. Jobin, C. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection / C. Jobin, R.B. Sartor // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* — 2000. — Vol. 278. — P.451–462.
99. Jones, P.A. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics / P.A. Jones, D. Takai // *Science*. — 2001. — Vol. 293. — P. 1068–1070.

100. Jurkowska, R.Z. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases / R.Z. Jurkowska, T.P. Jurkowski, A. Jeltsch // *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* — 2011. — Vol. 12 — P. 206–222.
101. Kareta, M.S. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L / M.S. Kareta, Z.M. Botello, J.J. Ennis, C. Chou, F. Chédin // *J. Biol. Chem.* — 2006 — Vol. 281. — P. 25893–25902.
102. Karin, M. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression / M. Karin, F.R. Greten // *Nat. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 5. — P. 749–759.
103. Kelly, K.F. Nuclear import of the BTB/POZ transcriptional regulator Kaiso/ K.F. Kelly, A.A. Otchere, M. Graham, J.M. Daniel // *J. Cell Sci.* — 2004. — Vol. 117. — P. 6143–6152.
104. Kim, J.J. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD / J.J. Kim, M.S. Shajib, M.M. Manocha, W.I. Khan // *J. Vis. Exp. JoVE.*
105. Kim, S.W. Isolation and characterization of XKaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120(ctn) in *Xenopus laevis* / S.W. Kim, X. Fang, H. Ji, A.F. Paulson, J.M. Daniel, M. Ciesiolka, F. van Roy, P.D. McCrea // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277. — P. 8202–8208.
106. Kim, S.W. Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin / S.W. Kim, J.-I. Park, C.M. Spring, A.K. Sater, H. Ji, A.A. Otchere, J.M. Daniel, P.D. McCrea // *Nat. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 6. — P. 1212–1220.
107. Klose, R.J. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators / R.J. Klose, A.P. Bird // *Trends Biochem. Sci.* — 2006. — Vol. 31. — P. 89–97.
108. Koh, D.-I. KAISO, a critical regulator of p53-mediated transcription of CDKN1A and apoptotic genes / D.-I. Koh, D. Han, H. Ryu, W.-I. Choi, B.-N. Jeon, M.-K. Kim, Y. Kim, J.Y. Kim, L. Parry, A.R. Clarke et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2014. — Vol. 111. — P. 15078–15083.
109. Koh, D.-I. Transcriptional activation of APAF1 by KAISO (ZBTB33) and p53 is attenuated by RelA/p65 / D.-I. Koh, H. An, M.-Y. Kim, B.-N. Jeon, S.-H. Choi,

- S.S. Hur, M.-W. Hur // *Biochim. Biophys. Acta* — 2015. — Vol.1849. — P. 1170–1178.
110. Komai, Y. Bmi1 expression in long-term germ stem cells / Y. Komai, T. Tanaka, Y. Tokuyama, H. Yanai, S. Ohe, T. Omachi, N. Atsumi, N. Yoshida, K. Kumano, H. Hisha // *Sci. Rep.* — 2014. — Vol. 4. — P. 6175.
111. Kongara, S. Autophagy regulates keratin 8 homeostasis in mammary epithelial cells and in breast tumors / S. Kongara, O. Kravchuk, I. Teplova, F. Lozy, J. Schulte, D. Moore, N. Barnard, C.A. Neumann, E. White, V. Karantza // *Mol. Cancer Res.* — 2010. — Vol. 8. — P. 873–884.
112. Kraus, S. Inflammation and colorectal cancer / S. Kraus, N. Arber // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 405–410.
113. Kriaucionis, S. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain / S. Kriaucionis, N. Heintz // *Science.* — 2009. — Vol. 324. — P. 929–930.
114. Kubota, H. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells / H., Kubota, M.R., Avarbock, R.L. Brinster // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2003. — Vol. 100. — P. 6487–6492.
115. Kulikov, A.V. Automated measurement of spatial preference in the open field test with transmitted lighting / A.V. Kulikov, M.A. Tikhonova, V.A. Kulikov // *J. Neurosci. Methods* — 2008. — Vol. 170. — P. 345–351.
