

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*

**Каплун Дарья Сергеевна**

**Поиск и характеристика новых механизмов влияния белка  
Kaiso на метилирование ДНК**

1.5.3 – Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва - 2023**

Диссертация выполнена в лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных Института Биоинженерии им. К.Г. Скрыбина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Научный руководитель** *Женило Светлана Валерьевна, кандидат физико-математических наук*

**Официальные оппоненты** **Сергиев Петр Владимирович**, д.х.н., профессор РАН, чл.-корр. РАН, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, профессор кафедры химии природных соединений.

**Варижук Анна Михайловна**, д.х.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства имени академика Ю.М. Лопухина», заведующий лабораторией структуры и функций биополимеров.

**Брага Элеонора Александровна**, д.б.н., профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», главный научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики.

Защита диссертации состоится «23» марта 2023 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. 389.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/534474986/>

Автореферат разослан «\_\_» февраля 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Метилирование ДНК является механизмом регуляции активности генов без изменения нуклеотидной последовательности, которое происходит по 5-му положению в цитозине. Оно вовлечено в установление импринтинга, X инактивацию, регуляцию транскрипции генов и сплайсинга. Основные изменения метилирования ДНК происходят в процессе развития организма и дифференцировки клеток. Дифференцированные клетки характеризуются стабильным профилем метилирования ДНК, который может изменяться в зависимости от внешних условий, старении и при различных патологических состояниях (Velasco et al. 2018; Sun et al. 2014; X. Wang et al. 2019; Salameh, Bejaoui, and El Hajj 2020; Nishiyama and Nakanishi 2021). Например, динамическое изменение метилирования ДНК в дифференцированных клетках обнаружено в нейронах при обучении и формировании синапсов (Hwang and Zukin 2018; Day and David Sweatt 2010). Также уровень метилирования ДНК напрямую регулирует способность многих транскрипционных факторов связываться с ДНК. Причем транскрипционные факторы могут не только влиять на транскрипцию, но и участвовать в регуляции метилирования ДНК. Поэтому такие белки являются потенциальными мишенями для лечения заболеваний, причиной которых является изменение метилирования ДНК.

Хорошо известно, что белки, имеющие цинковые пальцы, часто выступают не только в роли транскрипционных регуляторов, но и как факторы, влияющие на профиль метилирования ДНК (Yin et al. 2017; Tullius and Parker 2013). Kaiso является транскрипционным фактором, который может связываться цинковыми пальцами как с метилированными, так и с неметилированными последовательностями (Prokhortchouk 2001; Daniel 2002). Этот белок участвует в прогрессировании рака, контроле клеточного цикла, воспалительных процессах, апоптозе и WNT сигнальном пути, регулирует метилирование локуса в импринтированном районе IGF2/H19 (Koh et al. 2014; Raghav et al. 2012; Yoon et al. 2003). В данной работе исследуется влияние Kaiso на профиль метилирования ДНК, как в соматических клетках, так и в раковых клетках Saki-1, предложены механизмы влияния Kaiso на метилирование ДНК. Определение роли метил-ДНК связывающего белка Kaiso в регуляции гомеостаза метилирования ДНК позволит не только выявить его новые функциональные особенности, но и в дальнейшем рассматривать в качестве терапевтической мишени. Это определяет актуальность данной работы.

**Степень разработанности темы.** Метил-ДНК связывающий белок Kaiso играет роль, как репрессора, так и активатора транскрипции. Его активационные способности связаны с посттрансляционной модификацией по 42 лизину в ВТВ/POZ домене убиквитин подобным белком SUMO. Репрессионная активность Kaiso регулируется привлечением корепрессионных комплексов NCoR, SMRT, в состав которых входят гистодацетилазы. Обычно Kaiso рассматривался как транскрипционный регулятор, однако в работе 2016 года Флорана Боне было показано, что в фибробластах человека Kaiso важен для поддержания метилирования одного из регуляторных элементов импринтинга локуса IGF2/H19 (Bohne et al., 2016). То есть Kaiso может выступать в качестве регулятора метилирования ДНК. Это подтверждается наблюдением, что Kaiso связывается с теми же метилированными последовательностями, что и один из факторов Яманаки KLF4 *in vitro*. KLF4 участвует в деметилировании ДНК за счет привлечения ТЕТ диоксигеназ, его активность важна при репрограммировании клеток (Liu et al. 2014) (Sardina et al. 2018). А значит Kaiso потенциально может конкурировать с KLF4 за связывание с ДНК и препятствовать её деметилированию. Репрограммирование соматических клеток является одной из уникальных модельных систем, которая позволяет определить важность того или иного фактора в установлении, поддержании, интерпретации эпигенетических модификаций. Это связано с тем, что при репрограммировании клеткам приходится преодолевать, так называемый, эпигенетический барьер, меняя профиль как метилирования ДНК, так и распределения модификаций гистонов. Так, удаление метил-ДНК связывающих белков MeCP2, MBD2 способствует более эффективному репрограммированию (Lee et al., 2013, Zhang et al. 2018).

Остается неизвестным, есть ли в геноме еще участки метилирование которых зависит от экспрессии Kaiso, может ли Kaiso взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами или же конкурировать с KLF4, может ли Kaiso как эпигенетический регулятор влиять на процесс репрограммирования соматических клеток.

**Цели и задачи исследования.** Целью диссертационной работы является поиск молекулярных механизмов влияния метил-ДНК связывающего белка Kaiso на регуляцию метилирования ДНК, и характеристику участков, метилирование которых зависит от экспрессии *Kaiso*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Определить участки геномной ДНК, изменяющие уровень метилирования при удалении Kaiso;
- 2) Оценить влияние Kaiso на эффективность репрограммирования соматических клеток мышей;

3) Определить обратимость метилирования ДНК при удалении *Kaiso* и при экспрессии несумоилированной формы белка *Kaiso* (K42R);

4) Исследовать взаимодействие *Kaiso* с ДНК-метилтрансферазами;

5) Определить взаимное влияние *Kaiso* и KLF4 на метилирование промотора гена-мишени *Kaiso*.

**Научная новизна работы.** В работе впервые показано, что в мышинных эмбриональных фибробластах нокаутных по гену *Kaiso* наблюдается изменение профиля метилирования ДНК, детектируются 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*.

Показано, что нокаут *Kaiso* повышает эффективность репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), что сопряжено с увеличением пролиферативной активности клеток.

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

Использование модельной системы с мутацией сайта сумоилирования K42R позволило найти *TRIM25* как новый ген-мишень *Kaiso*. Нокаут по гену *Kaiso* обратимо снижает уровень метилирования промотора *TRIM25*, влияя на его транскрипционную активность. При этом экспрессия несумоилированной формы белка *Kaiso* (K42R) приводит к гиперметилированию и появлению модификации H3K9me3 в промоторе *TRIM25*.

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.

В совокупности, полученные результаты вносят важный вклад в раскрытие механизмов, поддерживающих гомеостаз метилирования ДНК у млекопитающих, определяя *Kaiso* как новый регулятор этого процесса.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Теоретическая значимость работы заключается в идентификации транскрипционного фактора Kaiso в качестве регулятора гомеостаза 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 учеными в исследованиях дедифференцировки клеток.

Полученные *Kaiso* дефицитные клеточные линии можно использовать в качестве экспериментальной модельной системы для изучения молекулярных механизмов, в которые вовлечен белок Kaiso, поиске новых мишеней, метилирование регуляторных областей которых регулируется Kaiso. Также они могут быть использованы для разработки терапии опухолей при светлоклеточном раке почки.

Полученные данные о Kaiso как о регуляторе гомеостаза метилирования ДНК позволяют рассматривать его в качестве потенциальной новой мишени для создания лекарств, против заболеваний, прогрессирование которых связано с изменением метилирования ДНК.

**Методология и методы исследования.** Работа выполнена на современном оборудовании с использованием современных методов молекулярной и клеточной биологии, в том числе геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9 клеточных линий человека, методов молекулярного клонирования, вестерн-блот анализа, полногеномного бисульфитного секвенирования и бисульфитного секвенирования CpG богатых районов, иммунопреципитации хроматина, коиммунопреципитации, ПЦР в реальном времени, получение мышинных эмбриональных фибробластов и их репрограммирование, получение лентивирусов и др. Для решения поставленных задач использовались современные методы биоинформатического и статистического анализа.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Нокаут по гену *Kaiso* приводит как к гипер- так и к гипометилированию участков ДНК в мышинных эмбриональных фибробластах и в клеточной линии светлоклеточного рака почки Saki-1 .

