

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* И *FoxG1*
В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗГЕ МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА *Zbtb33*

© 2021 г. Н. Б. Илларионова^а, *, М. А. Борисова^а, Е. Ю. Баженова^а,
Д. С. Забелина^б, Д. В. Фурсенко^с, А. В. Куликов^а

^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

^сИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: nina.illarionova@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2020 г.

После доработки 25.09.2020 г.

Принята к публикации 07.10.2020 г.

Фактор транскрипции KAISO важен для правильного эмбрионального развития животных. KAISO участвует в регуляции деления клеток и апоптоза, он широко представлен в ЦНС, но его функции в развитии ЦНС изучены недостаточно. Нами изучено влияние нокаута гена *Zbtb33* мыши на транскрипцию нескольких генов, регулирующих развитие ЦНС, в том числе *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1*. Эти гены относятся к генам сигнального пути Wnt/ β -катенин, который тесно связан с KAISO. В качестве модели использовали мышей линии C57BL/6j с нокаутом гена *Zbtb33*, кодирующего KAISO (ZBTB33⁻), и мышей дикого типа (ZBTB33⁺). Транскрипцию генов анализировали в гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме мышей ZBTB33⁺ и ZBTB33⁻ на разных стадиях развития. Впервые определены возрастзависимые и регион-специфичные различия в уровнях мРНК генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1* в развивающемся мозге мышей ZBTB33⁻ и ZBTB33⁺.

Ключевые слова: KAISO, сигнальный путь Wnt/ β -катенин, *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1*, ПЦР в реальном времени, мышь, гиппокамп, стриатум, фронтальная кора

DOI: 10.31857/S0026898421030095

ВВЕДЕНИЕ

Фактор транскрипции KAISO, вовлеченный в ключевые сигнальные пути развития и влияющий на экспрессию большого числа генов, участвует в регуляции эмбрионального развития рыб и земноводных [1–4]. У мышей KAISO регулирует деление клеток селезенки, влияет на дифференцировку клеток-предшественников эпителия кишечника [1, 5]. Мыши с нокаутом гена *Zbtb33* жизнеспособны. Хорошо изучена роль KAISO в регуляции деления опухолевых клеток, где в зависимости от типа клеток он может играть роль как проонкогена, так и супрессора опухолевого роста [6–11]. Вероятно, тканеспецифичная регуляция экспрессии генов-мишеней определяется способностью KAISO связываться с двумя различными сайтами в области промоторов. KAISO может взаимодействовать не только со специфическими последовательностями ТССТGCNA в промоторах, но также с двумя последовательно расположенными симметрично метилированными CpG-сайтами [12–14] и с одиночными метилированными CpG-сайтами [12, 14, 15]. Таким образом, регуляция экспрессии генов-мишеней зависит также от статуса метилиро-

вания CpG-сайтов связывания KAISO в их промоторах. В основном KAISO описан как репрессор транскрипции, однако показано, что сайленсинг KAISO приводит к снижению экспрессии многих генов [16]. Интересно, что в зависимости от типа клеток KAISO может как увеличивать, так и снижать экспрессию протоонкогена *c-Myc* и гена, кодирующего циклин D1 (*Ccnd1*) [2, 5, 6, 16, 17].

Транскрипционный фактор KAISO связан с сигнальным путем Wnt/ β -катенин, играющим важную роль в развитии [2, 9, 18–20]. В ЦНС этот путь регулирует нейрогенез и глиогенез, влияет на формирование синаптических контактов и гематоэнцефалического барьера [21–25]. Сигнальный путь Wnt/ β -катенин вызывает стабилизацию β -катенина, который транспортируется в ядро, где активирует транскрипцию многих генов-мишеней. Промоторы некоторых ключевых генов-мишеней сигнального пути Wnt/ β -катенин, таких как *Matrilysin*, *Ccnd1*, *Siamese*, *c-Myc*, *Rapsyn*, содержат сайты связывания KAISO [5, 14, 17, 20, 26]. В присутствии Wnt-лиганда KAISO может взаимодействовать с катенином p120 в клеточном ядре, что способствует освобождению промоторов

генов-мишеней от KAISO [2, 18]. KAISO способен связываться не только с катенином p120, но также, хотя и с меньшей аффинностью, с β -катенином и мешать активации генов-мишеней сигнального пути Wnt/ β -катенин [19]. Кроме того, промотор гена β -катенина содержит специфический сайт связывания KAISO и несколько метилированных CpG-сайтов [9]. Таким образом, KAISO регулирует непосредственно экспрессию эффектора самого сигнального пути Wnt/ β -катенин. Можно говорить о взаимной регуляции сигнального пути Wnt/ β -катенин и фактора транскрипции KAISO. Следовательно, генами-мишенями KAISO могут быть гены сигнального пути Wnt/ β -катенин, из которых интерес представляют *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1*. Фактор роста фибробластов FGF9 активирует рост и дифференцировку глии [27, 28], а одним из основных рецепторов FGF9 является рецептор FGFR3 (FGFR3) [29], *c-Myc* участвует в регуляции клеточного деления и апоптоза [30], SOX2 поддерживает плюрипотентность нейрональных клеток-предшественников [31–33], SOX9 участвует в инициации глиогенеза [34–37], *NeuroD1* регулирует нейрональную дифференцировку клеток [38, 39], *FOXG1* играет важную роль в развитии и организации структуры конечного мозга и дифференцировки глутаматергических нейронов в развивающейся коре [40–42]. Таким образом, эти гены вносят существенный вклад в формирование и развитие мозга.