116. Kulikov, A.V. Automated analysis of antidepressants' effect in the forced swim test / A.V. Kulikov, M.V. Morozova, V.A. Kulikov, V.S. Kirichuk, N.K. Popova // *J. Neurosci.* — 2010. — Vol. 191. — P. 26–31.
117. Laroui, H. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon / H. Laroui, S.A. Ingersoll, H.C. Liu, M.T. Baker, S. Ayyadurai, M.A. Charania, F. Laroui, Y. Yan, S.V. Sitaraman, D. Merlin // *PloS One.* — 2012. — Vol. 7. — P. 32-47.
118. Leeb, M. Establishment of epigenetic patterns in development / M. Leeb, A. Wutz // *Chromosoma.* — 2012. — Vol. 121. — P. 251–262.

119. Leoncini, S. Cytokine Dysregulation in MECP2- and CDKL5-Related Rett Syndrome: Relationships with Aberrant Redox Homeostasis, Inflammation, and ω -3 PUFAs. *Oxid / S. Leoncini, C. De Felice, C. Signorini, G. Zollo, A. Cortelazzo, T. Durand, J.-M. Galano, R. Guerranti, M. Rossi, L. Ciccoli et al. // Med. Cell. Longev.* — 2015.
120. Li, C. MeCP2 enforces Foxp3 expression to promote regulatory T cells' resilience to inflammation / C. Li, S. Jiang, S.-Q. Liu, E. Lykken, L. Zhao, J. Sevilla, B. Zhu, Q.-J. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2014. — Vol. 11. — P. 2807–2816.
121. Lopes, E.C. Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines / E.C. Lopes, E. Valls, M.E. Figueroa, A. Mazur, F.-G. Meng, G. Chiosis, P.W. Laird, N. Schreiber-Agus, J.M. Greally, E. Prokhortchouk et al. // *Cancer Res.* — 2008 — Vol. 68. — P. 7258–7263.
122. Lubin, F.D. Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory / F.D. Lubin, T.L. Roth, J.D. Sweatt // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* — 2008. — Vol. 28. — P.10576–10586.
123. Lucki, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin / I. Lucki // *Biol. Psychiatry.* — 1998. — Vol. 44. — P. 151–162.
124. Maloy, K.J. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease / K.J. Maloy, F. Powrie // *Nature.* — 2011. — Vol. 474. — P. 298–306.
125. Marhold, J. The Drosophila MBD2/3 protein mediates interactions between the MI-2 chromatin complex and CpT/A-methylated DNA / J. Marhold, K. Kramer, E. Kremmer, F. Lyko // *Dev. Camb. Engl.* — 2004. — Vol. 131. — P. 6033–6039.
126. Martín Caballero, I. The methyl-CpG binding proteins Mecp2, Mbd2 and Kaiso are dispensable for mouse embryogenesis, but play a redundant function in neural differentiation / I. Martín Caballero, J. Hansen, D. Leaford, S. Pollard, B.D. Hendrich // *PloS One.* — 2009. — Vol. 4. — P.43-55.

127. McEwen, B.S. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress / B.S. McEwen, L. Eiland, R.G. Hunter, M.M. Miller // *Neuropharmacology*. — 2012. — Vol. 62. — P 3–12.
128. McGarvey, K.M. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state / K.M. McGarvey, J.A. Fahrner, E. Greene, J. Martens, T. Jenuwein, S.B. Baylin // *Cancer Res*. — 2006. — Vol. 66. — P. 3541–3549.
129. Meira, L.B. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice / L.B. Meira, J.M. Bugni, S.L. Green, C.-W. Lee, B. Pang, D. Borenshtein, B.H. Rickman, A.B. Rogers, C.A. Moroski-Erkul, J.L. McFaline et al. // *J. Clin. Invest*. — 2008. — Vol. 118. — P. 2516–2525.
