

Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2

Е.А. Литвинова¹✉, К.М. Ачасова¹, М.А. Борисова¹, С.В. Женило², Е.Б. Прохорчук², Е.Н. Кожевникова¹

¹ Федеральное исследовательское учреждение Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральное исследовательское учреждение «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт биоинженерии, Москва, Россия

Количество людей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) в мире постоянно увеличивается. Важными в этиологии заболевания являются генетические, средовые и иммунологические факторы. Однако механизм развития заболевания и эффективные способы борьбы с ним до сих пор не найдены. Для решения этих проблем используют различные модели на животных. Самыми перспективными считаются трансгенные модели, у которых нарушена работа отдельных генов. Для изучения ВЗК в качестве одной из таких моделей используют мышей с ноль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок Муцин-2, который участвует в формировании защитного муцинового слоя в тонкой и толстой кишке. В процессе развития ВЗК и связанных с ними онкологических заболеваний желудочно-кишечного тракта принимает участие ряд транскрипционных факторов, которые меняют профиль экспрессии генов кишки. Один из них – транскрипционный фактор *Kaiso*, содержащий домен «цинковые пальцы» и способный связываться с метилированной ДНК. В настоящей работе мы оценили роль белка *Kaiso* в развитии воспаления кишечника на примере экспериментальной модели мышей *C57BL/6^{Muc2^{-/-}Kaiso^{-/-}}*. Нами было показано, что у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника при развитии процессов, схожих с ВЗК у людей, развиваются воспалительные реакции, такие как повышение уровня экспрессии генов *Il1*, *Tnf* и *Il17a*. Отсутствие транскрипционного фактора *Kaiso* у мышей с дефицитом Муцина-2 вызывает снижение уровня экспрессии только генов *Cox2* и *Tff3*. Возможно, снижение экспрессии гена, кодирующего циклооксигеназу-2, может приводить к уменьшению экспрессии антибактериального фактора Trefol factor 3. Белок *Kaiso* на экспериментальной модели ВЗК не оказывал значимой роли в регуляции провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли и интерлейкинов 1 и 17.

Ключевые слова: мыши; кишечное воспаление; Муцин-2; ген *Kaiso*.

Role of the *Kaiso* gene in the development of inflammation in Mucin-2 deficient mice

Е.А. Litvinova¹✉, К.М. Achasova¹,
М.А. Borisova¹, S.V. Zhenilo²,
E.B. Prokhortchouk², E.N. Kozhevnikova¹

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", RAS, Institute of Bioengineering, Moscow, Russia

The number of people with inflammatory bowel disease (IBD) is constantly increasing worldwide. The main factors that have effects on the etiology of the disease are genetic, environmental and immunological. However, the mechanism of disease development and effective treatment of IBD have not yet been found. Animal models help address these problems. The most popular model is considered to be transgenic models in which individual genes are knocked out. One of such models for the study of IBD are mice with a null mutation of the *Muc2* gene encoding the Mucin-2 protein, which is involved in the formation of a protective mucin layer in the small and large intestine. Some of transcription factors that change the expression of intestinal genes are involved in the development of IBD and colorectal cancer. One of such transcription factors is "zinc finger" domain-containing protein *Kaiso* which is able to bind to methylated DNA. In this study, we assessed the role of *Kaiso* in the development of intestinal inflammation using the experimental model of *C57BL/6^{Muc2^{-/-}Kaiso^{-/-}}*. We have shown that mice with impaired intestinal barrier function that develop processes similar to human IBD also develop inflammatory responses, such as increased expression of *Il1*, *Tnf* and *Il17a* genes. The deficiency of the *Kaiso* transcription factor in Mucin-2 knockout mice causes a decrease in the expression level of only the *Cox2* and *Tff3* genes. Perhaps a decline in the expression of the gene encoding cyclooxygenase-2 can lead to a decrease in the expression of the antibacterial factor Trefol factor 3. However, in the experimental model of IBD, *Kaiso* protein did not play a significant role in the regulation of pro-inflammatory cytokines of tumor necrosis factor and interleukins 1 and 17.