2. Нокаут по гену *Kaiso* повышает эффективность репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, что сопряжено с увеличением пролиферативной активности клеток.

3. В клеточной линии HEK293 удаление Kaiso обратимо снижает метилирование промотора *TRIM25*, повышая транскрипционную активность.

4. Экспрессия несумоилированной формы белка Kaiso приводит к увеличению метилирования и установлению гистоновой модификации H3K9me3 в промоторе *TRIM25*, а также к необратимому снижению экспрессии *TRIM25*.

5. В клеточной линии HEK293 Kaiso входит в один комплекс с *de novo* ДНК-метилтрансферазами 3A/3B, для формирования такого комплекса достаточно ВТВ/POZ домена Kaiso.

6. Удаление *KLF4* препятствует деметилированию промотора *TRIM25* при удалении *Kaiso*.

#### **Личный вклад автора**

Диссертационная работа основана на собственных данных полученных автором в период с 2016-2022 гг. Все клеточные линии, полученные методом CRISPR/Cas9 были получены лично автором. Все этапы получения мышинных эмбриональных фибробластов и их репрограммирование было проведено лично автором. В ходе работы автором проведены эксперименты, в результате которых были выявлены участки, изменяющие метилирование при удалении или мутации Kaiso и/или KLF4, охарактеризовано взаимодействие Kaiso с ДНК-метилтрансферазами.

#### **Степень достоверности данных**

Результаты получены современными, молекулярно-биологическими и биоинформатическими методами. Все экспериментальные группы содержали не менее трёх биологических повторов. Для всех результатов был проведен статистический анализ, показана значимость наблюдаемых отличий. По материалам данной работы опубликовано 4 статьи в журналах в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности молекулярная биология и сделано 5 докладов на всероссийских и международных конференциях.

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах, в том числе в *Cell Death Differentiation* (Q1, IF=12.067), *Biochemistry (Moscow)* (Q2, IF), *International Journal of Molecular Sciences* (Q1), *Acta Naturae* (Q3).

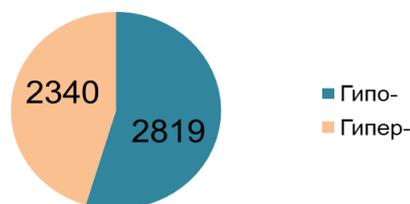
**Апробация результатов.** Полученные результаты были представлены и обсуждены на конференциях: FEBS Congress — 2017 в Иерусалиме, Израиль; Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» — 2017 в Москве, Россия; FEBS Congress — 2018 в Праге, Чехия; FEBS Congress — 2019 в Кракове, Польша, Россия; FEBS Congress — 2022 в Лиссабоне, Португалия.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список работ, опубликованных по теме диссертации, и список использованной литературы. Работа содержит 48 оригинальных рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает в себя 267 библиографических ссылок.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

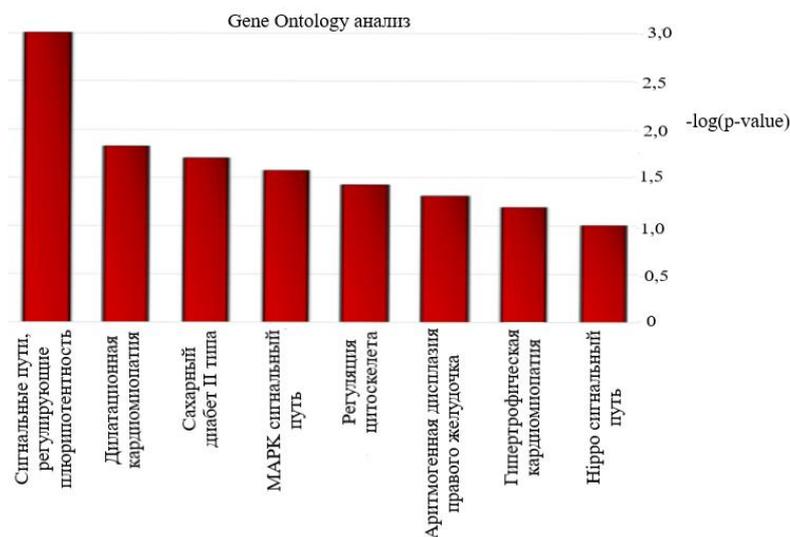
### **Kaiso регулирует метилирование генов, которые обеспечивают плюрипотентность**

Для оценки изменения уровня метилирования ДНК при удалении *Kaiso* были получены МЭФ из линий C57BL6 (*Kaiso*<sup>+y</sup>) и C57BL6 (*Kaiso*<sup>-y</sup>). Анализ метилирования ДНК из этих клеток проводили методом бисульфитного секвенирования CpG-богатых участков (RRBS), который позволяет определить метилирование CG богатых областей, но при этом его применение ограничено в отношении профилирования областей CG “бедных” районов (Vock et al. 2010). При анализе данных были найдены дифференциально метилированные CpG-динуклеотиды, которые были объединены в дифференциально метилированные регионы (DMR). Затем был проведен анализ генов, в промоторных областях которых наблюдалось изменение дифференциального метилирования. Было найдено 2819 дифференциально метилированных участков гипометилированных в нокаутных клетках по сравнению с диким типом, из них 12% расположены в промоторных областях генов. 2340 участков были гиперметилированы в нокаутных клетках по сравнению с диким типом, 7% которых расположены в промоторных областях (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Количество гипер- и гипометилированных DMR в мышечных эмбриональных фибробластах в нокаутных по гену *Kaiso* клетках по сравнению с диким типом.

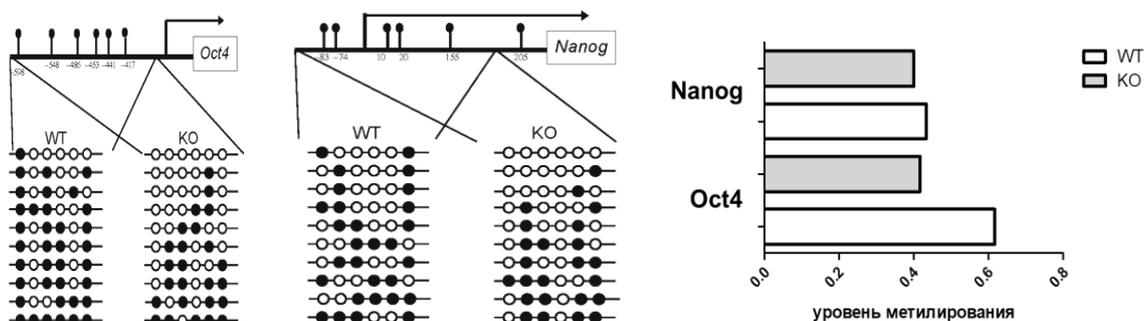
Анализ функциональных категорий промоторных участков показал, что гипометилированные промоторы генов представлены генами, вовлеченными в регуляцию и поддержание статуса плюрипотентности клетки (Рис. 2).



**Рисунок 2.** Анализ функциональных категорий генов промоторы, которых гипометилированы в *Kaiso* КО МЭФ. По оси абсцисс отложен  $-\log(p\text{-value})$  точного теста Фишера (логарифмическая шкала).

Снижение уровня метилирования в клетках с нокаутом *Kaiso* наблюдалось в промоторных и регуляторных областях 21-ого гена, участвующих в процессе репрограммирования соматических клеток в ИПСК.

Отдельно был проведен анализ метилирования промоторов генов *Oct4* и *Nanog*, вовлеченных в установление и поддержание статуса плюрипотентности, которые не попали в анализ ограниченного бисульфитного секвенирования. Целевое бисульфитное секвенирование показало снижение уровня метилирования на 23% в нокаутных клетках по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом в промоторе гена, вовлеченного в раннюю стадию репрограммирования, *Oct4*. Для фактора *Nanog*, играющего роль на поздних стадиях репрограммирования, уровень метилирования статистически значимо не изменился, однако наблюдались изменения метилирования по отдельным позициям CpG (Рис 3).



**Рисунок 3.** Метилирование промоторной области гена *Oct4* снижается в МЭФ нокаутных по гену *Kaiso*. Схематически представлены результаты таргетного бисульфитного анализа промоторной области *Oct4* и *Nanog*.