130. Milner, L.C. Three murine anxiety models: results from multiple inbred strain comparisons / L.C. Milner, J.C. Crabbe // *Genes Brain Behav*. — 2008. — Vol. 7. — P. 496–505.
131. Minks, J. A skewed view of X chromosome inactivation / J. Minks, W.P. Robinson, C.J. Brown // *J. Clin. Invest*. — 2008. — Vol. 118. — P. 20–23.
132. Moldoveanu, A.C. Cytokines in inflammatory bowel disease / A.C. Moldoveanu, M. Diculescuand, C.F. Braticevici // *Romanian J. Intern. Med. Rev. Roum. Médecine Interne*. — 2015. — Vol. 53. — P. 118–127.
133. Nakao, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin / M. Nakao // *Gene*. — 2001. — Vol. 278. — P. 25–31.
134. Nan, X. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2 / X. Nan, R.R. Meehan, A. Bird // *Nucleic Acids Res*. — 1993. — Vol. 21. — P. 4886–4892.
135. Nan, X. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex / X. Nan, H.H. Ng, C.A. Johnson, C.D. Laherty, B.M. Turner, R.N. Eisenman, A. Bird // *Nature* — 1998. — Vol. 393. — P. 386–389.
136. Nieminen. Inflammation and disease duration have a cumulative effect on the risk of dysplasia and carcinoma in IBD: a case-control observational study based on

- registry data / U. Nieminen, A. Jussila, S. Nordling, H. Mustonen, M.A. Färkkilä // *Int. J. Cancer.* — 2014. — Vol. 134. — P. 189–196.
137. Ogden, S.R. p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7 / S.R. Ogden, L.E. Wroblewski, C. Weydig, J. Romero-Gallo, D.P. O'Brien, D.A. Israel, U.S. Krishna, B. Fingleton, A.B. Reynolds, S. Wessler et al. // *Mol. Biol. Cell* — 2008. — Vol. 19. — P. 4110–4121.
138. Ohki, I. Solution Structure of the Methyl-CpG Binding Domain of Human MBD1 in Complex with Methylated DNA / I. Ohki, N. Shimotake, N. Fujita, J.-G. Jee, T. Ikegami, M. Nakao, M. Shirakawa // *Cell.* — 2001. — Vol. 105. — P. 487–497.
139. Okano, M. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber, E. Li // *Cell.* — 1999. — Vol. 99. — P. 247–257.
140. Panayotis, N. Morphological and functional alterations in the substantia nigra pars compacta of the *Mecp2*-null mouse / N. Panayotis, M. Pratte, A. Borges-Correia, A. Ghata, L. Villard, J.-C. Roux // *Neurobiol. Dis.* — 2011. — Vol. 41. — P. 385–397.
141. Park, J.-I. Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets / J.-I. Park, S.W. Kim, J.P. Lyons, H. Ji, T.T. Nguyen, K. Cho, M.C. Barton, T. Deroo, K. Vleminckx, R.T. Moon et al. // *Dev. Cell.* — 2005. — Vol. 8. — P. 843–854.
142. Pellow, S. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley // *J. Neurosci.* — 1985. — Vol. 14. — P. 149–167.
143. Pierre, C.C. Kaiso overexpression promotes intestinal inflammation and potentiates intestinal tumorigenesis in *Apc* (*Min/+*) mice / C.C. Pierre, J. Longo, M. Mavor, S.B. Milosavljevic, R. Chaudhary, E. Gilbreath, C. Yates, J.M. Daniel // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2015. — Vol. 852. — № 9. — 1846-55.
144. Plass, C. DNA methylation, imprinting and cancer / C. Plass, P.D. Soloway // *Eur. J. Hum. Genet.* — 2002. — Vol. 10. — P. 6–16.

145. Popova, N.K. Serotonin transporter, 5-HT1A receptor, and behavior in DBA/2J mice in comparison with four inbred mouse strains / N.K. Popova, V.S. Naumenko, M.A. Tibeikina, A.V. Kulikov // *J. Neurosci. Res.* — 2009. — Vol. 87. — P. 3649–3657.