Key words: mice, intestine inflammation, Mucin-2, *Kaiso* gene.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Литвинова Е.А., Ачасова К.М., Борисова М.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б., Кожевникова Е.Н. Роль гена *Kaiso* в развитии воспаления у мышей с дефицитом Муцина-2. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(8): 1078-1083. DOI 10.18699/VJ18.453

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Litvinova E.A., Achasova K.M., Borisova M.A., Zhenilo S.V., Prokhortchouk E.B., Kozhevnikova E.N. Role of the *Kaiso* gene in the development of inflammation in Mucin-2 deficient mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(8):1078-1083. DOI 10.18699/VJ18.453 (in Russian)

УДК 602.6:616.34-002

Поступила в редакцию 12.10.2018

После доработки 26.10.2018

Принята к публикации 28.10.2018

© АВТОРЫ, 2018

✉ e-mail: litvinova@bionet.nsc.ru

Количество людей с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) в мире на протяжении многих лет постепенно увеличивается (Benchimol et al., 2011), это становится одной из наиболее серьезных проблем в современной медицине. На развитие ВЗК сопряженно оказывают эффект генетические, средовые и иммунологические факторы, но этиология и механизм развития этих заболеваний до конца не ясны. Это затрудняет эффективную профилактику и лечение ВЗК (Holleran et al., 2017). Молекулярно-генетические подходы дали возможность создавать трансгенных животных, у которых нарушена работа отдельных генов; для изучения механизма развития ВЗК используют такие модели. Одной из них являются мыши с нуль-мутацией гена *Muc2*, кодирующего белок Муцин-2, который участвует в формировании муцинового барьерного слоя в тонкой и толстой кишке (*Muc2^{-/-}*). Муцин-2 – основной протеогликан кишечника, дефицит которого вызывает развитие хронического кишечного воспаления, как правило, в сочетании с бактериальной инфекцией (Martens et al., 2009; Bergstrom et al., 2010; Morgan et al., 2012). В связи с этим мыши, у которых нарушена барьерная функция кишечника вследствие мутации *Muc2^{-/-}*, – хорошая экспериментальная модель для изучения воспаления и канцерогенеза толстой и прямой кишки. Так как *Helicobacter* spp. инициирует развитие воспаления у трансгенных животных (Foltz et al., 1998), то мы использовали животных с этой инфекцией.

Экспериментальные данные говорят о том, что у мышей и у людей при развитии злокачественных опухолей повышается экспрессия белка Kaiso в ядрах раковых клеток (Vermeulen et al., 2012; Wang et al., 2016). На модели мышей, полученных путем скрещивания трансгенных животных с мутацией в гене *Apc* (*Apc^{Min/+}*), склонных к спонтанному опухолеобразованию, с мышами, у которых увеличена экспрессия гена *Kaiso* в кишечнике (*Kaiso^{Tg/+}*), было показано большее количество полипов в стенке толстой кишки и сокращение продолжительности жизни животных (Parisi et al., 2015). Белок Kaiso содержит домен «цинковые пальцы», способен связываться с метилированной ДНК и репрессировать транскрипцию генов (Prokhortchouk et al., 2001; Lopes et al., 2008). Поскольку экспрессия *Kaiso* усиливает развитие опухоли и воспаления, мы предположили, что отсутствие этого белка может повлиять на развитие провоспалительных иммунных реакций в кишечнике мышей с дефицитом Муцина-2. Мы оценили экспрессию провоспалительных цитокинов и транскрипционных факторов, регулирующих их экспрессию, у мышей трех генотипов: C57BL/6 (контроль), C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*} (модель ВЗК) и C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*}-Kaiso^{*-/-*} (тестовая группа для изучения роли Kaiso при моделировании ВЗК). Настоящее исследование позволит понять, как дефицит белка Kaiso может участвовать в развитии ВЗК на примере экспериментальной модели мышей C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*}-Kaiso^{*-/-*}.

Материалы и методы

Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН на самках линий C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*} и C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*}-Kaiso^{*-/-*} на генетическом фоне C57BL/6 в возрасте 12–14 нед. В качестве контроля

использовали мышей линии C57BL/6. Животные с мутациями C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*} и C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*}-Kaiso^{*-/-*} были получены в Университете Эдинбурга и переданы лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Центра биотехнологии РАН в Центр генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Животных содержали однопольми группами по четыре-пять особей в индивидуально вентилируемых клетках (Optimice, США) при искусственном световом режиме 14С:10Т, температуре 20–22 °С, влажности 40–50 % и давлении 38 Па. В качестве подстилки использовали обеспыленную березовую стружку. Животным предоставляли стерильную деионизированную воду с добавлением минералов K⁺ и Mg²⁺ («Северянка», г. Санкт-Петербург) и автоклавируемый корм Ssniff® R/M-H V1534-3 (Ssniff, Германия) *ad libitum*. Работу с животными выполняли согласно биоэтическим нормам Директивы Евросоюза (ECC Directive 86/609/EEC).