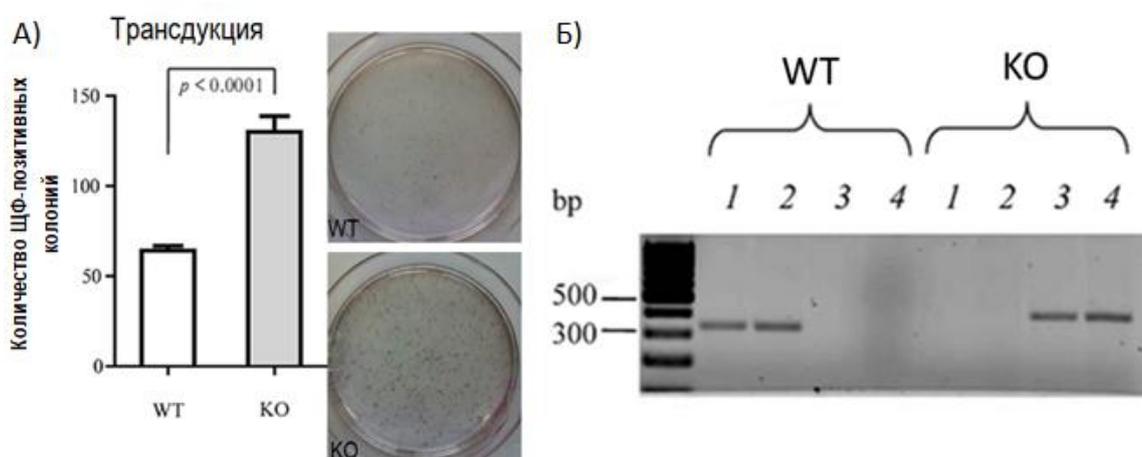
Таким образом, *Kaiso* нокаутные клетки изначально содержат сниженный уровень метилирования промоторов генов, вовлеченных в поддержание статуса плюрипотентности.

Учитывая, что метилирование ДНК является одним из препятствий, ограничивающим скорость во время репрограммирования клеток (Z. Wang et al. 2019), было предположено, что эффективность репрограммирования МЭФ в ИПСК будет изменена в клетках нокаутных по гену *Kaiso*, которые исходно имеют модифицированный “ландшафт метилирования” ДНК.

Для проверки этой гипотезы было проведено репрограммирование МЭФ в ИПСК с помощью лентивирусной трансдукции с использованием доксициклин-индуцируемой кассеты, кодирующей факторы Яманака (*Oct4*, *Sox2*, *KLF4*, *cMyc*).

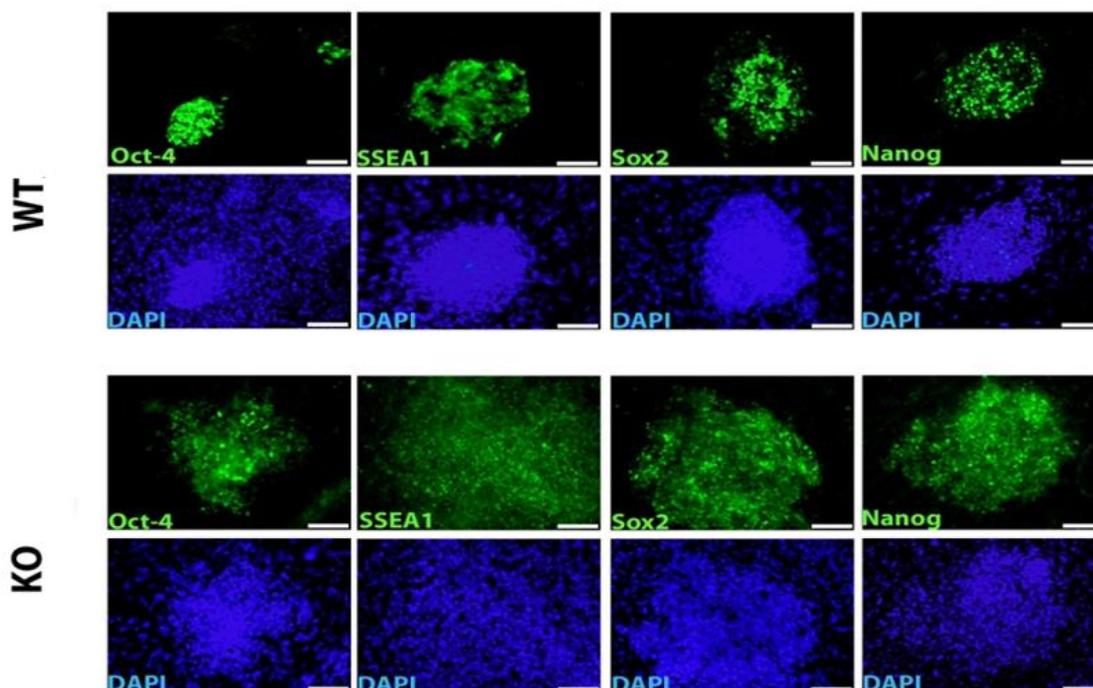
Для визуализации результатов проводили окрашивание репрограммированных клеток на щелочную фосфатазу (ЩФ) на 14-й день после добавления доксициклина. Подсчет показал 2-кратное увеличение числа ЩФ-позитивных колоний в нокаутных по гену *Kaiso* клетках по сравнению с клетками WT (Рис. 4). Этот результат был подтвержден на МЭФ, полученных из трансгенных мышей, несущими доксициклин-индуцируемую кассету (4F2A), кодирующую факторы Яманака (*Oct4*, *Sox2*, *KLF4* и *cMyc*).

Таким образом, отсутствие *Kaiso* способствует увеличению эффективности репрограммирования по сравнению с клетками дикого типа.



**Рисунок 4.** Нокаут по гену *Kaiso* способствует репрограммированию МЭФ в ИПСК. А - Подсчет колоний ИПСК окрашенных на ЩФ в контроле и нокаутных по гену *Kaiso*. Б - Генотипирование эмбрионов дикого типа и нокаутных по гену *Kaiso* мышей (в 3-х повторах).

Иммунофлуоресцентное окрашивание на четыре фактора плюрипотентности Oct4, SSEA1, Sox2 и Nanog на 21-й день репрограммирования подтвердило статус плюрипотентности полученных клонов (Рис.5).