Нами проведен сравнительный анализ транскрипции генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1* у мышей с нокаутом гена *Zbtb33* [7], кодирующего KAISO, в разных структурах головного мозга и на разных этапах развития.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали мышей линии C57BL/6j дикого типа и с нокаутом гена *Zbtb33* [7]. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках при искусственном дневном/ночном режиме (14 ч свет/10 ч темнота), температуре 22–24°C и влажности 40–50%. Воду и гранулированный корм Chaga SPF для лабораторных грызунов (“Ассортимент-Агро”, Пушкино, Россия) давали *ad libitum*. Корм и подстилку перед использованием автоклавировали. Все процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам FELASA. Путем датированного по времени скрещивания самок, гетерозиготных по гену *Zbtb33* (ZBTB33+/-), с самцами дикого типа в одном помете получили самцов с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33-) и самцов дикого типа (ZBTB33+). Такая схема позволяет сравнивать транскрипцию генов при уменьшенном влиянии генетического разнообразия каждой линии мышей и обнаруживать непосредственное влия-

ние нокаута гена *Zbtb33*. При датированном по времени скрещивании возможен забор материалов с точностью до 12 ч развития эмбрионального мозга. Таким образом, структуры мозга (фронтальная кора, стриатум и гиппокамп) были взяты на 16.5 сутки эмбрионального развития (E16, повышенный уровень нейрогенеза), на второй день после рождения (P2, повышенный уровень глиогенеза), а также на 40-й день после рождения (P40, взрослые мыши) [43] (6–10 животных в каждой группе). Эвтаназию проводили декапитацией с последующей диссекцией структур головного мозга: гиппокамп, стриатум и фронтальная кора.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью реактивов TRIzol Reagent (“ThermoFisher Scientific”, США) и TRI Reagent (“Sigma Aldrich”, США) согласно инструкциям производителей. Концентрацию РНК в пробах измеряли спектрофотометрически (спектрофотометр NanoDrop 2000, “ThermoFisher Scientific”) при длине волны 260 и 280 нм. Все пробы разводили водой, обработанной DEPC mQ, до концентрации РНК 128 нг/мкл.

Получение кДНК в реакции обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции проводили с гексануклеотидными праймерами со случайной последовательностью нуклеотидов с помощью набора R01-250 (“Биолабмикс”, Россия) согласно инструкции производителя. В каждую реакцию добавляли 1024 нг РНК в качестве матрицы.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Для определения экспрессии генов подбирали специфические праймеры (табл. 1): межэкзонные праймеры на гены *c-Myc*, *Fgf9*, *Fgfr3*, *Gapdh*, *NeuroD1*, *Sox9* и *Pol2A* и внутриэкзонные праймеры на гены *Sox2*, *FoxG1* и *Zbtb33*. В случае внутриэкзонных праймеров проверяли загрязнение образцов РНК геномной ДНК. Для этого проводили ПЦР, используя в качестве матрицы образцы РНК. Допустимым загрязнением считали увеличение сигнала SYBR Green на Cq 35–45 при увеличении сигнала с кДНК-матрицы на Cq 20–30. Пробы, не отвечающие данному условию, исключали. Для количественного определения продукта готовили стандартные растворы: в пробирке смешали по 2 мкл матрицы каждого образца одной структуры мозга. Концентрацию кДНК в этой пробирке условно принимали за 100. Из первого стандартного раствора путем последовательного разведения водой в 2 раза приготовлены 11 последующих растворов с условными концентрациями 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, которые использовали для построения калибровочной кривой. Экспериментальные образцы разбавляли водой в 4 раза. Полученный условный уровень экспрессии нормировали на соответствующий уровень экспрессии гена домашнего хозяйства *Gapdh* или *Pol2A*. Амплификацию прово-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	$T_{отж}$, °C
<i>c-Myc_F</i>	CACCACCAGCAGCGACTC	58
<i>c-Myc_R</i>	GATGGAGATGAGCCCGACT	58
<i>Fgf9_F</i>	TGGACTCTACCTCGGCATGA	63
<i>Fgf9_R</i>	GGTTGGAAGAGTAGGTGTTGT	63
<i>Fgfr3_F</i>	GAGAGCGGCAGAGGTTCCA	58
<i>Fgfr3_R</i>	CCATCCTTAGCCCAGACCGT	58
<i>Gapdh_F</i>	GTCGGTGTGAACGGATTTGG	63
<i>Gapdh_R</i>	CGTGAGTGGAGTCATACTGGA	63
<i>NeuroD1_F</i>	CGAGGCTCCAGGGTTATGAG	63
<i>NeuroD1_R</i>	CGTCCTCTTTCTTGTCTGCC	63
<i>Sox2_F</i>	CTCGCAGACCTACATGAACG	60
<i>Sox2_R</i>	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAA	60
<i>Sox9_F</i>	CAAGACTCTGGGCAAGCTCT	63
<i>Sox9_R</i>	TCCGTTCTTCACCGACTTCC	63
<i>FoxG1_F</i>	CACCGGCCTCACCTTCAT	63
<i>FoxG1_R</i>	GGTGGAGAAGGAGTGGTTGT	63
<i>mPol2A_F</i>	CATCTCCTTTGATGGTTCTTATGTCAA	63
<i>mPol2A_R</i>	CCATGTGCTGCTGCTTCCATA	63
<i>Zbtb33_F</i>	GTCTCTTTTGTGATGTTACTG	57
<i>Zbtb33_R</i>	GTTCTGTACCTGATATGCTTT	57
E1_F	TCAAAGGAAGGCGACCAAGGAGAT	58
E2_R	AGCAGTACCATCCTGTTCTG	58
E5_R	ATAGTTTAAAGGCATATAGTGGCC	58
SRY_F	TTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCATGTCAA	64
SRY_R	CCACTCCTCTGTGACACTTTAGCCCTCCGA	64

дили с помощью набора R-402 (“Синтол”, Россия) согласно инструкции производителя на амплификаторе CFX 96 (“Bio Rad”, США).

