

**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 диссертационной работы.**

Метилирование ДНК является важным эпигенетическим механизмом, при котором наследственные изменения экспрессии генов происходят без изменения последовательности ДНК. Основные эпигенетические механизмы включают воздействие малых некодирующих РНК, ремоделирование структуры хроматина, модификация гистонов и метилирование ДНК. Дисбаланс в метилировании ДНК широко наблюдался при многих типах рака и при других сложно наследуемых заболеваниях. В регуляции уровня метилирования ДНК вовлечены разные факторы, среди которых принципиально важны метил-ДНК-связывающие белки (methyl DNA binding proteins), к которым относится белок Kaiso, транскрипционный репрессор.

Актуальность темы диссертации Каплун Д.С. не вызывает сомнения как с точки зрения проблематики, так и объекта исследования. Выявление и определение характера влияния белка Kaiso на профиль метилирования ДНК в соматических клетках и в раковых клетках Саки-1 крайне важны для правильного понимания регуляции метилирования в клетке. Кроме того, эти сведения могут быть полезными для разработки терапии заболеваний, связанных с изменением профиля метилирования. В работе предложены новые механизмы влияния Kaiso на метилирование ДНК.

Таким образом, исследование механизмов влияния белка Kaiso на метилирование ДНК, является не только актуальной проблемой, но и имеет несомненную теоретическую и практическую значимость.

**Научная новизна диссертационной работы** Каплун Д.С. бесспорна. Автором получены совершенно оригинальные и высоко научно значимые результаты. Диссертантом впервые идентифицированы участки ДНК, изменившие уровень метилирования в мышинных эмбриональных фибробластах нокаутных по гену *Kaiso*. Причем, обнаружены как гипо-, так и гиперметилированные участки. Среди гипометилированных участков были найдены промоторы генов, вовлеченных в регуляцию и поддержание статуса плюрипотентности, в том числе промотор *Oct4*.

Каплун Д.С. впервые показано, что нокаут *Kaiso* повышает эффективность репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, что сопряжено с увеличением пролиферативной активности клеток.

Способность *Kaiso* регулировать метилирование ДНК подтверждена на линии клеток светлоклеточного рака почки человека *Saki-1*. Удаление *Kaiso* с помощью CRISPR/Cas9 редактирования генома приводит к статистически значимому гиперметилированию всего генома клеточной линии *Saki-1*. Однако при удалении *Kaiso* найдены как гиперметилированные участки (обогащены в промоторах и 5'UTR-районах), так и гипометилированные участки (обогащены в энхансерах, интронах, 3'UTR и промоторах генов плюрипотентности).

Впервые было показано, что *Kaiso* может входить в один комплекс с *de novo* ДНК метилтрансферазами DNMT3a/b. Для формирования такого комплекса достаточно ВТВ/POZ домена *Kaiso*.

Впервые показано, что KLF4 играет ключевую роль в деметилировании гена-мишени *Kaiso* TRIM25. Сдвиг рамки в гене KLF4 одновременно с *Kaiso* не привел к снижению метилированию промотора TRIM25, как это наблюдалось в *Kaiso* дефицитных клетках.

**Теоретическая и практическая значимость результатов** диссертационной работы не вызывают сомнения. Проведенный анализ

влияния белка Kaiso на профиль метилирования позволил предложить модель молекулярной регуляции процесса метилирования ДНК, как в соматических, так и раковых клетках. Полученные данные о влиянии Kaiso на метилирование промоторов факторов плюрипотентности и эффективность соматического репрограммирования могут быть использованы в дальнейших исследованиях дедифференцировки клеток, например, в опухолях.

**Структура и объем диссертационной работы.** Диссертационная работа Каплун Д.С. изложена на 119 страницах и включает 6 таблиц и 48 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, основных выводов, списка сокращений, списка использованной литературы. Список литературы состоит из 267 источников.

Во ***Введении*** диссертантом изложена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи работы, дается краткое обоснование актуальности исследования и степень разработанности данной темы.

***Глава 1 (Обзор литературы)*** хорошо структурирована и содержит информацию о механизмах метилирование ДНК и об основных белках, осуществляющих регуляцию данного процесса. Дополнительный акцент сделан на гистоновые модификации, которые имеют значение при регуляции транскрипции генов. Завершается обзор литературы описанием метил-ДНК-связывающих белков, к которым относится объект исследования. Обзор читается с огромным интересом, он очень полезен для коллег из смежных областей науки.