Мониторинг патогенов у мышей проводили по годовому списку, рекомендованному FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) в 2014 г., согласно международным требованиям к содержанию животных SPF-статуса (Mähler et al., 2014). У мышей C57BL/6 не было детектировано видоспецифических патогенов, указанных в годовом списке FELASA. Кроме *Helicobacter* spp., у C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*} и C57BL/6^{*Muc2^{-/-}*}-Kaiso^{*-/-*} других патогенов не обнаружено. Животные поступили в Центр генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН с *Helicobacter* spp. В связи с тем, что в этой работе не было предусмотрено специального заражения животных инфекцией *Helicobacter* spp., оценку базового уровня экспрессии интересующих нас генов выполнили на мышах линии C57BL/6 без инфекции.

Образцы восходящей толстой кишки мышей фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали с помощью ШИК-реакции (реакция Шифф-йодная кислота) (Био-Витрум, Россия) для изучения общей морфологии и выявления секрета бокаловидных клеток. Фотографии препаратов получали с использованием микроскопа DM 2500 (Leica) при увеличении в 400 раз.

Небольшой фрагмент ткани восходящего участка толстой кишки вырезали и замораживали в жидком азоте, хранили не более двух месяцев при –70 °С до момента анализа проб. Выделение РНК из ткани выполняли с помощью реагента TRI Reagent® (Molecular Research Center, США). Количество РНК определяли с помощью УФ-спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Далее РНК обрабатывали ДНКазой RNase-free DNase I (Thermo Scientific, США), согласно прилагаемой инструкции. РНК очищали с помощью гликогена (Thermo scientific, США) и выполняли синтез кДНК ферментом обратной транскриптазой M-MuLV (SibEnzyme, Россия).

Уровень экспрессии генов, вовлеченных в провоспалительный ответ (*Il1b*, *Tnf* и *Il17a*), запуск воспалительной реакции (*Cox2* и *Nos2*), ответ на бактериальные сигналы (*Tff3*), активацию клеток Т-хелпер 17-го типа (*Il6* и *Tgfb1*), а также транскрипционных факторов (*Rorc* и *Tbx21*) определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Реакцию выполняли с по-

Последовательности праймерных олигонуклеотидов для метода ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов, 5'-3'
<i>Tubb</i>	β tub-F	TGAAGCCACAGGTGGCAAGTAT
	β tub-R	CCAGACTGACCGAAAACGAAGT
<i>Tff3</i>	TFF3-F	TAATGCTGTGGTGGTCCTG
	TFF3-R	CAGCCACGGTGTACTACTG
<i>Rorc</i>	ROR γ t-F	TGGGCTCCAAGAGAAGAGGA
	ROR γ t-R	CAGGCTCCGGAGTTTCCCTT
<i>Tbx21</i>	Tbet-F	CCAGGGAACCGCTTATATG
	Tbet-R	CGATCATCTGGGTCACATTGT
<i>Tnf</i>	TNF α -F	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	TNF α -R	GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTT
<i>Il1b</i>	IL1 β -F	TGAAGTTGACGGACCCCAA
	IL1 β -R	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
<i>Il6</i>	IL6-F	GCTACCAAAGTGGATATAATCAGGA
	IL6-R	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
<i>Il17a</i>	IL17 α -F	TCAAAGCTCAGCGTGTCCAA
	IL17 α -R	GGGTCTTCATTGCGGTGGA
<i>Tgfb1</i>	TGF β -F	TGACGCTCACTGGAGTTGTAC
	TGF β -R	AAGAGCAGTGAGCGCTGAAT
<i>Nos2</i>	NOS2-F	CAGGGTCAACAATTTACAGGGA
	NOS2-R	CACTTCTGCTCCAAATCCAACG
<i>Cox2</i>	COX2-F	CCAGCACTTCAACCATCAGT
	COX2-R	ACCCAGTCTCCTCGTATTATG

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер.

