

ОТЗЫВ

официального оппонента Варижук Анны Михайловны
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 диссертационного исследования

Наряду с другими транскрипционными регуляторами семейства цинковых пальцев, Kaiso представляет несомненный интерес как потенциальная терапевтическая мишень, диагностический или прогностический маркер. Недавние исследования указывают на характерные для некоторых патологий особенности внутриклеточного распределения Kaiso, его тесную связь с p53-зависимой регуляцией апоптоза и др. Достаточно активно изучается роль Kaiso в развитии агрессивных форм рака груди, но окончательных выводов о корреляции представленности данного белка или мРНК с прогрессией опухоли сделать не удается. Работы в этой области ограничены отсутствием понимания механизмов регуляции генной экспрессии данным белком, в особенности его вклада в транскрипцию генов, отвечающих за пролиферацию клеток. Ключевым аспектом в этом вопросе является связь Kaiso с CpG-метилированием промоторных и энхансерных участков. Накопившиеся за последние два десятилетия свидетельства чувствительности Kaiso к метилированию сайтов связывания и, в то же время, его способности менять профиль метилирования требовали дополнения и систематизации. Таким образом, поставленная в диссертационной работе задача прояснения молекулярных основ влияния Kaiso на метилирование ДНК крайне актуальна.

Помимо эпигенетической терапии онкозаболеваний изменение метилирования ДНК имеет первостепенное значение при репрограммировании дифференцированных клеток в стволовые. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с использованием набора белковых факторов С. Яманаки и К. Такахаси открыло новые возможности в персонализированной клеточной терапии и позволило создать адекватные клеточные модели для мониторинга развития широкого спектра патологий. Эффективность репрограммирования и последующей контролируемой дифференцировки во многих

случаях оставляет желать лучшего. Для оптимизации метода необходимо иметь представления об этапах, обратимости и мастер-регуляторах всего процесса. Учитывая многоплановую регуляторную роль Kaiso, его влияние на эффективность эпигенетического репрограммирования клетки заслуживает подробного анализа.

Новизна и научно-практическая значимость

В диссертационной работе был установлен вклад Kaiso в подавление генов, кодирующих факторы плюрипотентности, посредством поддержания метилирования их промоторных участков, что в итоге определяет сдерживание пролиферации клеток и снижает эффективность их репрограммирования. Эти результаты получены впервые и имеют очевидную практическую значимость для оптимизации клеточных технологий на основе ИПСК.

Представленные в диссертации данные об опосредованном взаимодействии Kaiso с *de novo* ДНК-метилтрансферазами DNМ3а/б, его роли в метилировании CpG энхансеров, конкуренции с фактором KLF4, привлекающим диоксигеназы TET, и активного (TET1-зависимого) деметилирования CpG в отсутствие Kaiso имеют фундаментальную значимость. Они складываются в непротиворечивую картину, приближая нас к цельному видению механизмов установления и контроля профиля метилирования ДНК.

Показанная в работе роль Kaiso в поддержании гипометилирования CpG-островков заслуживает отдельного упоминания и, вероятно, дальнейших исследований. Окончательное прояснение механизмов регуляции метилирования позволит более точно предсказывать эффекты разрабатываемых эпигенетических лекарств и отбирать новые перспективные мишени эпигенетической терапии. На основании представленных данных можно предварительно констатировать целесообразность разработки и тестирования препаратов, модулирующих активность Kaiso либо его посттрансляционные модификации (сумоилирование).

Таким образом, новизна и научная ценность результатов не вызывают сомнений, а вероятной областью их практического применения является эпигенетическая противоопухолевая терапия.

Достоверность результатов, положений и выводов

Достоверность полученных результатов определяется четкой методологией исследования, рациональным выбором подходов и их надежностью методов. Используются известные валидированные методы; эксперименты выполнены в нескольких повторах с

необходимыми контролями, статистический анализ данных выполнен корректно. Стоит отметить, что доступные на сегодняшний день технологии анализа эпигенетического профиля имеют ограничения, и лишь комбинация нескольких взаимодополняющих технологий позволила достаточно полно раскрыть тему в рамках каждой задачи. Например, для полногеномного анализа влияния нокаута *Kaiso* на CpG-метилирование использован метод ограниченного бисульфитного секвенирования CpG-богатых областей. Это позволило выявить общую закономерность по итогам анализа представленности функциональных категорий для генов с дифференциально метилированными промоторами, а именно установить характерное гипометилирование промоторов генов, ассоциированных с плюрипотентностью. Для промоторов ключевых факторов плюрипотентности, не попадающих в категорию CpG-богатых, был выполнен таргетный анализ бисульфитным методом. Совокупность результатов данных серий экспериментов позволила объяснить влияние *Kaiso* на эффективность репрограммирования и пролиферацию клеток, которые, в свою очередь, убедительно продемонстрированы стандартными методами. Таким образом, основные положения и выводы согласуются между собой, подкреплены большим экспериментальным материалом и представляются полностью обоснованными.

Структура и содержание диссертации

Диссертация построена традиционно. Вводный раздел посвящен обоснованию актуальности, новизны и значимости работы, в нем также сформулированы цели и задачи исследования, представлена информация об апробации и т.д. В главе "Обзор литературы" отражен современный уровень развития эпигенетики, акцент сделан на исследованиях метилирования и активного деметилирования ДНК и роли этих процессов в клеточном репрограммировании. Глава завершается анализом связи метилирования с транскрипцией, обобщены данные по влияющим на метилирование транскрипционным факторам и белкам-интерпетаторам метилирования.