Генотипирование. Мышей ZBTV33+ и ZBTV33– генотипировали методом ПЦР с парами праймеров E1–E2 и E1–E5 (табл. 1) [7]. Пол мышей групп E16 и P2 дополнительно определяли с помощью пар праймеров SRY_F и SRY_R (табл. 1). Для эксперимента отбирали самцов дикого типа и самцов с нокаутом гена *Zbtb33*.

Статистический анализ. Данные представляли как средние значения ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим *post hoc* анализом по Фишеру и поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведен сравнительный анализ транскрипции генов *c-Myc*, *Fgf9*, *Fgfr3*, *NeuroD1*, *Sox9*, *Sox2*, *FoxG1* и *Zbtb33* в гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме мышей дикого типа и с нокаутом гена *Zbtb33* на разных стадиях развития.

Транскрипция гена *Zbtb33* выявлена во всех исследованных структурах мозга мышей ZBTV33+ на разных этапах развития (рис. 1а, 2а, 3а), при этом уровень транскрипции гена *Zbtb33* в гиппокампе взрослых мышей (P40) был ниже, чем в E16 (рис. 1а, $p < 0.05$), а в стриатуме в P40 ниже, чем в E16 ($p < 0.05$) и P2 ($p < 0.05$) (рис. 3а). В каждой структуре мозга транскрипция гена *Fgf9* увеличивалась от E16 к P2 (рис. 1б, $p < 0.001$, рис. 2б, $p < 0.001$, рис. 3б, $p < 0.001$) и от P2 к P40 (рис. 1б, $p < 0.001$, рис. 2б, $p < 0.001$, рис. 3б, $p < 0.001$). При этом впервые показано, что в стриатуме взрослых мышей ZBTV33– (P40) уровень транскрипции этого гена был ниже, чем у мышей ZBTV33+ ($F_{1,18} = 9.06$, $p < 0.01$, рис. 3б). Мы также определили транскрипцию гена *Fgfr3*, кодирующего рецептор GF9, так как возможно существование корреляции между экспрессией лиганда и его рецептора. Транскрипция гена *Fgfr3* в гиппокампе взрослых мышей ZBTV33– была выше, чем у мышей ZBTV33+ ($F_{1,18} = 6.93$, $p < 0.05$, рис. 1в). Однако корреляции между экспрессией генов *Fgf9* и *Fgfr3* в стриатуме не обнаружено (рис. 3в).