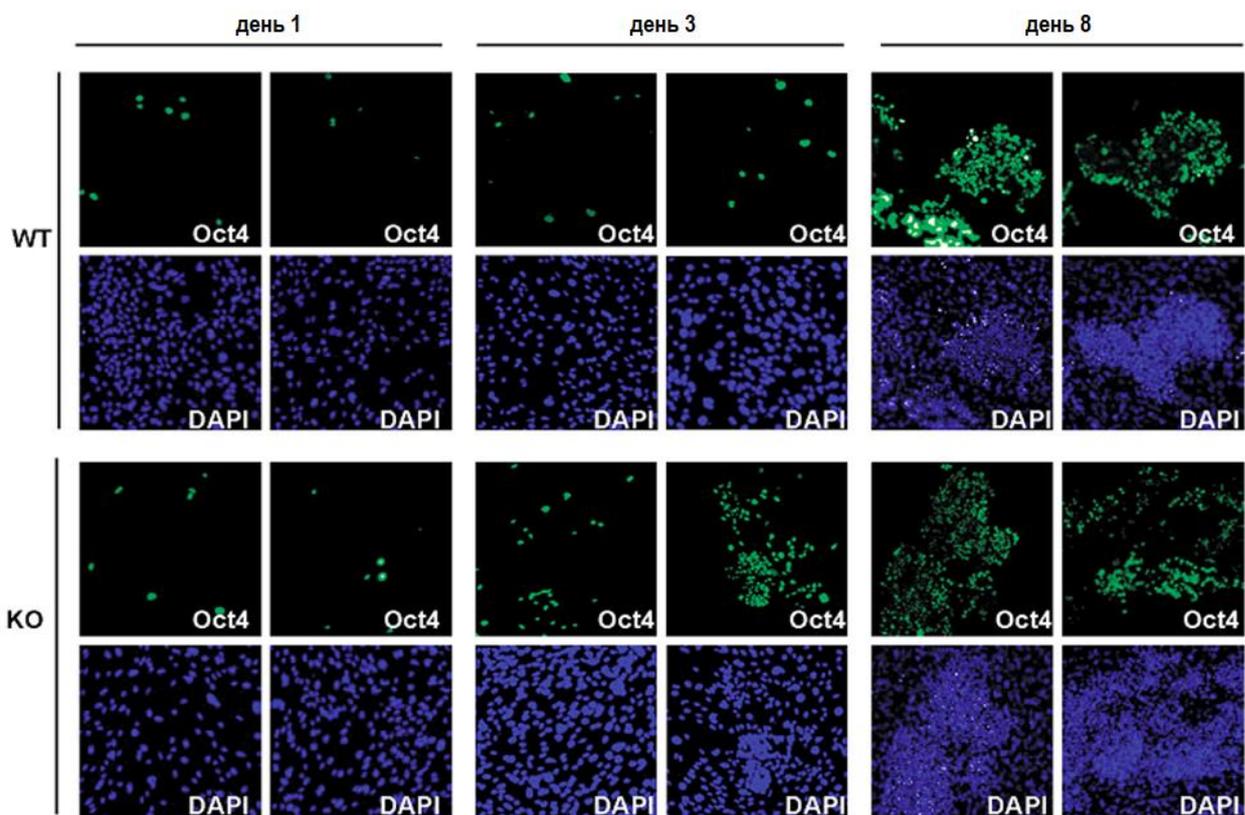


**Рисунок 5.** Окрашивание колоний ИПСК на основные факторы плюрипотентности. Иммунофлуоресцентное окрашивание на Oct4, Sox2, SSEA1 и Nanog. Ядра окрашены на 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) на 21 день.

Нокаут по гену *Kaiso* не повлиял на способность клеток образовывать зрелые ИПСК. Однако, можно сделать вывод, что *Kaiso* участвует в молекулярном механизме репрограммирования клеток и его отсутствие способствует более эффективному репрограммированию МЭФ в ИПСК.

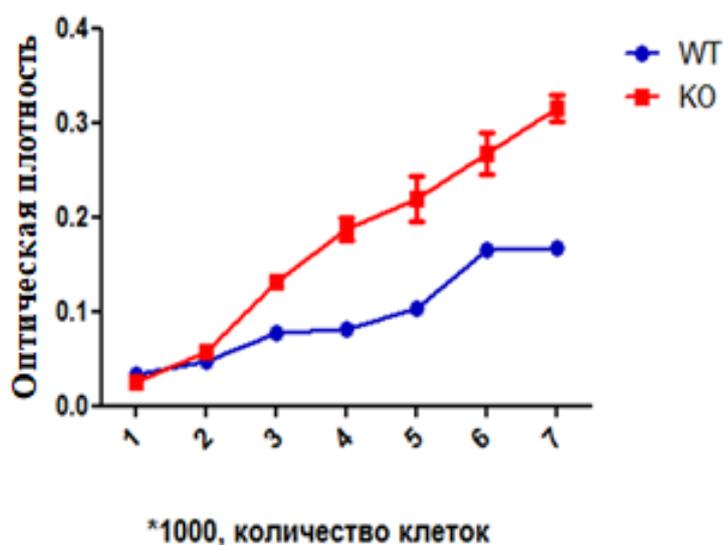
### Влияние *Kaiso* на скорость формирования колоний

Далее было определено, как *Kaiso* влияет на скорость образования ИПСК-подобных колоний. На рисунке 6 представлено иммунофлуоресцентное окрашивание колоний на маркер плюрипотентности Oct4 на 1-й, 3-й и 8-й дни репрограммирования. Уже на 3-й день большее количество Oct4-положительных клеток было обнаружено в пределах одной колонии в клетках МЭФ в нокаутных по гену *Kaiso* по сравнению с клетками дикого типа (Рис. 6). Одна из причин более активного образования колоний ИПСК может заключаться в изменении пролиферативной активности клеток нокаутных по гену *Kaiso*.



**Рисунок 6.** Иммунофлуоресцентное окрашивание нокаутных по гену *Kaiso* дикого типа клеток на Oct4 на 1-й, 3-й и 8-й дни репрограммирования. Ядра окрашены на DAPI.

Для определения пролиферативной активности был проведен колориметрический тест (MTT) на клетках МЭФ дикого типа и нокаутных по гену *Kaiso*. Согласно МТТ-анализу при нокауте *Kaiso* наблюдалось значительное увеличение пролиферативной активности по сравнению с клетками дикого типа (Рис. 7).

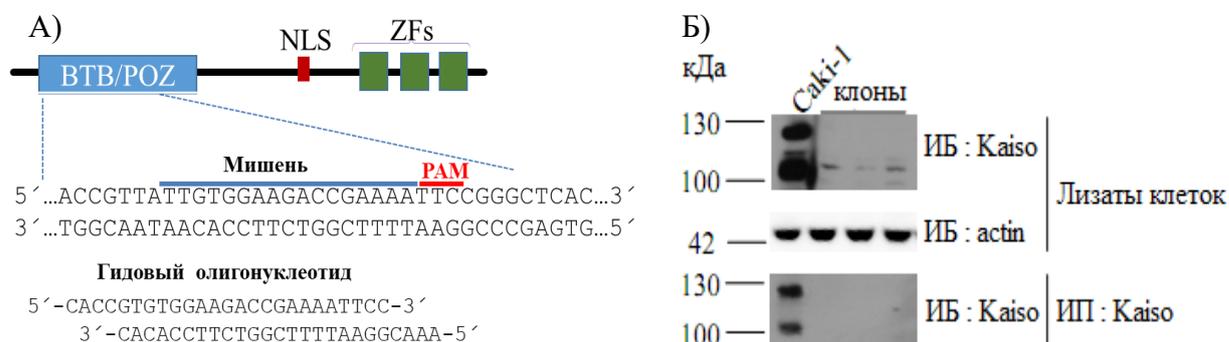


**Рисунок 7.** МТТ-анализ пролиферативной активности МЭФ дикого типа и *Kaiso* нокаутных при различной плотности клеток (в 3-х повторах).

Таким образом, нокаут *Kaiso* приводит к увеличению количества Oct4-положительных клеток на ранних стадиях репрограммирования по сравнению с клетками дикого типа, что сопряжено с увеличением пролиферативной активности нокаутных по гену *Kaiso* клеток.

### Инактивация *Kaiso* приводит к изменению профиля метилирования ДНК в клетках человека

Данные полученные на МЭФ были подтверждены на клеточной линии светлоклеточного рака почки человека Saki-1. Для этого с помощью CRISPR/CAS9 геномного редактирования была получена модельная клеточная линия со сдвигом рамки считывания в области 42 лизина. Данный сдвиг рамки приводил к остановке транскрипции в ВТВ/POZ домене *Kaiso* (Рис. 8). Было отобрано три клона, в которых *Kaiso* не детектировался методом вестерн-блот анализа (Рис.8).

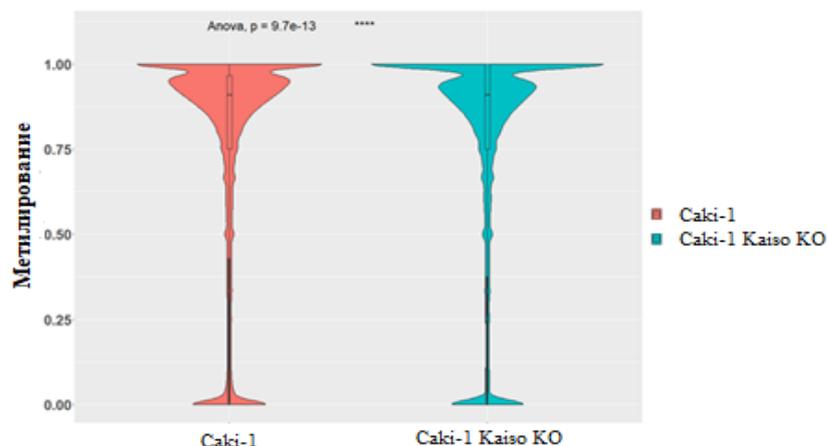


**Рисунок 8.** Редактирование клеточной линии Saki-1. А - Схематическое представление редактирования гена *Kaiso* в клеточной линии Saki-1 с помощью CRISPR/Cas9. Б – Вестерн-блот анализ эффективности редактирования гена *Kaiso* в клеточной линии Saki-1 с помощью CRISPR/Cas9.