146. Poritz, L.S. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis / L.S. Poritz, K.I. Garver, C. Green, L. Fitzpatrick, F. Ruggiero, W.A. Koltun // *J. Surg. Res.* — 2007. — Vol. 140. — P. 12–19.
147. Porsolt, R.D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments / R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre // *Nature.* — 1977. — Vol. 266. — P. 730–732.
148. Prokhortchouk, E. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? / E. Prokhortchouk, B. Hendrich // *Oncogene.* — 2002. — Vol. 21. — P. 5394–5399.
149. Prokhortchouk, A. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor / A. Prokhortchouk, B. Hendrich, H. Jorgensen, A. Ruzov, M. Wilm, G. Georgiev, A. Bird, E. Prokhortchouk // *Genes Dev.* — 2001. — Vol. 15. — P. 1613–1618.
150. Prokhortchouk, A. Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer / A. Prokhortchouk, O. Sansom, J. Selfridge, I.M. Caballero, S. Salozhin, D. Aithozhina, L. Cerchietti, F.G. Meng, L.H. Augenlicht, J.M. Mariadason // *Mol. Cell. Biol.* — 2006 — Vol. 26 — P. 199–208.
151. Prut, L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review / L. Prut, C. Belzung // *Eur. J. Pharmacol.* — 2003. — Vol. 463 — P. 3–33.
152. Qin, S. Kaiso mainly locates in the nucleus in vivo and binds to methylated, but not hydroxymethylated DNA / S. Qin, B. Zhang, W. Tian, L. Gu, Z. Lu, D. Deng, // *Chin. J. Cancer Res. Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu.* — 2016. — Vol. 27. — P. 148–155.
153. Quante, M. Inflammation and stem cells in gastrointestinal carcinogenesis / M. Quante, T.C. Wang // *I Physiol. Bethesda.* — 2008. — Vol. 23. — P. 350–359.

154. Quante, M., The gastrointestinal tumor microenvironment / M. Quante, J. Varga, T.C. Wang, F.R. Greten // *Gastroenterology*. — 2013. — Vol.145. — P. 63–78.
155. Ravi, B. Epigenetics in the nervous system: An overview of its essential role / B. Ravi, M. Kannan // *Indian J. Hum. Genet.* — 2013 — Vol.19. — P. 384–391.
156. Reynolds, A.B. Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cat associates with E-cadherin complexes / A.B. Reynolds, J. Daniel, P.D. McCrea, M.J. Wheelock, J. Wu, Z. Zhang // *Mol. Cell. Biol.* — 1993. — Vol.14. — P. 8333–8342.
157. Robertson, K.D. DNA methylation in health and disease / K.D. Robertson, A.P. Wolffe // *DNA methylation in health and disease*. — *Nat. Rev. Genet.* — 2000. — Vol.1. — P.11–19.
158. Rodova, M. Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin / M. Rodova, K.F. Kelly, M. VanSaun, J.M. Daniel, M.J. Werle // *Mol. Cell. Biol.* — 2004. — Vol.24. — P. 7188–7196.
159. de Rooij, D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells / D.G. de Rooij // *Reprod. Camb. Engl.* — 2001. — Vol.121. — P. 347–354.
160. Roth, T.L. Epigenetics of neurobiology and behavior during development and adulthood / T.L. Roth // *Dev. Psychobiol.* — 2012. — Vol.54. — P. 590–597.
161. Roux, J.-C. Biogenic amines in Rett syndrome: the usual suspects / J.-C. Roux, L. Villard // *Behav. Genet.* — 2010. — Vol. 40. — P. 59–75.
162. Roux, J.-C. Progressive noradrenergic deficits in the locus coeruleus of Mecp2 deficient mice / J.-C. Roux, N. Panayotis, E. Dura, L. Villard // *Neurosci. Res.* — 2010. — Vol. 88. — P. 1500–1509.
163. van Roy, F.M. A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? / F.M. van Roy, P.D. McCrea // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — Vol. 5. — P. 956–964.