***В главе 2 (Материалы и методы)*** приведены описание 28 методик исследования и сведения об используемых клеточных линиях. В работе были полученные с помощью редактирования CRISPR/Cas9 клеточные линии нокаутные по гену Kaiso или содержащие несумоилированную форму белка. Стоит отметить, высокий методологический уровень при использовании этой новейшей и очень эффективной технологии CRISPR/Cas9 редактирования

генов и геномов, а также при анализе метилирования и экспрессии генов. Для получения достоверных результатов крайне важен правильный сбор материала, все опыты и образцы должны быть в единых условиях и в нескольких повторах, что позволило диссертанту впервые наиболее точно оценить влияние белка Kaiso на репрограммирование мышинных эмбриональных фибробластов.

В целом методическая часть отражает хорошее владение диссертантом современными методами молекулярной биологии. Применяемые методы адекватны поставленным целям и задачам. Важно отметить, что эта часть отражает огромную методическую работу, выполненную диссертантом для решения поставленных задач.

*Глава «Результаты экспериментов»* содержит 3 раздела, включающие суммарно 10 подразделов. В первом разделе доказано, что Kaiso регулирует метилирование генов, которые обеспечивают плюрипотентность. Во втором разделе описаны получение и характеристика клеток рака почки человека Saki-1 со сдвигом рамки считывания в гене *Kaiso*. При этом установлено, что инактивация белка Kaiso приводит к изменению профиля метилирования ДНК в клетках человека, а также, что белок Kaiso защищает промоторы и CpG островки от гиперметилирования и энхансеры от гипометилирования, а при удалении Kaiso, CpG, расположенные в участках связывания факторов Kaiso, Nanog и Oct4, гипометилированы.

Отдельный интерес представляет последний третий раздел, в котором рассмотрена роль несумоилированной формы белка Kaiso и ее влияние на метилирование и транскрипцию гена-мишени Kaiso. В данном разделе описан также один из возможных механизмов влияния белка Kaiso на метилирование ДНК.

В целом *глава «Результаты экспериментов»*, как и вся работа, производит хорошее впечатление целостного научного исследования,

полученные данные сопоставлены с результатами исследований других авторов.

Глава *Заключение* содержит в краткой форме изложение и обсуждение основных полученных результатов.

**Выводы** полностью подкреплены представленными экспериментальными данными.

Ценно, что автор смог сделать обобщающий вывод о том, что полученные результаты в совокупности вносят важный вклад в раскрытие механизмов, поддерживающих гомеостаз метилирования ДНК у млекопитающих, определяя Kaiso как новый регулятор этого процесса. Не каждому диссертанту удаётся в заключение четко суммировать и обобщить свои результаты.

Содержание *авторезферата* соответствует содержанию диссертационной работы.

В целом новизна и достоверность полученных данных, обоснованность научных положений, изложенных в диссертационной работе, а также обоснованность выводов, сделанных на основе полученных результатов, не вызывают сомнений.

Автором внесён значительный вклад в понимание роли белка Kaiso в процессах метилирования ДНК и функционально различающихся участков генов и геномов.

Полученные результаты могут послужить хорошей основой для рассмотрения Kaiso в качестве потенциальной новой мишени для создания лекарственных средств от заболеваний, прогрессия которых связана с изменением метилирования ДНК.

**Однако работа не лишена некоторых недостатков.**

1. В диссертации описан функциональный анализ генов, которые снизили свой уровень метилирования в мышечных эмбриональных

фибробластах, но не представлен анализ генов, повысивших уровень метилирования.

2. Работа содержит некоторое количество опечаток и неточностей. Например, в оглавлении пропущены пункты 4.14-4.17. Однако это не портит хорошего впечатления от данной работы.

3. На рисунках 4, 22, 32, 38 присутствуют некоторые подписи на английском языке, что не совсем корректно.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам 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:

Профессор, главный научный сотрудник  
лаборатории патогеномики и транскриптомики  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Брага Элеонора Александровна



01.03.2023г.

Контактные данные:

7 499-151-17-56, e-mail: niiorp@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:  
03.01.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:  
125315, Балтийская ул., дом 8, Москва,  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП»)  
Тел.: 7 499-151-17-56, e-mail: niiopp@mail.ru

Подпись сотрудника ФГБНУ «НИИОПП»  
Э.А. Браги удостоверяю:  
Директор ФГБНУ «НИИОПП»  
Чл.-корр. РАН Морозов С.Г.