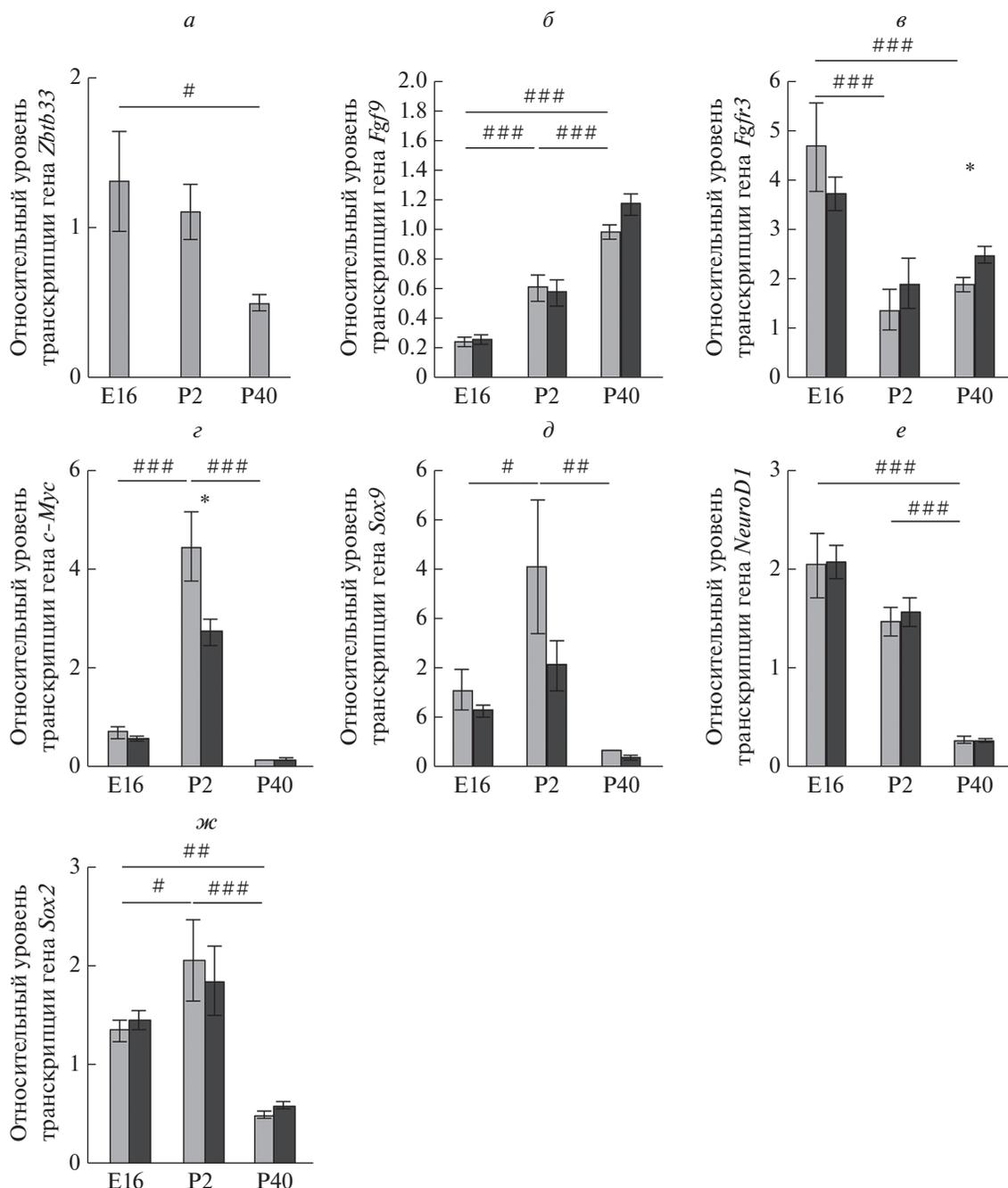


Рис. 1. Транскрипция генов в гиппокампе мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33⁻) и у мышей дикого типа (ZBTB33⁺) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: а – *Zbtb33*; б – *Fgf9*; в – *Fgfr3*; г – *c-Myc*; д – *Sox9*; е – *NeuroD1*; ж – *Sox2*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены * (**p* < 0.05), значимые возрастные отличия (ZBTB33⁺) показаны знаком # (#*p* < 0.05; ##*p* < 0.01; ###*p* < 0.001). Светло-серым цветом показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33⁺, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33⁻.

С помощью сравнительного анализа выявлен более высокий уровень транскрипции гена *c-Myc* в гиппокампе мышей в возрасте P2 по сравнению с E16 (*p* < 0.001) и P40 (*p* < 0.001) (рис. 1г), а также во фронтальной коре (рис. 2а) и стриатуме (рис. 3д). Впервые обнаружено, что в гиппокампе мышей

ZBTB33⁻ в P2 транскрипция гена *c-Myc* была ниже, чем у мышей ZBTB33⁺ (рис. 1г, $F_{1,15} = 4.79$, *p* < 0.05).

Транскрипция гена *Sox9* в гиппокампе и стриатуме мышей P2 была выше, чем в E16 (*p* < 0.05) и P40 (*p* < 0.01) (рис. 1д, рис. 3д), тогда как во фронтальной коре транскрипция этого гена в возрасте