мощью премикса BioMaster HS-qPCR SYBR Blue, кДНК и 250 нМ специфических праймеров (таблица). Все последовательности праймеров подбирали при помощи базы данных BLAST и программы Unipro UGENE. Детекцию осуществляли в амплификаторе CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (BioRad Laboratories, США). ДНК денатурировали 5 мин при 95 °С, затем проводили 45 циклов: денатурация – 95 °С 15 с, отжиг праймерных олигонуклеотидов – 62 °С 25 с, синтез – 62 °С 25 с. Анализ в каждом образце для каждого гена делали в трех технических повторах. Экспрессию генов определяли по уровню кДНК, синтезированной с матрицы мРНК целевого гена, нормализованного на кДНК гена *Tubb* (β -tubulin) по формуле: $\Delta Ct = 2^{(Ct \text{ мРНК } Tubb - Ct \text{ мРНК интересующего гена})}$, где (Ct) – номер цикла, соответствующий экспоненциальной фазе ПЦР-реакций.

Статистическую обработку данных производили при помощи пакета программного обеспечения STATISTI-СА6.1. Для выбора ΔCt экспрессии генов, не описывающихся нормальным распределением, использовали ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, а для межгруппового сравнения – критерий Манна–Уитни или при наличии значений ниже уровня детекции – тест χ^2 . Все

данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

На гистологических срезах толстого кишечника у мышей *C57BL/6^{Muc2-/-}* и *C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}* в бокаловидных клетках не наблюдается ШИК-позитивного содержимого (гликопротеинов) (рис. 1). Однако бокаловидные клетки производят не только муцины, но и другие защитные антибактериальные факторы (Kopp et al., 2015). Одним из таких белков, который вместе с Муцином-2 коэкспрессируют бокаловидные клетки в ответ на бактериальные сигналы, является Trefoil factor 3 (Tff3) (Podolsky et al., 1993; Taupin et al., 2003). Нами показано, что различия количества мРНК гена *Tff3* между тремя протестированными генотипами были статистически значимыми $H(2,21) = 13.72$, $p = 0.001$. Уровень мРНК *Tff3* был достоверно выше у мышей при отсутствии Муцина-2. Дефицит транскрипционного фактора *Kaiso* у мышей линии *C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}* приводил к снижению уровня мРНК гена *Tff3*, но не восстанавливал его до уровня, наблюдаемого у животных дикого типа (рис. 2). Можно предположить, что у мышей *C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}* снижается уровень сигнала, вызывающий наработку Trefoil factor 3 бокаловидными клетками, а это может быть связано с развитием противовоспалительного ответа (Shi et al., 2014).

Ранее было показано, что у мышей *C57BL/6^{Muc2-/-}* без инфекции уже в возрасте 14 дней начинается острая воспалительная реакция кишечника, которая к четырехнедельному возрасту переходит в хроническую форму с характерными признаками ВЗК: удлинение крипт нисходящей кишки и снижение массы тела. Количество воспалительных цитокинов у таких мышей снижается, но остается на более высоком уровне, чем у мышей дикого типа (Burger-van Paassen et al., 2011). Эти исследования были выполнены на мышах без инфекции *Helicobacter* spp. В нашей работе мы использовали мышей, рожденных с инфекцией *Helicobacter* spp., так как известно, что бактериальная инфекция инициирует развитие воспаления у трансгенных животных (Foltz et al., 1998). По нашим данным, различия количества мРНК генов провоспалительных цитокинов *Il1b* и *Tnf* между тремя генотипами были статистически достоверными: $H(2,20) = 6.32$, $p = 0.04$ и $H(2,20) = 10.39$, $p = 0.006$ соответственно. Экспрессия *Il1b* и *Tnf* в кишке была выше у мышей *C57BL/6^{Muc2-/-}* по сравнению с диким типом. Однако ноль-мутация гена *Kaiso* не приводила к изменению уровня экспрессии этих генов у мышей с дефицитом Муцина-2 (см. рис. 2). Экспрессия гена провоспалительного цитокина *Il17a*, который нарабатывают клетки Т-хелпер 17-го типа, у мышей дикого типа не детектировалась. У мышей *C57BL/6^{Muc2-/-}* и *C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}* экспрессия гена *Il17a* в кишке была значительно выше (6 из 10 и 5 из 7 соответственно), чем у мышей дикого типа (0 из 5) (см. рис. 2). Таким образом, нокаут гена *Kaiso* не оказывал значимого эффекта на уровень мРНК провоспалительных цитокинов.