Иммунопреципитация с антителами на *Kaiso* подтвердила, что редактирование с помощью CRISPR/Cas9 прошло эффективно (Рис.8). Отобранные клоны были проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру, которое позволило детектировать делеции от 10 до 20 нуклеотидов в области, кодирующей ВТВ домен, приводящие к сдвигу рамки считывания и как результат к измененной аминокислотной последовательности и раннему формированию стоп-кодона.

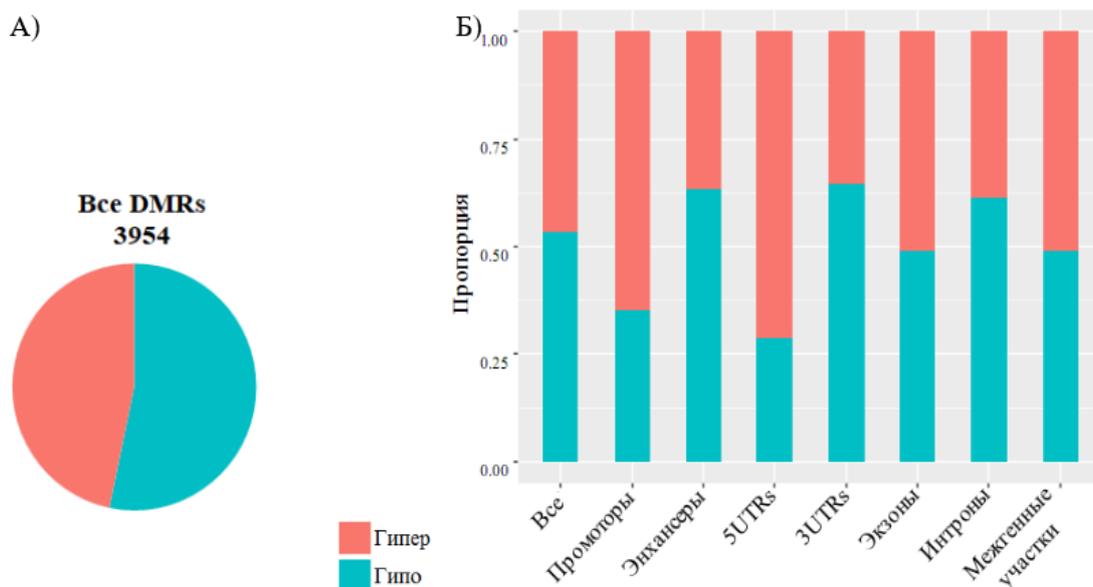
Далее было проведено полногеномное бисульфитное секвенирование генома клеток нокаутных по гену *Kaiso*, чтобы проверить, может ли дефицит *Kaiso* влиять на уровень метилирования генома. Данные по полногеномному метилированию для клеток

дикого типа *Saki-1* были получены ранее (Artemov et al. 2022). При анализе метилирования ДНК в этих клеточных линиях детектировали небольшое статистически значимое увеличение метилирования ДНК по всему геному при удалении гена *Kaiso* (Рис. 9).



**Рисунок 9.** Полногеномное метилирование в клетках дикого типа *Saki-1* и в клонах нокаутных по гену *Kaiso* *Saki-1* по данным бисульфитного секвенирования (\*\*\*\* p-value =  $9,7 \cdot 10^{-13}$ ).

Анализ метилома показал, что инактивация *Kaiso* приводит к появлению 3954 дифференциально метилированных участков (DMR): 2107 и 1847 участков со сниженным и увеличенным уровнем метилирования соответственно (Рис. 10).

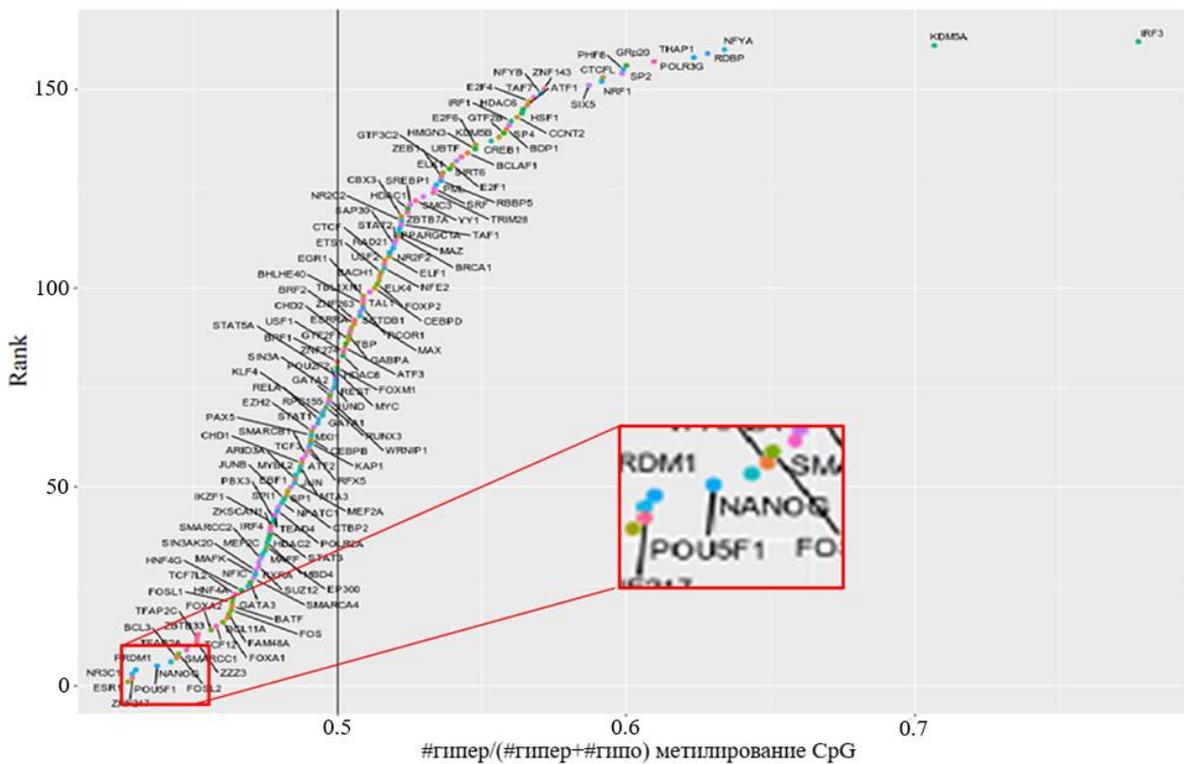


**Рисунок 10.** Анализ метилома. А - Количество гипер- и гипометилированных DMR в клетках нокаутных по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом *Saki-1*. Б - Относительные количества гипо – и гиперметилированных DMR, которые пересекаются с различными геномными участками.

Гипо- и гиперметилированные DMR обнаружены по всему геному: межгенные области, промоторы, тело гена (Рис. 10). Сравнительный анализ гипер- и гипометилированных DMR показал, что в нокаутных по гену *Kaiso* клетках доля гиперметилированных DMR выше в промоторах и 5'UTR, в то время как обратное наблюдалось в энхансерах, 3'UTR и интронах (Рис. 10).

### Изменение метилирования участков связывания различных транскрипционных факторов в *Kaiso* нокаутных клетках

Далее было исследовано, что происходит с метилированием участков связывания различных факторов транскрипции в *Kaiso* нокаутных клетках. Для этого использовали информацию об участках связывания факторов транскрипции, содержащуюся в ENCODE (Рис. 11). Были обнаружены как гипер- так и гипометилированные участки связывания транскрипционных факторов.



**Рисунок 11.** Доля гиперметилированных в *Kaiso* нокаутных клетках позиций CpG среди дифференциально метилированных CpG ( $p < 0,001$ ).

