

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Каплун Дарьи Сергеевны
на тему: «Поиск и характеристика новых механизмов влияния белка
Kaiso на метилирование ДНК»
по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ: Диссертационная работа Каплун Дарьи Сергеевны посвящена изучению функций белка Kaiso. Этот белок весьма интересен. В его состав входят цинковые пальцы, способные узнавать метилированную ДНК, а также ВТВ/POZ домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия. Связываясь с метилированной ДНК, Kaiso также может влиять на метилирование. Интересно также, что в клетках присутствует в больших количествах сумоилированная форма белка Kaiso. Данное исследование также направлено на изучение функциональной роли этой модификации.

Исследование функции белков, а тем более ДНК-связывающих белков – регуляторов транскрипции это основа нашего понимания развития и функционирования живых существ. Подобного рода исследования совершенно незаменимы для того, чтобы человечество прошло путь к полному пониманию всех деталей того, как геном определяет функционирование организма.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: В диссертационной работе были использованы несколько современных методов молекулярной и клеточной биологии, редактирования генома. Использование современных методов в отношении нового объекта, белка Kaiso, дает необходимую новизну, равно как и научную достоверность результатов. В диссертационной работе мы встречаем очень удачное сочетание методов системной биологии, таких, как анализ транскриптома, полногеномное бисульфитное секвенирование, т.е. анализ метилома, иммунопреципитацию хроматина и методов, нацеленных

на проверку конкретных гипотез – редактирование генов, иммуноблоттинг, генетическую комплементацию, нокаут и нокдаун, иммунопреципитацию. В пользу необходимой научной новизны говорят также и научные публикации, опубликованные по результатам работы в известных рецензируемых научных журналах. Таким образом, и новизна и достоверность результатов оказывается независимым образом подтверждена международным научным рецензированием.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: на мой взгляд, любая работа, приближающая нас к пониманию функционирования живых систем, имеет наивысшую практическую значимость, ибо такое понимание и только оно приведет нас к возможности менять и даже создавать живые существа с заданными свойствами. В более узком понимании практической значимости, данная работа также существенна, поскольку роль Kaiso связана с эффективностью перепрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Очевидно, что этот процесс имеет широчайшие возможности для практического применения в регенеративной медицине.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Дарьи Сергеевны Каплун написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов экспериментов, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 116 страницах и содержит 48 оригинальных рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает в себя 267 библиографических ссылок.

Обзор литературы энциклопедичен и посвящен процессу и функциональной роли метилирования ДНК. Мне весьма понравилось структурированное и полное изложение материала. Описаны ДНК-метилтрансферазы млекопитающих, включая неактивные и регуляторные изоформы, и даже РНК-метилтрансферазы, родственные ДНК-метилтрансферазам. Далее, подробнейшим образом изложены сведения о белках млекопитающих, связывающих метилированную ДНК. Описана

доменная организация этих белков и функциональная роль, как правило в установлении репрессированного состояния хроматина. Разумеется, более подробно описаны белки, связывающие метилированную ДНК и содержащие домены цинковых пальцев, к которым и принадлежит белок Kaiso, основной объект исследования диссертационной работы.

Обзор очень информативен, достаточен, но не избыточен. Его легко читать и можно использовать в качестве справочного материала, если потребуются получить сведения о белках, участвующих в установлении метилирования ДНК или прочтении этой эпигенетической отметки. Излишне говорить, что обзор отлично подготавливает читателя к восприятию экспериментальной части диссертации.

Материалы и методы написаны очень подробно. Эта часть диссертации позволяет понять все, что было сделано автором, и при необходимости воспроизвести эксперименты.

В главе “Результаты экспериментов” автор приводит описание полученных экспериментальных данных. Исследование начинается с анализа участков дифференциального метилирования ДНК мышинных эмбриональных фибробластов, полученных от мышей дикого типа и нокаутных по гену Kaiso. Хотя в целом при инактивации Kaiso паттерн метилирования нарушается как в сторону повышенного, так и пониженного метилирование различных областей, среди участков с нарушенным метилированием можно заметить несколько интересных закономерностей. Например, оказалось, что при инактивации Kaiso менее метилированы промоторные участки генов, отвечающих за поддержания плюрипотентного состояния. Таким образом, клетки с инактивацией Kaiso, были, простите за упрощение, как бы ближе к плюрипотентному состоянию. Автор работы вполне разумно предположила, что в таком случае нокаутные по Kaiso клетки будут, возможно, легче подвергаться репрограммированию в индуцированные плюрипотентные клетки. И действительно, так и оказывается при индукции плюрипотентности факторами Яманаки двумя различными способами. Одним из возможных

возможно как следствие, к изменению модификации гистонов также определяющих активацию и репрессию транскрипции, соответственно. Чтобы ответить на вопрос о возможном механизме повышения уровня метилирования при связывании Kaiso с ДНК, был поставлен эксперимент по копреципитации Kaiso с ДНК-метилтрансферазами, показавший, в соответствии с предположением, совыделение Kaiso и *de novo* ДНК метилтрансфераз DNMT3a и DNMT3b.

Наконец, было замечено, что фактор KLF4, известный своей способностью привлекать ДНК деметилирующие ферменты TET семейства, также имеет участок связывания в промоторной области TRIM25. Инактивировав оба гена (Kaiso и KLF4), Дарья Сергеевна показала, что в соответствии с предположением, KLF4 отвечает за деметилирование промотора TRIM25 при инактивации Kaiso.

Работа Дарьи Сергеевны Каплун "Поиск и характеристика новых механизмов влияния белка Kaiso на метилирование ДНК" выполнена на высоком научном уровне. Об этом свидетельствует не только текст и иллюстрации самой диссертации, но и список публикаций автора в хороших российских и международных журналах. По результатам работы опубликовано 4 статьи.

Как и во всякой интересной работе, в данной диссертации можно обнаружить некоторые недостатки. Работа содержит некоторое количество опечаток и неточностей, что не портит общего хорошего впечатления от работы.

Конкретные замечания перечислены ниже:

Рисунок 16, панель Б. Представлены результаты генотипирования эмбрионов дикого типа и нокаутных по гену Kaiso мышей (в 3-х повторах). WT -клетки дикого типа, KO - Kaiso нокаутные клетки. Я вижу на рисунке две группы по 4 дорожки, в которых есть пары дорожек, содержащих ПЦР-продукт и не содержащих. Где там три повтора и почему в одной группе (WT и KO) различаются результаты я не понимаю.

подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – «молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Каплун Дарья Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,

ПРОФЕССОР кафедры ХПС химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

ОРГ. ПРАВ.ФОРМА «75103 (Федеральные государственные бюджетные учреждения)

СЕРГИЕВ Петр Владимирович

28.02.2023

Контактные данные:

тел.: 7(916)1114744, e-mail: petya@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40,

МГУ имени М. В. Ломоносова, химический факультет

Тел.: +7 (495) 9395418; e-mail: petya@genebee.msu.ru