Провоспалительные цитокины в местах воспаления запускают экспрессию сопряженных генов, таких как *Cox2* и *Nos2* (циклооксигеназа-2 и индуцируемая синтаза оксида азота), в дендритных клетках и макрофагах

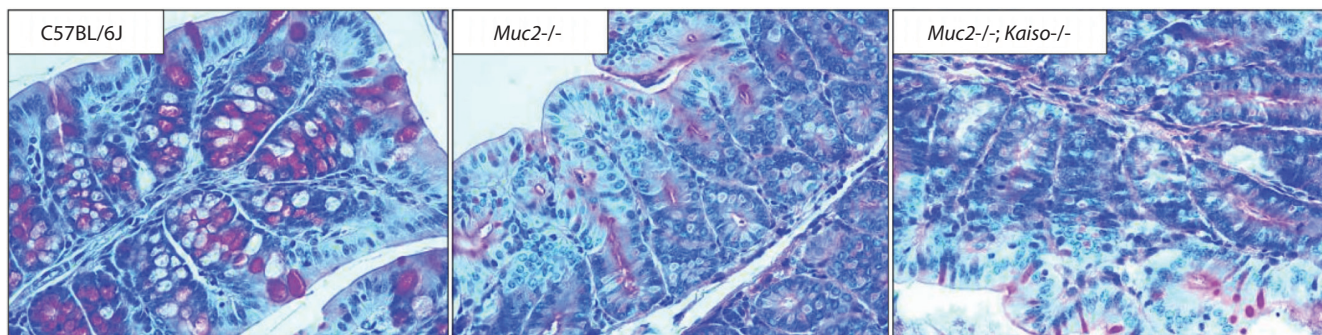


Рис. 1. Восходящая толстая кишка мышей линий C57BL/6, C57BL/6^{Muc2-/-} и C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}. Окраска ШИК-реакцией. Увеличение ×400.