164. Roza, S.J. Cerebral ventricular volume and temperamental difficulties in infancy / S.J. Roza, P.P. Govaert, M.H. Lequin, V.W.V. Jaddoe, H.A. Moll, E.A.P. Steegers, A. Hofman, F.C. Verhulst H. Tiemeier // *The Generation R Study. J. Psychiatry Neurosci.* — 2008. — Vol. 33. — P. 431–439.

165. Ruzov, A. Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development / A. Ruzov, D.S. Dunican, A. Prokhortchouk, S. Pennings, I. Stancheva, E. Prokhortchouk, R.R. Meehan // *Dev. Camb. Engl.* — 2004. — Vol. 131. — P.6145–6194.
166. Ruzov, A. The interaction of xKaiso with xTcf3: a revised model for integration of epigenetic and Wnt signalling pathways / A. Ruzov, J.A. Hackett, A. Prokhortchouk, J.P. Reddington, M.J. Madej, D.S. Dunican, E. Prokhortchouk, S. Pennings, R.R. Meehan // *Dev. Camb. Engl.* — 2009a. — Vol. 136. — P. 723–727.
167. Ruzov, A. The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early *Xenopus laevis* development / A. Ruzov, E. Savitskaya, J.A. Hackett, J.P. Reddington, A. Prokhortchouk, M.J. Madej, N. Chekanov, M. Li, D.S. Dunican, E. Prokhortchouk // *Dev. Camb. Engl.* — 2009. — Vol.136 — P. 729–738.
168. Saba, I. IL-7R-dependent survival and differentiation of early T-lineage progenitors is regulated by the BTB/POZ domain transcription factor Miz-1 / I. Saba, C. Kosan, L. Vassen, T. Möröy // *Blood.* — 2011. — Vol.117. — P. 3370–3381.
169. Sadler, A.J. BTB-ZF transcriptional regulator PLZF modifies chromatin to restrain inflammatory signaling programs / A.J. Sadler, F.J. Rossello, L. Yu, J.A. Deane, X. Yuan, D. Wang, A.T. Irving, M. Kaparakis-Liaskos, M.P. Gantier, H. Ying // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2015. — Vol.112. — P. 1535–1540.
170. Salcedo, R. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18 / R. Salcedo, A. Worschech, M. Cardone, Y. Jones, Z. Gyulai, R.-M. Dai, E. Wang, W. Ma, D. Haines, C. O'hUigin // *J. Exp. Med.* — 2010. — Vol. 207. — P. 1625–1636.
171. Sanjabi, S. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity / S. Sanjabi, L.A. Zenewicz, M. Kamanaka, R.A. Flavell // *Curr. Opin. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 9. — P. 447–453.
172. Sawant, D.V. Bcl6 controls the Th2 inflammatory activity of regulatory T cells by repressing Gata3 function / D.V. Sawant, S. Sehra, E.T. Nguyen, R. Jadhav,

- K. Englert, R. Shinnakasu, G. Hango, H.E. Broxmeyer, T. Nakayama, N.B. Perumal et al. // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 — 2012. — V. 189. — P. 4759–4769.
173. Sellon, R.K. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice / R.K. Sellon, S. Tonkonogy, M. Schultz, L.A. Dieleman, W. Grenther, E. Balish, D.M. Rennick, R.B. Sartor // *Infect. Immun.* — 1998. — Vol. 66. — P. 5224–5231.
174. Setoguchi, H. Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons / H. Setoguchi, M. Namihira, J. Kohyama, H. Asano, T. Sanosaka, K. Nakashima // *J. Neurosci. Res.* — 2006. — Vol. 84. — P. 969–979.
175. Shichijo, K. Expression of apoptotic epithelial cells within lamina propria beneath the basement membrane triggers dextran sulfate sodium-induced colitis / K. Shichijo, M. Ihara, M.S. Razzaque, M. Matsuo-Matsuyama, T. Nakayama, M. Nakashima, I. Sekine // *Dig. Dis. Sci.* — 2008. — Vol. 53. — P. 2443–2451.