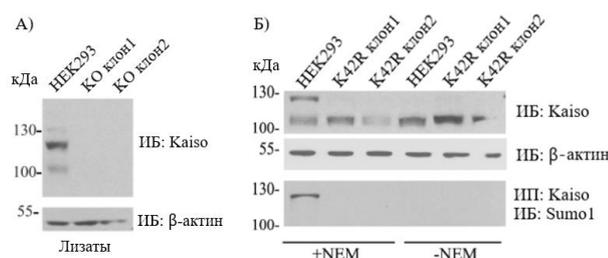
Наибольшее увеличение метилирования при нокауте *Kaiso* наблюдалось для участков связывания IRF3 и гистондеметилазы KDM5a. Метилирование препятствует связыванию IRF3 с ДНК, данных для KDM5a нет (Gao et al. 2021). Фактор IRF3 принимает

участие в контроле интерферон индуцируемых сигнальных путей, способствует воспалению в жировой ткани и резистентности к инсулину (Kumari et al. 2016). KDM5a является регулятором экспрессии генов в преадипоцитах. Ранее на мышинной модельной системе 3T3, было показано, что Kaiso является адипогенным репрессором (Raghav et al. 2012). Возможно это связано с изменением метилирования участков связывания IRF3 и KDM5a при удалении *Kaiso*. Среди транскрипционных факторов с увеличенным метилированием в консенсусных последовательностях также был найден CTCF, который участвует в формировании петель хроматина, является инсулятором и вовлечен в регуляцию импринтированных генов (Рис.11).

Среди факторов транскрипции со сниженным уровнем метилирования сайтов связывания был обнаружен эстрогеновый рецептор ERα, Kaiso (ZBTB33), а также плюрипотентные факторы Oct4 (POU5F1), Nanog, KLF4. Если в МЭФ было детектировано снижение метилирования в промоторах генов факторов, участвующих в репрограммировании, то в клетках Saki-1 Kaiso важен для метилирования их генов-мишеней. Снижение метилирования в участках связывания Kaiso позволяет выдвинуть гипотезу, что Kaiso может регулировать метилирование своих участков связывания напрямую, а не опосредованно через регуляцию транскрипционных факторов.

### **Создание модельных клеточных линий методом CRISPR/CAS9 геномного редактирования клеточной линии HEK293, экспрессирующих несумоилированную форму белка Kaiso**

Для того чтобы исследовать как Kaiso может влиять на метилирование своих генов-мишеней, с помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9 была получена модельная система клеток HEK293, в которой Kaiso либо не экспрессировался, либо нарабатывалась форма Kaiso с заменой аминокислоты лизина на аргинин в 42 положении (K42R), которая выступает в роли сильного репрессора. Экспрессию Kaiso останавливали с помощью сдвига рамки считывания в области 42 лизина (Рис.12).

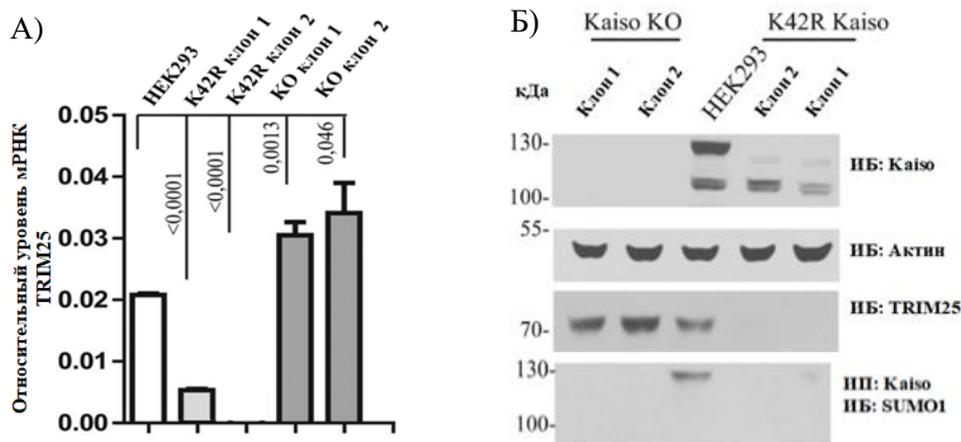


**Рисунок 12.** Вестерн-блоттинг анализ эффективности редактирования с помощью CRISPR/Cas9. А - нокаутной по гену *Kaiso* клеточной линии. Б - клеточной линии с мутацией K42R в присутствии и отсутствии NEM.

Точечную замену K42R получали с той же гидовой РНК, что и для сдвига рамки. В последовательность донорной одноцепочечной ДНК вводили мутацию, соответствующую замене K42R и вносили мутацию в РАМ последовательность (Рис.8), которая не влияла на аминокислотную последовательность, но предотвращала связывание Cas9 с вновь встроенной ДНК. Отбор клонов с мутацией проводили с помощью вестерн-блот анализа, мутация приводила к потере более тяжелой, сумоилированной формы белка (Рис.12). Было отобрано два клона с измененной подвижностью белка, для которых секвенирование по Сэнгеру подтвердило наличие мутации по 42 лизину. Отсутствие сумоилирования в полученных клонах было подтверждено иммунопреципитацией с антителами против Kaiso в присутствии ингибитора SUMO протеаз. Вестерн на SUMO показал, что клетки с K42R мутантной формой белка Kaiso не подвергаются сумоилированию (Рис.12).

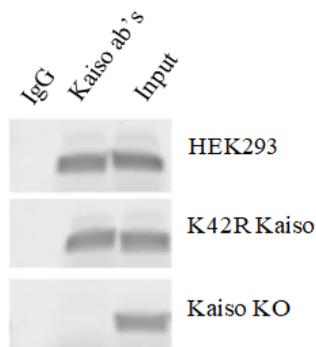
### **Kaiso регулирует экспрессию TRIM25**

Задача данной части работы заключалась в нахождении потенциальных генов мишеней Kaiso, экспрессия которых прекращается или значительно снижается в присутствии K42R мутантной формы белка Kaiso, являющейся сильным репрессором, но при этом активно экспрессирующиеся при нокауте *Kaiso*. Было найдено 1052 дифференциально экспрессированных гена в мутантных клетках, из которых снизили транскрипцию 558 ( $\text{padj} < 0,001$ ) гена и увеличили 494 гена ( $\text{padj} < 0,001$ ) по сравнению с клетками HEK293. Анализ функциональных категорий генов, снизивших транскрипцию в линии мутантных клеток K42R, идентифицировал факторы, связанные с воспалительным ответом, транспортом ионов и регуляцией артериального давления. Среди генов наиболее снизивших свою транскрипцию в линии мутантных клеток K42R был найден *TRIM25*. *TRIM25* вовлечен в регуляцию пролиферации многих типов опухолевых клеток (Z. Wang et al. 2019), является E3-убиквитин лигазой, которая участвует в различных клеточных процессах, включая регуляцию врожденного иммунного ответа против вирусов (Martín-Vicente et al. 2017). Снижение экспрессии *TRIM25* в обоих клонах с мутацией K42R было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (qPCR-RT). Обнаруженные изменения в экспрессии *TRIM25* отразились и на количестве белка в клетках (Рис. 13). Во втором клоне с мутацией K42R *TRIM25* не детектировался ни на уровне мРНК, ни на белковом уровне, в то время как в первом клоне наблюдалось снижение уровня мРНК *TRIM25* в 5 раз по сравнению с клетками дикого типа и значительное снижение белка *TRIM25* (Рис. 13).



**Рисунок 13.** Kaiso регулирует экспрессию *TRIM25*. А - Анализ qRT-PCR экспрессии *TRIM25* в HEK293, при мутации K42R и удалении *Kaiso*. Б - Вестерн-блот анализ изменение количества белка *TRIM25* в полученных клеточных линиях.

Нокаут *Kaiso* привел к усилению экспрессии *TRIM25* по сравнению с клеточной линией дикого типа HEK293 (Рис. 13). Далее было определено, влияет ли *Kaiso* напрямую или опосредованно на экспрессию *TRIM25*, то есть может ли *Kaiso* связываться с промотором *TRIM25*. Была проведена хроматин иммунопреципитация с антителами против *Kaiso* в исследуемых линиях. ПЦР анализ преципитатов показал, что *Kaiso* связывается с промоторной областью гена *TRIM25* как в клетках дикого типа, так и в клетках с мутацией K42R (Рис. 14). В нокаутных клетках сигнал не детектировался.