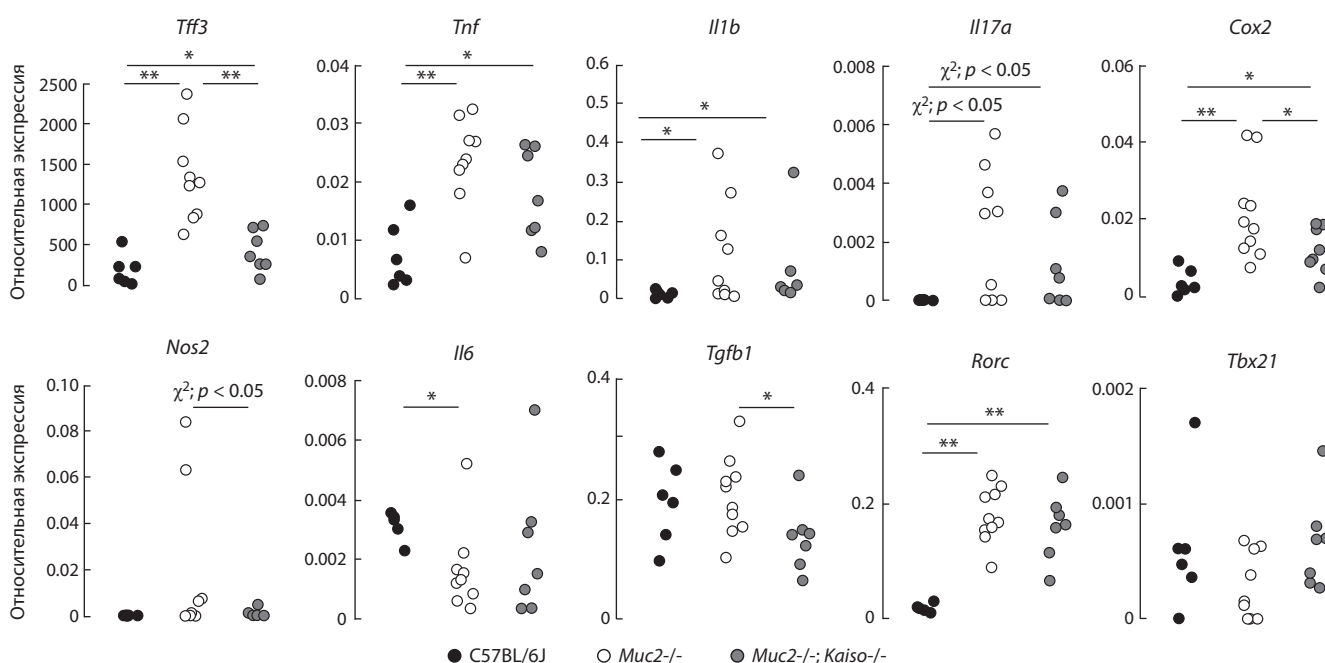


Рис. 2. Уровень мРНК генов *Tff3* (Trefoli factor 3), *Tnf* (TNFα), *Il1b* (IL-1β), *Il17a* (IL-17α), *Cox2* (COX2), *Nos2* (NOS2), *Il6* (IL-6), *Tgfb1* (TGFβ), *Rorc* (RORγt) и *Tbx21* (T-bet) в ткани толстой кишки у мышей трех генотипов: C57BL/6 (черные точки), C57BL/6^{Muc2-/-} (Muc2-/-, белые точки), C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-} (Muc2-/-Kaiso-/-, серые точки), нормированные на ген *Tubb* (β-tubulin).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$, критерий Манна–Уитни.

(Guihot et al., 2000; Wang, Dubois, 2010). Было показано, что повышение уровня циклооксигеназы-2 и индуцируемой синтазы оксида азота наблюдается у больных ВЗК и в экспериментальных моделях ВЗК (Singer et al., 1998; Shattuck-Brandt et al., 2000; Cross, Wilson, 2003). Наши данные показали, что разница уровня мРНК гена *Cox2* между тремя генотипами имела статистически значимый эффект $H(2,20) = 12.45$, $p = 0.002$. Животные с дефицитом Муцина-2 имеют более высокий уровень мРНК генов *Cox2* по сравнению с диким типом. У мышей с двойным нокаутом C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-} экспрессия циклооксигеназы-2 была достоверно ниже, чем у C57BL/6^{Muc2-/-} (см. рис. 2). Таким образом, можно предположить, что отсутствие экспрессии гена *Kaiso* может оказывать эффект на уровень циклооксигеназы-2. Экспрессия *Nos2* не детектировалась у мышей дикого типа. Дефицит Муцина-2

приводил к активации гена *Nos2* у 6 из 10 животных, что было достоверным изменением по сравнению с диким типом ($\chi^2 = 4.2$, $p = 0.04$). Нуль-мутация гена *Kaiso* отменяла этот эффект на экспрессию мРНК *Nos2* гена (2 из 8) по сравнению с мышами C57BL/6^{Muc2-/-} (6 из 10), но эти изменения не были достоверными. Таким образом, ген *Kaiso* влиял только на экспрессию *Cox2*.

Развитие хронического воспаления у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника запускается вслед за острой воспалительной реакцией и начинается с формирования толерантности иммунной системы к постоянному давлению со стороны бактериальных антигенов. У людей, страдающих ВЗК, активируются клетки Т-хелпер 17-го типа, которые ингибируют воспалительные реакции клеток Т-хелпер 1-го типа (Strober et al., 2010). Дифференцировка клеток Т-хелпер 0 в Т-хелпер

17-го типа происходит под действием иммунных факторов IL-6 и TGF β , которые нарабатывают дендритные клетки в ответ на бактериальные антигены (O'Connor et al., 2009). Ранее было показано, что мыши с нокаутом гена *Il17a* развивают более сильное воспаление при экспериментальном моделировании ВЗК (Yang et al., 2008). Нами было отмечено, что уровень экспрессии гена *Il17a* был выше у мышей с дефицитом Муцина-2, а дефицит *Kaiso* вызывал снижение экспрессии этого гена, но не достоверно. Мы предположили, что *Kaiso* может влиять на экспрессию генов *Il6* и *Tgfb1*, которые вовлечены в дифференцировку клеток Т-хелпер 17-го типа. Разница экспрессии мРНК гена *Tgfb1* между тремя генотипами была достоверной $H(2,20) = 7.17, p = 0.03$. Уровень мРНК гена *Tgfb1* был ниже у *C57BL/6^{Muc2-/-Kaiso-/-}* по сравнению с *C57BL/6^{Muc2-/-}*. Животные дикого типа и *C57BL/6^{Muc2-/-}* не отличались друг от друга по уровню экспрессии этого гена (см. рис. 2). Несмотря на отсутствие эффекта генотипа на экспрессию *Il6* гена, уровень мРНК этого гена был ниже у *C57BL/6^{Muc2-/-}* по сравнению с диким типом, а дефицит *Kaiso* нивелировал эти различия. Таким образом, белок *Kaiso* принимает участие в регуляции экспрессии генов *Il6* и *Tgfb1*. Мы предполагаем, что поскольку экспрессия этих генов в дендритных клетках начинается в ответ на бактериальный антиген, а этот процесс запускается на более ранних сроках у мышей с хронической моделью ВЗК, то наблюдаются несколько ослабленные эффекты дефицита белка *Kaiso* на уровень мРНК генов *Il6* и *Tgfb1*.