176. Sohn, K.J. Molecular genetics of ulcerative colitis-associated colon cancer in the interleukin 2- and beta (2)-microglobulin-deficient mouse / K.J. Sohn, S.A. Shah, S. Reid, M. Choi, J. Carrier, M. Comiskey, C. Terhorst, Y.I. Kim // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — P. 6912–6917.
177. Solovei, I. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution / I. Solovei, M. Kreysing, C. Lanctôt, S. Kösem, L. Peichl, T. Cremer, J. Guck, B. Joffe // *Cell.* — Vol. 137. — P. 356–368.
178. Song, C.-X. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine / C.-X. Song, K.E. Szulwach, Y. Fu, Q. Dai, C. Yi, X. Li, Y. Li, C.-H. Chen, W. Zhang, X. Jian et al. // *Nat. Biotechnol.* — 2011. — Vol. 29. — P. 68–72.
179. Soubry, A. Expression and nuclear location of the transcriptional repressor Kaiso is regulated by the tumor microenvironment / A. Soubry, J. van Hengel, E. Parthoens, C. Colpaert, E. Van Marck, D. Waltregny, A.B. Reynolds, F. van Roy // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 2224–2233.

180. Soubry, A. The transcriptional repressor Kaiso localizes at the mitotic spindle and is a constituent of the pericentriolar material / A. Soubry, K. Staes, E. Parthoens, S. Noppen, C. Stove, P. Bogaert, J. van Hengel, F. van Roy // *PloS One*. — 2010. — Vol. 5. — № 2. — P. 9203- 9225.
181. Spring, C.M. The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin / C.M. Spring, K.F. Kelly, I. O’Kelly, M. Graham, H.C. Crawford, J.M. Daniel // *Exp. Cell Res.* — 2005. — Vol.305. — P. 253–265.
182. Spruijt, C.G. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives / C.G. Spruijt, F. Gnerlich, A.H. Smits, T. Pfaffeneder, P.W.T.C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan // *Cell*. — 2013. — Vol. 152. — P.1146–1159.
183. Stanford, S.C. The Open Field Test: reinventing the wheel / S.C. Stanford // *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* — 2007. — Vol. 21. — P. 134–135.
184. Strahl, B.D. The language of covalent histone modifications / B.D. Strahl, C.D. Allis // *Nature*. — 2000. — Vol. 403. — P. 41–45.
185. Swerdlow, N.R. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients / N.R. Swerdlow, D.L. Braff, N. Taaid, M.A. Geyer // *Arch. Gen. Psychiatry*. — 1994. — Vol. 51. — P. 139–154.
186. Takizawa, T. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain / T. Takizawa, K. Nakashima, M. Namihira, W. Ochiai, A. Uemura, M. Yanagisawa, N. Fujita, M. Nakao, T. Taga // *Dev. Cell*. — 2001. — Vol. 1. — P. 749–758.
187. Tariq, M. DNA and histone methylation in plants / M. Tariq, J. Paszkowski // *Trends Genet.* — 2004. — Vol. 20. — P. 244–251.
188. Tikhonova, M.A. Hereditary catalepsy in mice is associated with the brain dysmorphology and altered stress response / M.A. Tikhonova, A.V. Kulikov, D.V. Bazovkina, E.A. Kulikova, A.S. Tsybko, E.Y. Bazhenova, V.S. Naumenko, A.E. Akulov, M.P. Moshkin, N.K. Popova // *Behav. Brain Res.* — 2013. — Vol. 243. — P. 53–60.

189. Tilg, H. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55 / H. Tilg, E. Trehu, M.B. Atkins, C.A. Dinarello, J.W. Mier // *Blood*. — Vol. 83. — P. 113–118.
190. Trempus, C.S. CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice / C.S. Trempus, R.J. Morris, M. Ehinger, A. Elmore, C.D. Bortner, M. Ito, G. Cotsarelis, J.G.W. Nijhof, J. Peckham, N. Flagler et al. // *Cancer Res*. — 2007. — Vol. 67 — P. 4173–4181.