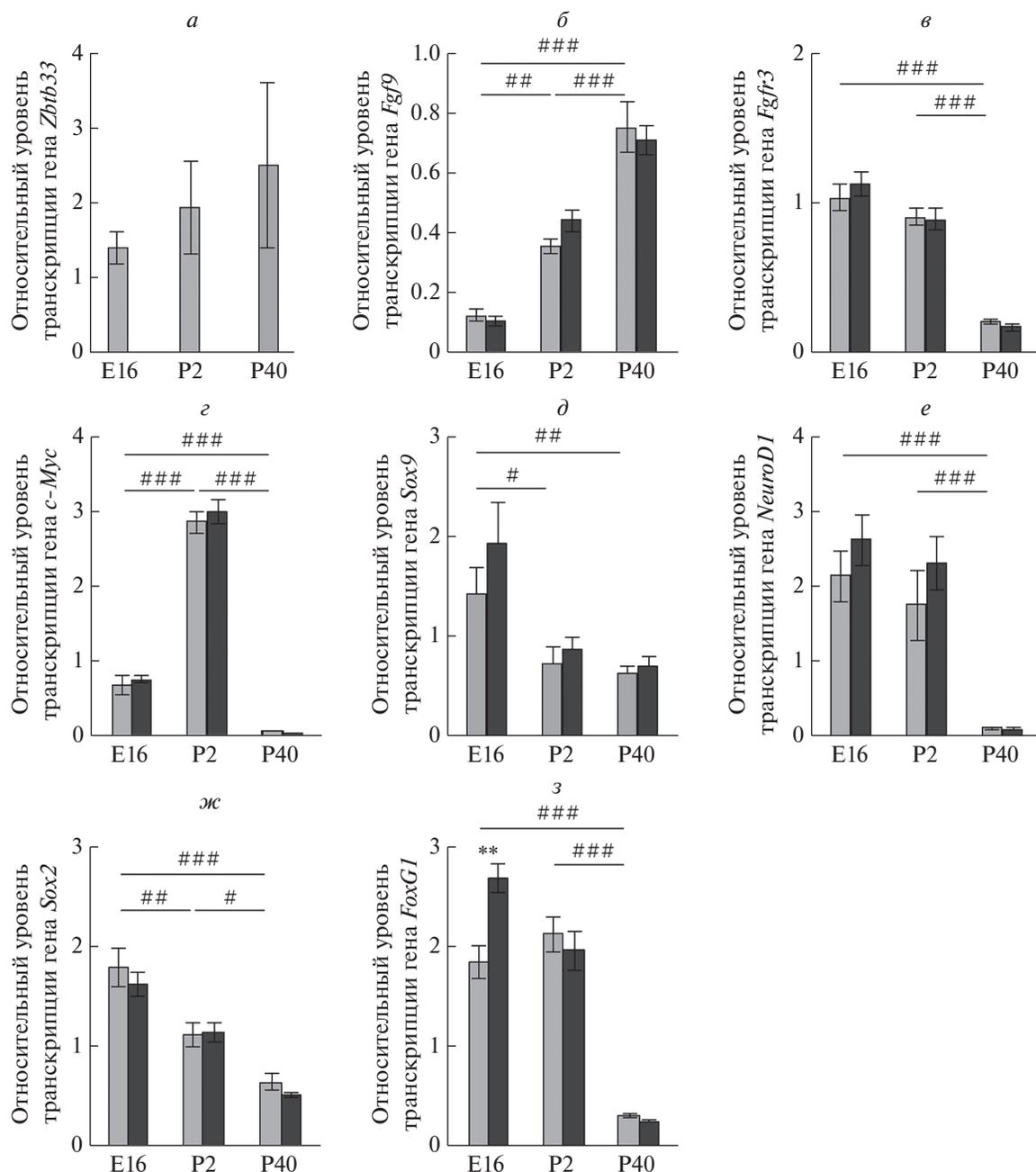


Рис. 2. Транскрипция генов во фронтальной коре мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33⁻) и у мышей дикого типа (ZBTB33⁺) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: а – *Zbtb33*; б – *Fgf9*; в – *Fgfr3*; г – *c-Myc*; д – *Sox9*; е – *NeuroD1*; ж – *Sox2*; з – *FoxG1*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены ** (***p* < 0.01), значимые возрастные отличия (ZBTB33⁺) показаны знаком # (#*p* < 0.05; ##*p* < 0.01; ###*p* < 0.001). Светло-серым цветом показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33⁺, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33⁻.

E16 была статистически значимо выше, чем в P2 ($p < 0.05$) и P40 ($p < 0.01$, рис. 2д). Транскрипция гена *NeuroD1*, была одинаковой на стадиях E16 и P2, значительно снижалась во всех исследованных структурах мозга у взрослых мышей (гиппокамп, рис. 1е, $p < 0.001$; фронтальная кора, рис. 2е, $p < 0.001$ и стриатум, рис. 3е, $p < 0.05$). Транскрип-

ция гена *Sox2* в возрасте P40 была ниже по сравнению с E16 ($p < 0.01$) и P2 ($p < 0.001$) в гиппокампе (рис. 1ж). У взрослых мышей (P40) транскрипция *Sox2* была ниже и в стриатуме по сравнению с E16 ($p < 0.001$) и P2 ($p < 0.001$) (рис. 3ж), и во фронтальной коре по сравнению с E16 ($p < 0.001$) и P2 ($p < 0.05$) (рис. 2ж).

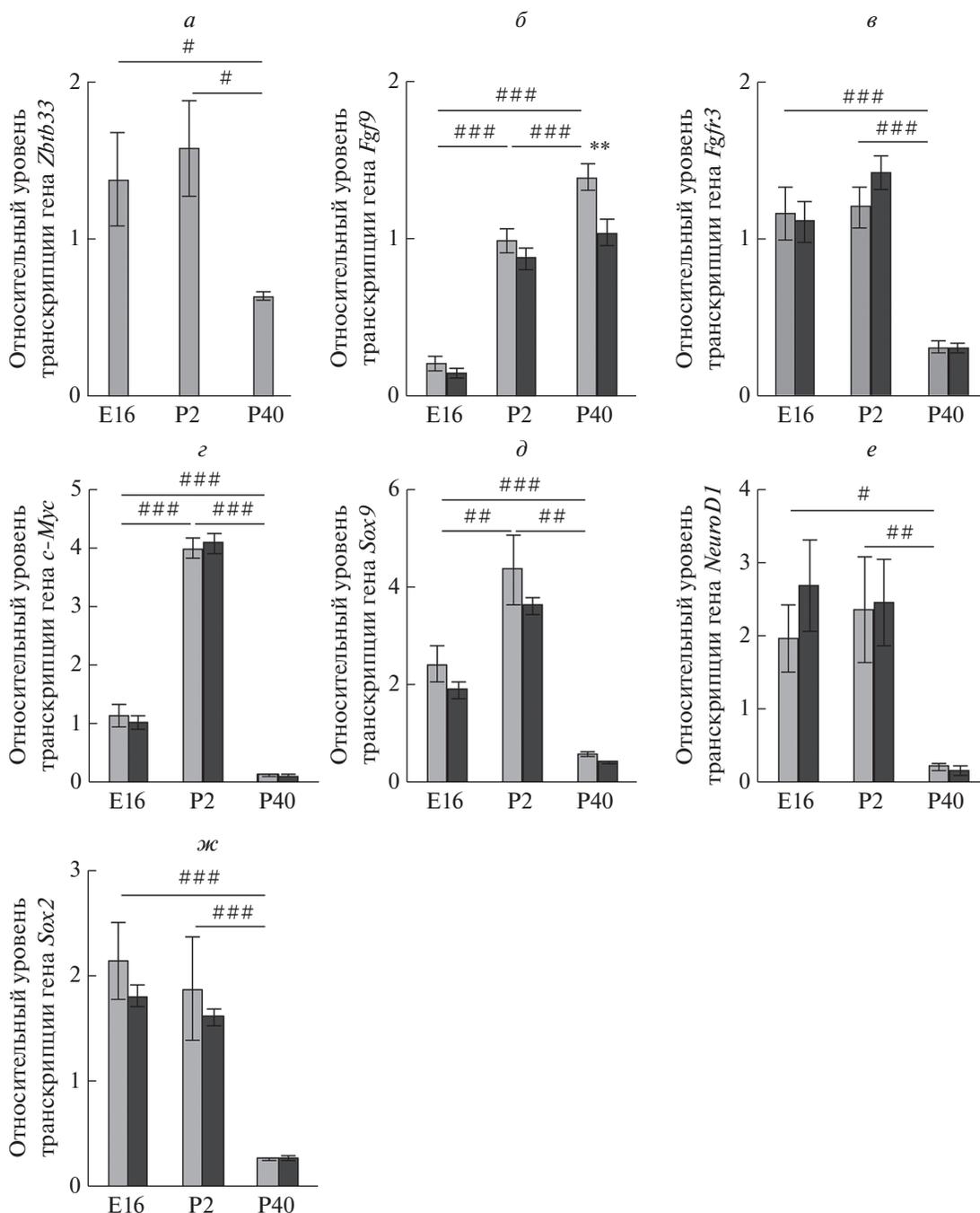


Рис. 3. Транскрипция генов в стриатуме мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33^{-/-}) и у мышей дикого типа (ZBTB33^{+/+}) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: *a* – *Zbtb33*; *б* – *Fgf9*; *в* – *Fgfr3*; *г* – *c-Myc*; *д* – *Sox9*; *е* – *NeuroD1*; *ж* – *Sox2*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены ** (***p* < 0.01), значимые возрастные отличия (ZBTB33^{+/+}) показаны знаком # (#*p* < 0.05; ##*p* < 0.01; ###*p* < 0.001). Светло-серым показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33^{+/+}, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33^{-/-}.