Далее мы измерили экспрессию транскрипционных факторов ROR γ t и T-bet, участвующих в дифференцировке клеток Т-хелпер по 17-му и 1-му типам. Известно, что активация одного типа Т-хелпер клеток ингибирует дифференцировку другого типа, это регулируют различные транскрипционные факторы (Caprioli et al., 2008). Мы обнаружили, что только уровень экспрессии гена *Rorc* (ROR γ t) был выше у мышей с нарушением синтеза Муцина-2. Белок *Kaiso* не влиял на экспрессию этого гена (см. рис. 2). мРНК гена *Tbx21* (T-bet) не отличалась у мышей всех трех генотипов.

Таким образом, у мышей с нарушенной барьерной функцией кишечника в патологический процесс вовлекаются провоспалительные цитокины, вызывающие активацию клеток Т-хелпер 17-го типа, которая регулируется транскрипционным фактором ROR γ t. Дефицит белка *Kaiso* у животных-моделей ВЗК не оказывает значимого эффекта на экспрессию генов провоспалительных цитокинов и транскрипционных факторов, участвующих в их регулировании. Недостаток белка *Kaiso* снизил экспрессию генов циклооксигеназы-2 и антибактериального фактора Trefoil factor 3, которая повышалась у животных при дефиците Муцина-2.

Благодарности

Получение нокаутных животных поддержано бюджетным проектом Института биоинженерии (№ 01201371085). Выполнение экспериментальной части поддержано бюджетным проектом (№ 0324-2018-0016). Приобретение реактивов осуществлено за счет гранта РФФИ (№ 18-015-00329). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр генетических ресурсов лабораторных

животных» ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Benchimol E.I., Fortinsky K.J., Gozdyra P., Van den Heuvel M., Van Limbergen J., Griffiths A.M. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: A systematic review of international trends. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011;17(1):423-439. DOI 10.1002/ibd.21349.
- Bergstrom K.S.B., Kissoon-Singh V., Gibson D.L., Ma C., Montero M., Sham H.P., Vallance B.A. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):e1000902. DOI 10.1371/journal.ppat.1000902.
- Burger-van Paassen N., van der Sluis M., Bouma J., Korteland-van Male A.M., Lu P., Van Seuning I., Boehm G., van Goudoever J.B., Renes I.B. Colitis development during the suckling-weaning transition in mucin Muc2-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011;301(4):G667-G678. DOI 10.1152/ajpgi.00199.2010.
- Caprioli F., Marafini I., Faccioti F., Pallone F., Monteleone G. Th17 immune response in IBD: A new pathogenic mechanism. *J. Crohns Colitis.* 2008;2(4):291-295. DOI 10.1016/j.crohns.2008.05.004.
- Cross R.K., Wilson K.T. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2003;9(3):179-189. DOI 10.1097/00054725-200305000-00006.
- Foltz C.J., Fox J.G., Cahill R., Murphy J.C., Yan L., Shames B., Schauer D.B. Spontaneous inflammatory bowel disease in multiple mutant mouse lines: association with colonization by *Helicobacter hepaticus*. *Helicobacter.* 1998;3(2):69-78.
- Guihot G., Guimbaud R., Bertrand V., Narcy-Lambare B., Couturier D., Dué P.H., Chaussade S., Blachier F. Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. *Amino Acids.* 2000;18(3):229-237.
- Holleran G., Lopetuso L., Petito V., Graziani C., Ianiro G., McNamara D., Gasbarrini A., Scaldaferrri F. The innate and adaptive immune system as targets for biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(10):E2020. DOI 10.3390/ijms18102020.
- Kopp Z.A., Jain U., Limbergen J.V., Stadnyk A.W. Do antimicrobial peptides and complement collaborate in the intestinal mucosa? *Front. Immunol.* 2015;6:17. DOI 10.3389/fimmu.2015.00017.
- Lopes E.C., Valls E., Figueroa M.E., Mazur A., Meng F.G., Chiosis G., Laird P.W., Schreiber-Agus N., Grealley J.M., Prokhortchouk E., Melnick A. Kaiso contributes to DNA methylation-dependent silencing of tumor suppressor genes in colon cancer cell lines. *Cancer Res.* 2008;68(18):7258-7263. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-0344.
- Mähler (Convenor) M., Berard M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014; 48:178-192. DOI 10.1177/0023677213516312.
- Martens E.C., Koropatkin N.M., Smith T.J., Gordon J.I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: The bacteroidetes Sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.* 2009;284(37):24673-24677. DOI 10.1074/jbc.R109.022848.
- Morgan X.C., Tickle T.L., Sokol H., Gevers D., Devaney K.L., Ward D.V., Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol.* 2012;13(9):R79. DOI 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
- O'Connor W., Kamanaka M., Booth C.J., Town T., Nakae S., Iwakura Y., Kolls J.K., Flavell R.A. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat. Immunol.* 2009;10:603-610. DOI 10.1038/ni.1736.