191. Tropea, D. Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice / D. Tropea, E. Giacometti, N.R. Wilson, C. Beard, C. McCurry, D.D. Fu, R. Flannery, R. Jaenisch, M. Sur // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2009. — Vol. 106. — P. 2029–2034.
192. Tycko, B. Epigenetic gene silencing in cancer / B. Tycko // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 105. — P. 401–407.
193. Ullman, T.A. Intestinal inflammation and cancer / T.A. Ullman, S.H. Itzkowitz // *Gastroenterology*. — 2011. — Vol. 140. — P. 1807–1816.
194. Velcich, A. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2 / A. Velcich, W. Yang, J. Heyer, A. Fragale, C. Nicholas, S. Viani, R. Kucherlapati, M. Lipkin, K. Yang, L. Augenlicht // *Science*. — 2002. — Vol. 295. — P. 1726–1729.
195. Vermeulen, J.F. Nuclear Kaiso expression is associated with high grade and triple-negative invasive breast cancer / J.F. Vermeulen, R.A.H. van de Ven, C. Ercan, P. van der Groep, E. van der Wall, P. Bult, M. Christgen, U. Lehmann, J. Daniel, P.J. van Diest et al. // *PloS One*. — 2012. — Vol.7. — № 5. — P. 3786 - 3802.
196. Viemari, J.-C. Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice / J.-C. Viemari, J.-C. Roux, A.K. Tryba, V. Saywell, H. Burnet, F. Peña, S. Zanella, M. Bévangut, M. Barthelemy-Requin, L.B.K. Herzing et al. // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* — 2005. — Vol. 25. — P. 11521–11530.

197. Wang, Y. Expression of P120 catenin, Kaiso, and metastasis tumor antigen-2 in thymomas / Y. Wang, L. Li, Q. Li, C. Xie, E. Wang, E. Wang // *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* — 2012. — Vol. 33. — P. 1871–1879.
198. Watanabe, A. Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier / A. Watanabe, Y. Yamada, S. Yamanaka // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 2013. — Vol. 368. — P. 2012–2032.
199. Weaver, I.C.G. Epigenetic programming by maternal behavior / I.C.G. Weaver, N. Cervoni, F.A. Champagne, A.C. D'Alessio, S. Sharma, J.R. Seckl, S. Dymov, M. Szyf, M.J. Meaney // *Nat. Neurosci.* — 2004. — Vol. 7. — P. 847–854.
200. Weaver, I.C.G. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life / I.C.G. Weaver, F.A. Champagne, S.E. Brown, S. Dymov, S. Sharma, M.J. Meaney, M. Szyf // *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* — 2005. — Vol. 25. — P. 11045–11054.
201. Weaver, I.C.G. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood / I.C.G. Weaver, M.J. Meaney, M. Szyf // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2003. — Vol. 103. — P. 3480–3485.
202. Willner, P. Animal models of depression: an overview / P. Willner // *Pharmacol. Ther.* — 1990. — Vol. 45. — P. 425–455.
203. Willner, P. The validity of animal models of predisposition to depression / P. Willner, P.J. Mitchell // *Behav. Pharmacol.* — 2002. — Vol. 13. — P. 169–188.
204. Wolgemuth, D.J. Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line / D.J. Wolgemuth, E. Laurion, K.M. Lele // *Recent Prog. Horm. Res.* — 2002. — Vol. 57. — P. 75–101.
205. Wright, I.C. Meta-Analysis of Regional Brain Volumes in Schizophrenia / I.C. Wright, S. Rabe-Hesketh, P.W.R. Woodruff, A.S. David, R.M. Murray, E.T. Bullmore // *Am. J. Psychiatry.* — 2000. — Vol. 157. — P. 16–25.

206. Wu C. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence / C. Wu, J.R. Morris // *Science*. — 2001. — Vol. 293. — P. 1103–1105.