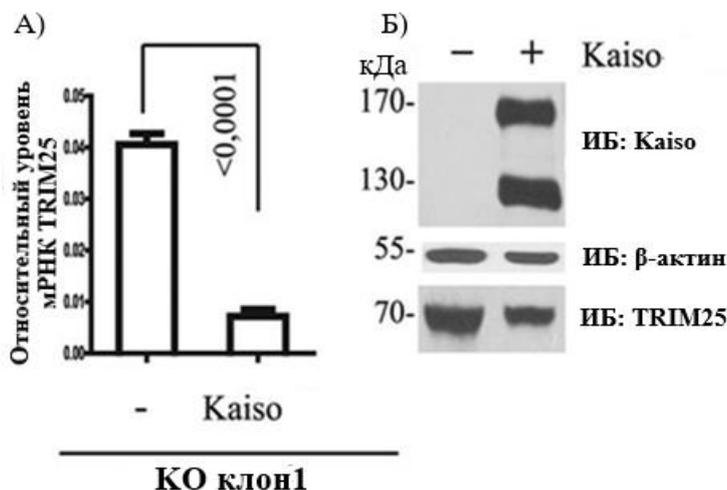


**Рисунок 14.** Десумоилированная форма и дикий тип белка *Kaiso* взаимодействует с промоторной областью *TRIM25* в клеточной линии HEK293.

Таким образом, *Kaiso* детектируется на промоторе гена *TRIM25* независимо от статуса сумоилирования и участвует в его подавлении транскрипции, причем несумоилированный *Kaiso* приводит к практически полному подавлению транскрипции *TRIM25*.

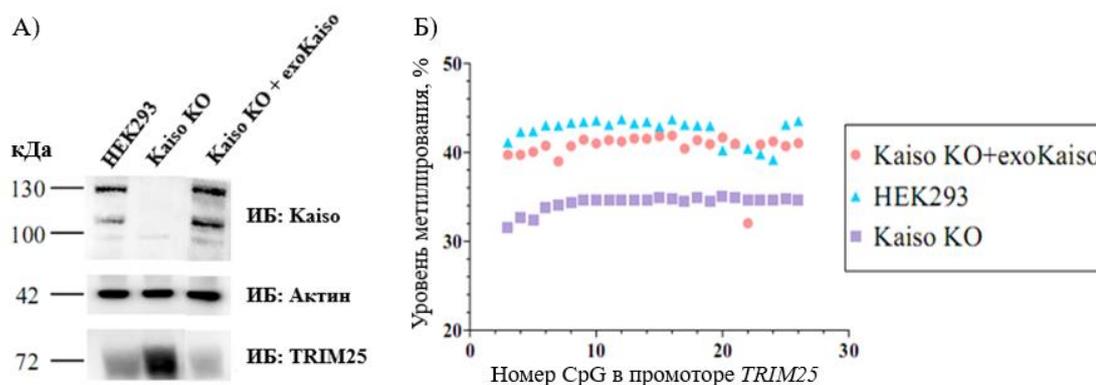
### Обратимый эффект воздействия *Kaiso* на регуляцию промотора гена *TRIM25*

Далее было исследовано, будет ли изменение транскрипции, наблюдаемое в нокаутных клетках обратимым, может ли экспрессия *Kaiso* влиять на уровень метилирования промотора *TRIM25* и будет ли метилирование меняться также, как меняется транскрипция при удалении *Kaiso*. В клеточной линии нокаутной по гену *Kaiso* экспрессировали экзогенный *Kaiso*-GFP. Появление экспрессии *Kaiso* привело к снижению транскрипции *TRIM25* и снижению количества наработанного в клетках белка (Рис.15). То есть транскрипция *TRIM25* обратно коррелирует с транскрипцией *Kaiso*.



**Рисунок 15.** Влияние восстановления уровня *Kaiso* на экспрессию *TRIM25*. А - Экзогенное восстановление экспрессии *Kaiso*. Б - Вестерн-блот анализ изменения количества белка *TRIM25* в ответ на восстановление экспрессии *Kaiso*.

Для анализа уровня метилирования промотора *TRIM25* была проведена бисульфитная конвертация ДНК из клеток дикого типа и *Kaiso* нокаутных. Целевой участок был проанализирован с помощью секвенирования по Сэнгеру. При нокауте *Kaiso* наблюдалось снижение метилирования промотора *TRIM25*. Для определения обратимости метилирования данного промотора были получены клетки с восстановленным *Kaiso* за счет лентивирусной трансдукции (Рис. 16). Восстановление экспрессии *Kaiso* привело к снижению количества *TRIM25*, аналогично экспрессии *Kaiso*-GFP и восстановлению уровня метилирования (Рис. 16).

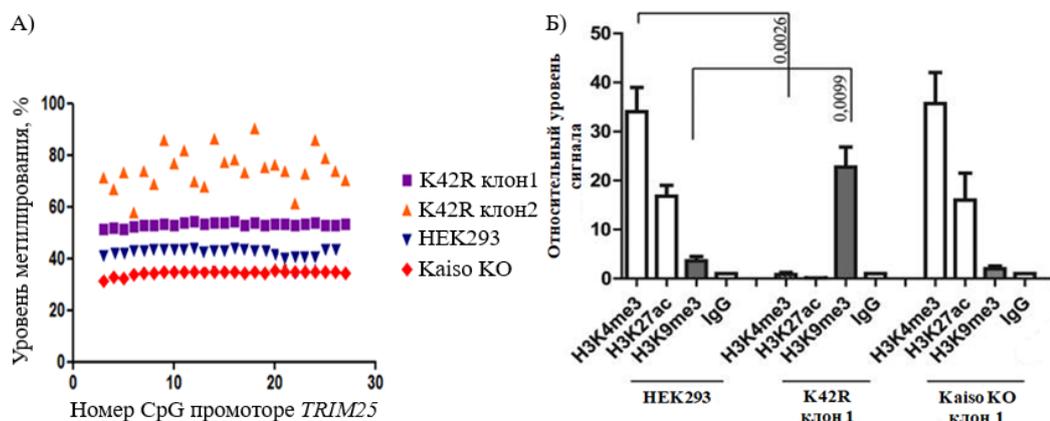


**Рисунок 16.** Анализ уровня метилирования промотора *TRIM25*. А - Вестерн-блот-анализ клеточных лизатов из клеток HEK293, Kaiso KO и мутантных клеток K42R на экспрессию *TRIM25*. Б - Анализ метилирования промотора *TRIM25* секвенированием нового поколения (NGS).

Таким образом, Kaiso не только поддерживает метилирование промотора *TRIM25*, но важен для его установления.

### Несумоилированная форма Kaiso приводит к гиперметилированию и появлению гистоновой модификации H3K9me3 в промоторе *TRIM25*

Экспрессия мутантной формы белка Kaiso K42R приводит к практически полному подавлению транскрипции *TRIM25*. Бисульфитный анализ показал, что в этих клетках наблюдается увеличение метилирования промоторной области *TRIM25* по сравнению с клетками дикого типа (Рис. 17).



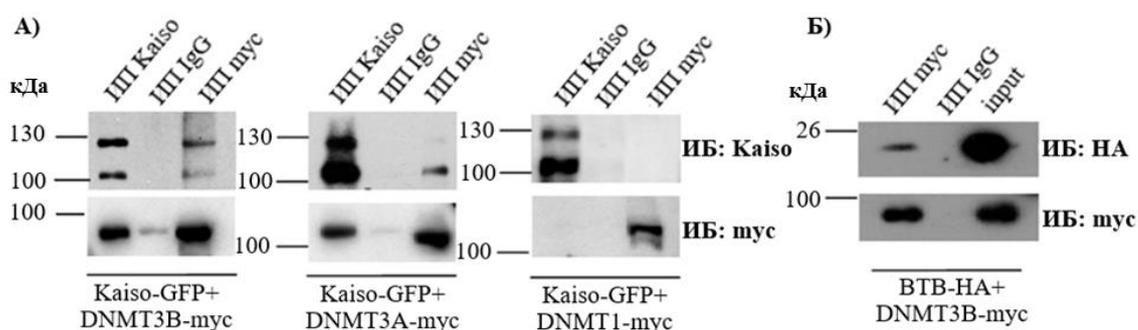
**Рисунок 17.** Анализ метилирования промотора *TRIM25* и гистоновых модификаций. А - Анализ метилирования промотора *TRIM25* NGS секвенированием. Б - ChIP анализ гистоновых модификаций (H3K4me3, H3K27ac, H3K9me3) на промоторе *TRIM25* в клетках с различным статусом Kaiso (дикий тип – HEK293, Kaiso KO clone1).