- Parisi A., Lacour F., Giordani L., Colnot S., Maire P., Le Grand F. APC is required for muscle stem cell proliferation and skeletal muscle tissue repair. *J. Cell Biol.* 2015;210(5):717-726. DOI 10.1083/jcb.201501053.
- Podolsky D.K., Lynch-Devaney K., Stow J.L., Oates P., Murgue B., DeBeaumont M., Sands B.E., Mahida Y.R. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J. Biol. Chem.* 1993;268(9):6694-6702.
- Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* 2001;15(13):1613-1618. DOI 10.1101/gad.198501.
- Shattuck-Brandt R.L., Varilek G.W., Radhika A., Yang F., Washington M.K., Dubois R.N. Cyclooxygenase-2 expression is increased in the subepithelial myofibroblasts of colon and cecal carcinomas from IL-10 (-/-) mice. *Gastroenterology.* 2000;118:337-345.
- Shi L., Zhou P.-H., Xi J.-L., Yu H.-G., Zhang B.-H. Recombinant human Trefoil factor 3 ameliorates bowel injury: its anti-inflammatory effect on experimental necrotizing enterocolitis. *Int. J. Pept.* 2014; 2014:634135. DOI 10.1155/2014/634135.
- Singer I.I., Kawka D.W., Schloemann S., Tessner T., Riehl T., Stenson W.F. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1998;115:297-306.
- Strober W., Zhang F., Kitani A., Fuss I., Fichtner-Feigl S. Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2010;26(4):310-317. DOI 10.1097/MOG.0b013e328339d099.
- Taupin D., Podolsky D.K. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(9):721-732. DOI 10.1038/nrm1203.
- Vermeulen J.F., van de Ven R.A., Ercan C., van der Groep P., van der Wall E., Bult P., Christgen M., Lehmann U., Daniel J., van Diest P.J., Derksen P.W.B. Nuclear Kaiso expression is associated with high grade and triple-negative invasive breast cancer. *PLoS One.* 2012;7: e37864. DOI 10.1371/journal.pone.0037864.
- Wang D., Dubois R.N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene.* 2010;29(6):781-788. DOI 10.1038/onc.2009.421.
- Wang H., Liu W., Black S., Turner O., Daniel J.M., Dean-Colomb W., He Q.P., Davis M., Yates C. Kaiso, a transcriptional repressor, promotes cell migration and invasion of prostate cancer cells through regulation of miR-31 expression. *Oncotarget.* 2016;7(5):5677-5689. DOI 10.18632/oncotarget.6801.
- Yang X.O., Chang S.H., Park H., Nurieva R., Shah B., Acero L., Wang Y.H., Schluns K.S., Broaddus R.R., Zhu Zh., Dong Ch. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J. Exp. Med.* 2008; 205(5):1063-1075. DOI 10.1084/jem.20071978.

ORCID ID

E.A. Litvinova orcid.org/0000-0001-6398-7154