Транскрипция гена *FoxG1* была одинаковой в E16 и P2 и снижалась во взрослом возрасте во фронтальной коре (*p* < 0.001, рис. 2з). В этой структуре транскрипция гена *FoxG1* у мышей ZBTB33^{-/-} на стадии E16 была выше, чем у ZBTB33^{+/+} (рис. 1з, $F_{1,15} = 14.41$, *p* < 0.01).

Статистически значимых различий в транскрипции генов *Sox9*, *NeuroD1* и *Sox2* в исследованных структурах мозга мышей ZBTB33^{-/-} и ZBTB33^{+/+} не обнаружено.

Таким образом, нами впервые выявлены различия в транскрипции генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* и

FoxG1 в мозге мышей ZBTB33⁻ и ZBTB33⁺ на разных стадиях развития. Все эти гены необходимы для правильного развития ЦНС. Предстоит установить, являются ли эти гены прямыми мишенями транскрипционного фактора KAISO или они регулируются KAISO через другие сигнальные пути, например, путь Wnt/ β -катенина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами выявлено несколько генов, транскрипция которых в различных отделах развивающегося мозга мышей с нокаутом гена *Zbtb33* отличается от транскрипции у мышей дикого типа. Транскрипция гена *FoxG1* увеличивалась во фронтальной коре мозга эмбрионов мыши на стадии E16 в отсутствие транскрипционного фактора KAISO (рис. 2з, 1б). Известно, что сверхэкспрессия гена *FoxG1* в эмбрионах лягушки и курицы приводит к увеличению конечного и среднего мозга, что, вероятно, связано со снижением интенсивности апоптоза клеток развивающегося мозга [44]. Влияние нокаута гена *Zbtb33* и увеличения транскрипции гена *FoxG1* на стадии E16 на организацию коры головного мозга мышей еще предстоит оценить.

Впервые обнаружено снижение транскрипции гена *c-Myc* в гиппокампе мышей ZBTB33⁻ перинатального возраста (P2). Регуляцию этого гена фактором KAISO уже показали ранее на ооцитах лягушки и спленоцитах мыши, а также на клеточных культурах человека, но не в ЦНС [2, 5, 6]. В клетках селезенки нокаунт гена *Zbtb33* приводил к увеличению экспрессии гена *c-Myc*. Также выявлен потенциальный предпочтительный сайт связывания KAISO на промоторе гена *c-Myc* мыши внутри первого экзона [5]. Описано также снижение уровня экспрессии *c-Myc* в клетках рака молочной железы, вызванное сайленсингом KAISO [6]. По-видимому, существуют тканеспецифичные различия в регуляции экспрессии гена *c-Myc* фактором KAISO, что может быть связано с бимодальной ролью KAISO в регуляции генов и, в частности, гена *c-Myc* в разных тканях [2, 5, 6, 16]. Условный нокаут гена *c-Myc* в нейрональных клетках-предшественниках сдерживает рост мозга, а двойной нокаут *c-Myc* и его гомолога *N-Myc* в клетках-предшественниках головного мозга приводит к серьезным нарушениям развития ЦНС, уменьшению объема мозга, снижению числа нейрональных клеток-предшественников [45, 46]. Предстоит установить, регулирует ли KAISO пролиферацию и апоптоз клеток-предшественников в развивающемся гиппокампе мыши — структуре мозга, важной для формирования эпизодической памяти и ориентации в пространстве [47].

Нами впервые показано, что отсутствие фактора KAISO приводит к снижению уровня транскрипции гена фактора роста FGF9 в стриатуме мышей ZBTB33⁻ по сравнению с ZBTB33⁺.

Фактор роста FGF9 активирует рост и дифференцировку глии, которая, в свою очередь, влияет на функцию нейронов [27, 28]. Однако регион-специфичной корреляции транскрипции генов *Fgf9* и рецептора FGFR3 не обнаружено.

Транскрипция генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* и *FoxG1* в мозге мышей ZBTB33⁺ и ZBTB33⁻ имеет различный возрастзависимый и регион-специфичный характер. Это может быть связано со сложной регуляцией транскрипции этих генов в структурах мозга на разных стадиях развития. Влияние нокаута *Zbtb33* на транскрипцию этих генов может, вероятно, варьировать в зависимости от статуса метилирования CpG-сайтов, которое может зависеть от стадии развития, отдела мозга и от таких факторов, как гомологи KAISO (ZBTB4, ZBTB38), а также от непрямого регуляции, опосредованной, например, сигнальным путем WNT/ β -катенина.