В главе "Материалы и методы" изложены протоколы получения мышей, нокаутных по гену *Kaiso*, и фибробластов из мышинных эмбрионов; протоколы культивирования эмбриональных мышинных фибробластов, ИПСК, а также условно-нормальных и раковых клеток человека HEK293(T) и Saik-1. Подробно описаны методы, использованные для анализа CpG-метилирования в мышинных фибробластах, репрограммирования фибробластов в ИПСК и оценки влияния инактивации *Kaiso* на эффективность репрограммирования клеток/пролиферацию. Приведены протоколы инактивации *Kaiso*, а также получения его мутантной формы, не подверженной сумоилированию, в клетках человека с последующим анализом изменений CpG-метилирования, транскрипционного

профиля и (на примере промотора гена *TRIM25*) модификаций гистонов в промоторе. Также представлены протоколы экспериментов, выполненных для проверки взаимодействия/конкуренции с *Kaiso* с ДНК-метилтрансферазами и активатором деметилирования *KLF4* и др.

Глава “Результаты экспериментов” включает три раздела. В первом представлены данные, объясняющие “сдерживающую” роль *Kaiso* в репрограммировании, а именно его значимость для поддержания метилирования генов плюрипотентности (на примере мышечных клеток). Во втором разделе проанализированы изменения метилирования генома человека при инактивации *Kaiso* и установлена противоположная роль *Kaiso* в CpG-островках и энхансерах – защита от гипер- и гипометилирования соответственно. В третьем разделе раскрываются связь *Kaiso* с ключевыми регуляторами метилирования, а именно опосредованное взаимодействие с *de novo* ДНК-метилтрансферазами и конкуренция с активатором деметилирования *KLF4*, что объясняет большую часть наблюдаемых изменений при инактивации гена *Kaiso*. Также в третьем разделе показана роль сумоилирования *Kaiso*. Установлено, что именно сумоилированная форма может вызывать гиперметилирование и способствовать инактивирующей транскрипции модификации гистонов, что продемонстрировано на примере промотора *TRIM25*. Все ключевые результаты также отражены в автореферате и обобщены в положениях, выносимых на защиту.

Замечания

1. В тексте диссертации имеется некоторое количество опечаток и ошибок в нумерации литературных источников. Например, в главе “Материалы и методы” при описании метода ChIP-seq диссертант ссылается на работу [26], которая представляет собой обзор и не содержит протокола иммунопреципитации. Также при интерпретации транскриптомных данных анализ функциональных категорий (GSEA) с предварительным ранжированием генов по кратности изменения, скорее всего, выполнялся в соответствии с рекомендациями работы 2005 г. [PNAS 2005, 102: 15545]. В диссертации указана иная ссылка – [25].

2. При обсуждении данных, показанных на Рисунке 14, либо в экспериментальной части стоило более полно описать расчет уровней метилирования и критерии объединения единичных дифференциально метилированных CpG в DMR. По-видимому, участки с низким покрытием и вариациями между репликами выше критического значения были исключены из анализа. Это следовало прописать, даже если были использованы дефолтные

параметры программы обработки данных. Положение границ DMR в некоторых случаях неочевидно. Например, на верхней панели Рис. 14 (промотор Hand1) DMR будто бы заходит в область нулевого покрытия.

3. Представлен функциональный анализ генов под контролем промоторов и иных регуляторных областей, являющихся гипометилированными в клетках, нокаутных по гену *Kaiso*. Для полноты картины желательно было бы провести функциональный анализ генов под контролем гиперметилированных промоторов. Как следует из рис. 12, их доля существенна.

4. Встречаются недочеты оформления. В оглавлении пропущены пункты 4.14-4.17. Таблица 5 не является таблицей, в ней содержится лишь список генов. На Рис. 15 в правой панели стоило привести планки погрешности. На Рис. 16Б не подписаны дорожки 1-4 в геле. Указано только, что они соответствуют трем повторам. В подписи к Рис. 18. не указано, чему соответствует планка масштаба. Там же недостает отрицательного контроля – например, клеток, трансфицированных плазмидой с доксициклин-индуцируемой кассетой факторов Яманаки, не обработанных доксициклином, - для иллюстрации качественной блокировки, отмывки и т.д.

5. В главе “Материалы и методы” стоило более четко разграничить технические повторы и биологические. В целом глава структурирована небезупречно. В разделе, посвященном иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием, указаны только антитела к маркерам энхансеров/промоторов H3K27ac. Трудно понять, на каком этапе были выполнены эти эксперименты. Вероятно, таким образом были картированы промоторы и энхансеры при отсутствии необходимых данных в ENCODE и иных БД. Анализ другой модификации гистонов – H3K9me3, выполненный, по-видимому, методом ChIP-qPCR, не описан отдельно, хотя большую часть информации можно получить из разделов “Антитела” и “Имунопреципитация”.

Замечания не снижают общей ценности работы. Диссертация Дарьи Сергеевны представляет собой законченное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Работа отличается глубиной и цельностью. Она грамотно спланирована и хорошо написана.

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:

доктор химических наук,

заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Варижук Анна Михайловна

Дата: 09 марта 2022 г.

Контактные данные:

Тел.: +7 (916) 502-7832, E-mail: annavarizhuk@rcrcm.org

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Адрес места работы:

119435, Российская Федерация, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Лаборатория структуры и функций биополимеров

Тел.: +7 (499) 246-4409, E-mail: annavarizhuk@rcrcm.org

Подпись удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «Федеральный научно-клинический центра физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Лихнова Ольга Петровна, к.б.н.



Дата: 09 марта 2022 г.