207. Xu, J. Up-regulation of MBD1 promotes pancreatic cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin / J. Xu, W. Zhu, W. Xu, W. Yao, B. Zhang, Y. Xu, S. Ji, C. Liu, J. Long, Q. Ni et al. // *Curr. Mol. Med.* — 2013. — Vol.13. — P. 387–400.
208. Yamada, Y. A comparative analysis of two models of colitis in rats / Y. Yamada, S. Marshall, R.D. Specian, M.B. Grisham // *Gastroenterology*. — 1992. — Vol. 102. — P. 1524–1534.
209. Yoder, J.A. DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe / J.A. Yoder, N.S. Soman, G.L. Verdine, T.H. Bestor // *J. Mol. Biol.* — 1997. — Vol. 270. — P. 385–395.
210. Yoon, H.-G. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso / H.-G. Yoon, D.W. Chan, A.B. Reynolds, J. Qin, J. Wong, // *Mol. Cell*. — 2003 — Vol. 12. — P. 723–734.
211. Zhang, H. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine / H. Zhang, X. Zhang, E. Clark, M. Mulcahey, S. Huang, Y.G. Shi // *Cell Res*. — 2010. — Vol. 20. — P. 1390–1393.
212. Zhang, J. S phase-dependent interaction with DNMT1 dictates the role of UHRF1 but not UHRF2 in DNA methylation maintenance / J. Zhang, Q. Gao, P. Li, X. Liu, Y. Jia, W. Wu, J. Li, S. Dong, H. Koseki, J. Wong, // *Cell Res*. — 2011a. — Vol. 21. — P. 1723–1739.
213. Zhang, P.-X. p120-catenin isoform 3 regulates subcellular localization of Kaiso and promotes invasion in lung cancer cells via a phosphorylation-dependent mechanism / P.-X. Zhang, Y. Wang, Y. Liu, G.-Y. Jiang, Q.-C. Li, E.-H. Wang // *Int. J. Oncol.* — 2011b. — Vol. 38. — P. 1625–1635.
214. Zhang, Q. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6 / Q. Zhang, K. Zhao, Q. Shen, Y. Han, Y. Gu, X. Li, D.

- Zhao, Y. Liu, C. Wang, X. Zhang et al. // *Nature*. — 2015. — Vol. 525. — P. 389–393.
215. Zhang, S. Expression localization of Bmi1 in mice testis / S. Zhang, D. Li, E. Li, L. Li, J. Wang, C. Wang, J. Lu, X. Zhang // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2008. Vol. 287. — P. 47–56.
216. Zhao, X. Mice lacking methyl-CpG binding protein 1 have deficits in adult neurogenesis and hippocampal function / X. Zhao, T. Ueba, B.R. Christie, B. Barkho, M.J. McConnell, K. Nakashima, E.S. Lein, B.D. Eadie, A.R. Willhoite, A.R. Muotri et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2003. — Vol. 100. — P. 6777–6782.
217. Zhenilo, S.V. Transcription factor Kaiso does not interact with hydroxymethylated DNA within CTGCNA sequence context / S.V. Zhenilo, O.S. Musharova, E.B. Pokhorchuk // *Mol. Biol. (Mosk.)*. — 2013 — Vol. 47. — P. 522–525.
218. Zhigalova, N.A. Bifunctional role of domain zinc fingers of methyl-DNA-binding protein Kaiso / N.A. Zhigalova, S.V. Zhenilo, D.S. Aïtkhozhina, E.B. Prokhorchuk // *Mol. Biol. (Mosk.)*. — 2010. — Vol. 44. — P. 263–274.
219. Zhigalova, N.A. S100A3 is a new target gene of Kaiso in mouse skin / N.A. Zhigalova, A.S. Sokolov, E.B. Prokhortchouk, S.V. Zhenilo // *Mol. Biol. (Mosk.)*. — 2015. — Vol. 49. — P. 362–365.
220. Zucker, S. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer / S. Zucker, J. Vacirca // *Cancer Metastasis Rev.* — 2004. — Vol. 23. — P. 101–117.