Выполнение экспериментальной части работы поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00869 А, диссекция мозга, выделение РНК и ПЦР в реальном времени) и бюджетным проектом № 0259-2021-0015 (содержание и разведение животных) и полностью с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Обращение с животными соответствовало рекомендациям руководства по уходу и использованию лабораторных животных Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на основе вивария, свободного от специфических патогенов. Все процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам FELASA.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaudhary R., Pierre C.C., Nanan K., Wojtal D., Morone S., Pinelli C., Wood G.A., Robine S., Daniel J.M. (2013) The POZ-ZF transcription factor Kaiso (ZBTB33) induces inflammation and progenitor cell differentiation in the murine intestine. *PLoS One*. **8**, e74160.
2. Park J.I., Kim S.W., Lyons J.P., Ji H., Nguyen T.T., Cho K., Barton M.C., Deroo T., Vleminckx K., Moon R.T., McCrean P.D. (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical *Wnt* gene targets. *Dev. Cell*. **8**, 843–854.
3. Ruzov A., Dunican D.S., Prokhortchouk A., Pennings S., Stancheva I., Prokhortchouk E., Meehan R.R. (2004) Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development*. **131**, 6185–6194.
4. Ruzov A., Savitskaya E., Hackett J.A., Reddington J.P., Prokhortchouk A., Madej M.J., Chekanov N., Li M., Dunican D.S., Prokhortchouk E., Pennings S., Mee-

- han R.R. (2009) The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early *Xenopus laevis* development. *Development*. **136**, 729–738.
5. Koh D.I., Yoon J.H., Kim M.K., An H., Kim M.Y., Hur M.W. (2013) Kaiso is a key regulator of spleen germinal center formation by repressing *Bcl6* expression in splenocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **442**, 177–182.
 6. Bassey-Archibong B.I., Rayner L.G., Hercules S.M., Aarts C.W., Dvorkin-Gheva A., Bramson J.L., Hassell J.A., Daniel J.M. (2017) Kaiso depletion attenuates the growth and survival of triple negative breast cancer cells. *Cell Death Dis.* **8**, e2689.
 7. Prokhortchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Meng F.G., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., Hendrich B., Melnick A., Prokhortchouk E., Clarke A., Bird A. (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 199–208.
 8. Jones J., Wang H., Zhou J., Hardy S., Turner T., Austin D., He Q., Wells A., Grizzle W.E., Yates C. (2012) Nuclear Kaiso indicates aggressive prostate cancers and promotes migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Am. J. Pathol.* **181**, 1836–1846.
 9. Liu Y., Dong Q.Z., Wang S., Xu H.T., Miao Y., Wang L., Wang E.H. (2014) Kaiso interacts with p120-catenin to regulate beta-catenin expression at the transcriptional level. *PLoS One*. **9**, e87537.
 10. van de Ven R.A., Tenhagen M., Meuleman W., van Riel J.J., Schackmann R.C., Derksen P.W. (2015) Nuclear p120-catenin regulates the anoikis resistance of mouse lobular breast cancer cells through Kaiso-dependent Wnt11 expression. *Dis. Model Mech.* **8**, 373–384.
 11. Pierre C.C., Hercules S.M., Yates C., Daniel J.M. (2019) Dancing from bottoms up – roles of the POZ-ZF transcription factor Kaiso in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1871**, 64–74.
 12. Buck-Koehntop B.A., Stanfield R.L., Ekiert D.C., Martinez-Yamout M.A., Dyson H.J., Wilson I.A., Wright P.E. (2012) Molecular basis for recognition of methylated and specific DNA sequences by the zinc finger protein Kaiso. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 15229–15234.
 13. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* **15**, 1613–1618.
 14. Daniel J.M., Spring C.M., Crawford H.C., Reynolds A.B., Baig A. (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucl. Acids Res.* **30**, 2911–2919.
 15. Жигалова Н.А., Соколов А.С., Прохорчук Е.Б., Женило С.В. (2015) *SI00A3* – новый ген-мишень белка Каизо в коже млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **49**, 362–365.
 16. Pozner A., Terzoatea T.W., Buck-Koehntop B.A. (2016) Cell-specific Kaiso (ZBTB33) regulation of cell cycle through cyclin D1 and cyclin E1. *J. Biol. Chem.* **291**, 24538–24550.
 17. Donaldson N.S., Pierre C.C., Anstey M.I., Robinson S.C., Weerawardane S.M., Daniel J.M. (2012) Kaiso represses the cell cycle gene cyclin D1 via sequence-specific and methyl-CpG-dependent mechanisms. *PLoS One*. **7**, e50398.
 18. Spring C.M., Kelly K.F., O’Kelly I., Graham M., Crawford H.C., Daniel J.M. (2005) The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrixin. *Exp. Cell Res.* **305**, 253–265.
 19. Del Valle-Perez B., Casagolda D., Lugalde E., Valls G., Codina M., Dave N., de Herreros A.G., Dunach M. (2011) Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1epsilon-dependent phosphorylation of p120-catenin. *J. Cell. Sci.* **124**, 2298–2309.
 20. Kim S.W., Park J.I., Spring C.M., Sater A.K., Ji H., Otchere A.A., Daniel J.M., McCrea P.D. (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat. Cell. Biol.* **6**, 1212–1220.
 21. Liebner S., Corada M., Bangsow T., Babbage J., Taddei A., Czupalla C.J., Reis M., Felici A., Wolburg H., Fruttiger M., Taketo M.M., von Melchner H., Plate K.H., Gerhardt H., Dejana E. (2008) Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell. Biol.* **183**, 409–417.
 22. Okuda T., Yu L.M., Cingolani L.A., Kemler R., Goda Y. (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 13479–13484.
 23. Maguschak K.A., Ressler K.J. (2012) The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. **62**, 78–88.
 24. Chenn A., Walsh C.A. (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb. Cortex*. **13**, 599–606.
 25. Backman M., Machon O., Mygland L., van den Bout C.J., Zhong W., Taketo M.M., Krauss S. (2005) Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev. Biol.* **279**, 155–168.
 26. Rodova M., Kelly K.F., VanSaun M., Daniel J.M., Werle M.J. (2004) Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7188–7196.
 27. Falcone C., Filippis C., Granzotto M., Mallamaci A. (2015) *Emx2* expression levels in NSCs modulate astrogenesis rates by regulating *Egfr* and *Fgf9*. *Glia*. **63**, 412–422.
 28. Lin Y., Chen L., Lin C., Luo Y., Tsai R.Y., Wang F. (2009) Neuron-derived FGF9 is essential for scaffold formation of Bergmann radial fibers and migration of granule neurons in the cerebellum. *Dev. Biol.* **329**, 44–54.
 29. Hecht D., Zimmerman N., Bedford M., Avivi A., Yayon A. (1995) Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth Factors*. **12**, 223–233.
 30. Sears R.C., Nevins J.R. (2002) Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J. Biol. Chem.* **277**, 11617–11620.
 31. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. **122**, 947–956.