То есть несумоилированный Kaiso может способствовать увеличению уровня метилирования ДНК. Далее был проведен анализ на хроматиновые модификации промотора *TRIM25*. ПЦР после хроматин иммунопреципитации показал, что при экспрессии формы K42R белка Kaiso на промоторе *TRIM25* детектируется потеря H3K4me3, активной модификации, и появление H3K9me3. Чаще всего H3K9me3 детектируется в гетерохроматине и лишь 3% H3K9me3 локализовано на эухроматине (Nicetto and Zaret 2019). В эухроматине H3K9me3 был найден на регуляторных элементах генов плюрипотентных факторов (Golebiewska et al. 2009). Возможно влияние Kaiso на репрограммирование МЭФов связано не только с изменением метилирования, но и перераспределением модификаций гистонов.

Таким образом, K42R форма белка Kaiso может регулировать экспрессию *TRIM25*, увеличивая метилирование его промотора и приводя к появлению H3K9me3.

### Kaiso взаимодействует с *de novo* ДНК-метилтрансферазами

Поскольку Kaiso может влиять на уровень метилирования ДНК, причем удаление *Kaiso* снижает метилирование, а ре-экспрессия приводит к восстановлению профиля метилирования ДНК, то можно предположить, что Kaiso может взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами (DNMTs). Для проверки данной гипотезы, была проведена ко-трансфекция Kaiso-GFP и DNMT1 (поддерживающая ДНК-метилтрансфераза), DNMT3A или DNMT3B (*de novo* метилтрансферазы) с тагом мус на С-конце в клетки НЕК293. Иммунопреципитация с антителами на мус продемонстрировала, что Kaiso образует комплекс с DNMT3A и DNMT3B, но не с DNMT1 (Рис. 18).



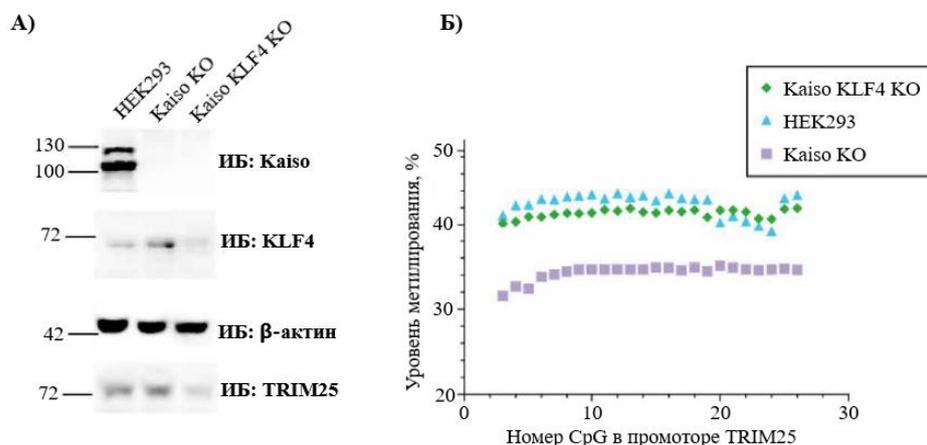
**Рисунок 18.** Вестерн-блот ко-иммунопреципитации DNMTs с Kaiso. А - Kaiso-GFP котрансфицированного с DNMT1-мус, DNMT3A-мус или DNMT3B-мус. Б - ко-иммунопреципитации VTB-НА котрансфицированного с DNMT3B-мус.

Для подтверждения образования этого комплекса выполнена иммунопреципитация с антителами против Kaiso. Вестерн-блот анализ показал, что Kaiso образует комплекс с *de novo* ДНК-метилтрансферазами. Kaiso состоит из VTB/POZ домена и на С-конце

содержит три цинковых пальца C2H2 типа. ВТВ/POZ домен отвечает за белок-белковое взаимодействие, а цинковые пальцы за взаимодействие с ДНК. Ко-трансфекция ВТВ с меткой HA вместе с DNMT3B-тус с дальнейшей иммунопреципитацией белков с тус антителами показала, что ВТВ/POZ домена Kaiso достаточно для образования комплекса *de novo* ДНК-метилтрансферазой DNMT3B (Рис. 18). Таким образом, Kaiso входит в комплекс с ДНК-метилтрансферазами и для это нужен ВТВ/POZ домен.

### Деметилирование промотора *TRIM25* зависит от присутствия *KLF4*

Последней задачей было выяснить может ли *KLF4*, который привлекает ферменты ТЕТ-диоксигеназы для деметилирования ДНК и связывается с теми же последовательностями, что и Kaiso, влиять на метилирование промотора *TRIM25* в отсутствии Kaiso. Чтобы ответить на этот вопрос, в клетках HEK293 с помощью CRISPR/Cas9 редактирования была сдвинута рамка считывания в *KLF4* и в *Kaiso* (Рис. 18).



**Рисунок 18.** *KLF4* важен для Kaiso-зависимой регуляции метилирования промотора *TRIM25*. А – Вестерн-блот анализ клеточных лизатов из клеток HEK293, Kaiso KO, мутантных клеточных линий с двойным нокаутом (*KLF4* KO и *Kaiso* KO). Б - Анализ метилирования промотора *TRIM25* путем бисульфитной конверсии с последующим секвенированием NGS в HEK293, Kaiso нокаутных и с двойным нокаутом (*Kaiso*, *KLF4*).

Отсутствие экспрессии *Kaiso* и *KLF4* было подтверждено вестерн-блот анализом и секвенированием по Сэнгеру участков редактирования. Бисульфитный анализ метилирования промотора *TRIM25* показал, что в отсутствие *KLF4* нокаут *Kaiso* не изменил существенно уровень метилирования промотора *TRIM25* (Рис. 18). Таким образом, в отсутствие *KLF4* удаление *Kaiso* не приводит к снижению метилирования промотора *TRIM25*, то есть экспрессия *KLF4* важна для деметилирования мишеней Kaiso при его удалении.

## ВЫВОДЫ

1. В мышинных эмбриональных фибробластах нокаутных по гену *Kaiso* детектируются как гипер-, так и гипометилированные участки, среди которых найдены промоторы генов вовлеченных в регуляцию и поддержание статуса плюрипотентности.

2. Показано, что нокаут *Kaiso* повышает эффективность репрограммирования мышинных эмбриональных фибробластов в плюрипотентные стволовые клетки, что сопряжено с увеличением пролиферативной активности клеток.

3. При удалении *Kaiso* с помощью CRISPR/Cas9 редактирования генома линии светлоклеточного рака почки Sak1-1 определены дифференциально метилированные участки генома как гипо- (в энхансерах, интронах, 3'UTR), так и гиперметилированные (в промоторах и 5'UTR).

3. В клеточной линии HEK293 удаление *Kaiso* обратимо снижает уровень метилирования промотора *TRIM25*, повышая его транскрипционную активность.

4. Увеличение метилирования промотора *TRIM25* в клеточной линии с мутацией сайта сумоилирования *Kaiso* сопровождается появлением гистоновой модификации H3K9me3 в клеточной линии HEK293.

5. В клеточной линии HEK293 *Kaiso* образует комплекс с de novo ДНК-метилтрансферазами 3A/3B и для образования такого комплекса достаточно ВТВ/POZ домена.

6. Деметилирование промотора *TRIM25* при удалении *Kaiso* зависит от экспрессии KLF4 в клеточной линии HEK293.

## СПИСОК СТАТЕЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Zhenilo S., Deyev I., Litvinova E., Zhigalova N., **Kaplun D.**, Sokolov A., Mazur A., Prokhortchouk E. DeSUMOylation switches Kaiso from activator to repressor upon hyperosmotic stress // Cell Death Differ. – 2018. – Vol. 25, № 11. – P.1938-1951 (Web of science IF=12.067).
2. **Kaplun D.S.**, Fok R.E., Korostina V.S., Prokhortchouk E.B. Zhenilo S.V. (2019). Kaiso Gene Knockout Promotes Somatic Cell Reprogramming // Biochemistry (Moscow), 2019. – Vol. 84, № 3. – P. 283-290 (Web of science IF=2.824).
3. **Kaplun D.**, Starshin A., Sharko F., Ganova K., Filonova G., Zhigalova N., Mazur A, Prokhortchouk E. and Zhenilo S. (2021) Kaiso Regulates DNA Methylation Homeostasis // International Journal of Molecular Sciences, 2021. – Vol. 22, article 7587 (Web of science IF=6.208).
4. **Kaplun D.S.**, Kaluzhny D.N., Prokhortchouk E.B., Zhenilo S.V. DNA Methylation: Genomewide Distribution, Regulatory Mechanism and Therapy Target // Acta Naturae, 2022. - Vol. 14, №4. – P. 4-19 (Web of science IF=2.204).