32. Mercurio S., Serra L., Motta A., Gesuita L., Sanchez-Arrones L., Inverardi F., Foglio B., Barone C., Kaimakis P., Martynoga B., Ottolenghi S., Studer M., Guillemot F., Frassoni C., Bovolenta P., Nicolis S.K. (2019) Sox2 acts in thalamic neurons to control the development of retina-thalamus-cortex connectivity. *Science*. **15**, 257–273.
33. Mercurio S., Serra L., Nicolis S.K. (2019) More than just stem cells: functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, e4540.
34. Kang P., Lee H.K., Glasgow S.M., Finley M., Donti T., Gaber Z.B., Graham B.H., Foster A.E., Novitsch B.G., Gronostajski R.M., Deneen B. (2012) Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron*. **74**, 79–94.
35. Cheng L.C., Pastrana E., Tavazoie M., Doetsch F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat. Neurosci.* **12**, 399–408.
36. Ambrozkiwicz M.C., Schwark M., Kishimoto-Suga M., Borisova E., Hori K., Salazar-Lazaro A., Rusanova A., Altas B., Piepkorn L., Bessa P., Schaub T., Zhang X., Rabe T., Ripamonti S., Rosario M., Akiyama H., Jahn O., Kobayashi T., Hoshino M., Tarabykin V., Kawabe H. (2018) Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. *Neuron*. **100**, 1097–1115 e1015.
37. Cheng C.C., Uchiyama Y., Hiyama A., Gajghate S., Shapiro I.M., Risbud M.V. (2009) PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J. Cell. Physiol.* **221**, 668–676.
38. Pataskar A., Jung J., Smialowski P., Noack F., Calegari F., Straub T., Tiwari V.K. (2016) NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *EMBO J.* **35**, 24–45.
39. Chen Y.C., Ma N.X., Pei Z.F., Wu Z., Do-Monte F.H., Keefe S., Yellin E., Chen M.S., Yin J.C., Lee G., Miner-Toribio A., Hu Y., Bai Y.T., Lee K., Quirk G.J., Chen G. (2020) A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion. *Mol. Ther.* **28**, 217–234.
40. Kumamoto T., Hanashima C. (2017) Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development. *Dev. Growth Differ.* **59**, 258–269.
41. Hanashima C., Li S.C., Shen L., Lai E., Fishell G. (2004) Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science*. **303**, 56–59.
42. Kumamoto T., Toma K., Gunadi, McKenna W.L., Kasukawa T., Katzman S., Chen B., Hanashima C. (2013) FoxG1 coordinates the switch from nonradially to radially migrating glutamatergic subtypes in the neocortex through spatiotemporal repression. *Cell Rep.* **3**, 931–945.
43. Reemst K., Noctor S.C., Lucassen P.J., Hol E.M. (2016) The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front. Hum. Neurosci.* **10**, 566.
44. Ahlgren S., Vogt P., Bronner-Fraser M. (2003) Excess FoxG1 causes overgrowth of the neural tube. *J. Neurobiol.* **57**, 337–349.
45. Hatton B.A., Knoepfler P.S., Kenney A.M., Rowitch D.H., de Alboran I.M., Olson J.M., Eisenman R.N. (2006) N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* **66**, 8655–8661.
46. Wey A., Knoepfler P.S. (2010) C-myc and N-myc promote active stem cell metabolism and cycling as architects of the developing brain. *Oncotarget.* **1**, 120–130.
47. Bird C.M., Burgess N. (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 182–194.

Zbtb33 GENE KNOCKOUT CHANGES TRANSCRIPTION OF THE *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* AND *FoxG1* GENES IN THE DEVELOPING MOUSE BRAIN

**N. B. Illarionova^{1,*}, M. A. Borisova¹, E. Yu. Bazhenova¹,
D. S. Zabelina², D. V. Fursenko³, and A. V. Kulikov¹**

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

*e-mail: nina.illarionova@gmail.com

The transcription factor KAISO is important for proper development of animal embryos. In the cell, KAISO regulates cell division and apoptosis. KAISO is abundant in the central nervous system. Here we describe the effects of the *Zbtb33* gene knockout on the transcription of several genes that regulate the development of the central nervous system, including *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1* and *FoxG1*. These genes are related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway, which is closely connected to KAISO. Hippocampus, frontal cortex, and striatum tissues of C57BL/6j mice with a knockout in the *Zbtb33* gene encoding KAISO (ZBTB33⁻) and wild-type mice (ZBTB33⁺) were collected and profiled at different stages of development. Age-dependent and region-specific differences in the mRNA levels of the *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1* genes in the developing brain of ZBTB33⁻ and ZBTB33⁺ mice were described and discussed.

Keywords: Kaiso, Wnt/ β -catenin signaling, *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1*, Real-time PCR, mouse, hippocampus, striatum, frontal cortex