

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ФИЦ Биотехнологии РАН)

*На правах рукописи*

КАПЛУН ДАРЬЯ СЕРГЕЕВНА

«Поиск и характеристика новых механизмов влияния белка  
Kaiso на метилирование ДНК»

1.5.3 – Молекулярная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель (консультант):  
кандидат физико-математических наук  
Женило С.В.

Москва – 2023

## Оглавление

1) СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
2) ВВЕДЕНИЕ .....	7
2.1 Актуальность .....	7
2.2 Степень разработанности темы .....	8
2.3 Цели и задачи исследования .....	9
2.4 Основные положения, выносимые на защиту .....	9
2.5 Научная новизна .....	10
2.6 Методология и методы исследования .....	11
2.7 Личный вклад автора .....	11
2.8 Степень достоверности и апробация результатов .....	12
3) ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
3.1 Эпигенетика .....	14
3.2 Хроматин .....	15
3.3 Модификации гистонов .....	16
3.4 Метилирование ДНК .....	19
3.5 ДНК-метилтрансферазы .....	21
3.5.1 Поддерживающая ДНК метилтрансфераза .....	23
3.5.2 <i>De novo</i> ДНК-метилтрансферазы .....	24
3.5.3 Неканонические ДНК-метилтрансферазы .....	25
3.6 ТЕТ деметилазы .....	27
3.7 Репрограммирование .....	29
3.8 Влияние транскрипционных факторов на метилирование ДНК .....	32
3.9 Белки интерпретаторы метилирования ДНК .....	38
3.9.1 MeCP2 .....	40
3.9.2 MBD1 .....	40
3.9.3 MBD2 и MBD3 .....	41
3.9.4 MBD4 .....	42
3.9.5 UHRF1 .....	43
3.9.6 UHRF2 .....	44
3.9.7 ZNF57 .....	45
3.9.8 KLF4 .....	45
3.9.9 ZBTB4 .....	46
3.9.10 ZBTB38 .....	47

3.9.11 <i>Kaiso</i> .....	48
3.10 Заключение .....	50
4) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	51
4.1 Экспериментальные животные .....	51
4.2 Клеточные линии .....	51
4.3 Генотипирование мышей.....	51
4.4 Получение эмбриональных мышечных фибробластов .....	53
4.5 Анализ клеточной пролиферации.....	53
4.6 Получение лентивируса и трансдукция МЭФ.....	54
4.7 Окрашивание на щелочную фосфатазу (ЩФ) .....	54
4.8 Иммунофлуоресцентное окрашивание .....	54
4.9 Таргетный бисульфитный анализ.....	55
4.10 Анализ метилирования ДНК методом ограниченного бисульфитного секвенирования CpG- богатых областей (RRBS).....	55
4.11 Клонирование ПЦР продукта.....	56
4.13 Получение конструкции .....	57
4.18 Иммуноблоттинг .....	60
4.19 Получение компетентных клеток .....	60
4.21 Антитела.....	61
4.22 Получение клеточных лизатов.....	61
4.23 Иммунопреципитация.....	61
4.24 Экспрессия рекомбинантных белков .....	62
4.25 Ко-преципитационный анализ (GST-pull down анализ) .....	63
4.28 Статистическая обработка результатов .....	64
5) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	65
5.1 <i>Kaiso</i> регулирует метилирование генов плюрипотентности.....	65
5.1.1 Влияние <i>Kaiso</i> на скорость формирования колоний.....	70
5.2 Получение и характеристика клеток рака почки человека Saki-1 со сдвигом рамки считывания в гене <i>Kaiso</i> .....	72
5.2.1 Инактивация <i>Kaiso</i> приводит к изменению профиля метилирования ДНК в клетках человека.....	76
5.2.2 <i>Kaiso</i> защищает промоторы и CpG островки от гиперметилирования и энхансеры от гипометилирования.....	78
5.2.3 При удалении <i>Kaiso</i> CpG, расположенные в участках связывания факторов <i>Kaiso</i> , <i>Nanog</i> и <i>Oct4</i> , гипометилированы .....	82

5.3 Создание модельных клеточных линий методом CRISPR/Cas9 геномного редактирования клеточной линии HEK293, экспрессирующих несумоилированную форму белка Kaiso .....	85
5.3.1 Kaiso регулирует экспрессию TRIM25.....	86
5.3.2 Взаимодействие Kaiso с промотором <i>TRIM25</i> .....	88
5.3.3 Обратимый эффект воздействия Kaiso на регуляцию промотора гена <i>TRIM25</i> .....	89
5.3.4 Несумоилированная форма белка Kaiso приводит к гиперметилированию и появлению гистоновой модификации H3K9me3 в промоторе <i>TRIM25</i> .....	90
5.3.5 Kaiso взаимодействует с <i>de novo</i> ДНК-метилтрансферазами .....	92
5.3.6 Деметилирование промотора <i>TRIM25</i> зависит от присутствия KLF4.....	93
6) ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
ВЫВОДЫ.....	96

## 1) СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

п.н. – пара нуклеотидов

СрG – цитозин (C) и гуанин (G), где р – остаток фосфорной кислоты

LB – среда Лурия-Бертани

ИПСК – индуцированные плюрипотентные клетки

DAPI – диамидино-2-фенилиндол

DMEM – среда Дульбекко, модифицированная Иглом

DMR – дифференциально метилированный участок ДНК (differentially methylated DNA region)

DNMT – ДНК-метилтрансфераза

MBD – метил-ДНК-связывающий домен

MeCP2 – метил-СрG-связывающий белок

PBS – фосфатно-солевой буфер

TRD – домен репрессирующий транскрипцию

МЭФ – мышинные эмбриональные фибробласты

NCoR – ядерный ко-репрессорный белковый комплекс

NEM – ингибитор протеаз, N-этилмалеимид

ВТВ/POZ – семейство белков содержащих на N-конце ВТВ домен и на С-конце домен «цинковые пальцы»

ПЦР – полимеразная цепная реакция

кДа – килоДальтон

ДМСО – диметилсульфоксид

ТАД – топологически ассоциированные домены

HDAC – гистондеацетилаза

5 mC – 5-метилцитозин

5 hmC – 5-гидроксиметилцитозин

5 fC – 5-формилцитозин

5 caC – 5-карбоксицитозин

WT – дикий тип

Kaiso KO – нокаут по гену *Kaiso*

K42R – замена аминокислоты лизина в 42 положении на аргинин

qPCR-RT – ПЦР в реальном времени

RING – домен цинкового пальца, тип C3HC4

TET – семейство метилцитозиндиоксигеназ

PWWP – домен состоящий из около 70 аминокислот, который содержит аминокислотную последовательность «Pro-Trp-Trp-Pro».

siRNA – короткая интерферирующая РНК (short interfering RNA)

PHD – растительный гомеодомен (Plant homeodomain)

PBD –PCNA-связывающий домен

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток (proliferating cell nuclear antigen)

mQ – деионизированная вода

МТТ – 98% тиазолиловый синий тетразолийбромид

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

NGS – секвенирование нового поколения

Me – метилирование

P – фосфорилирование

## 2) ВВЕДЕНИЕ

### 2.1 Актуальность

Регуляция экспрессии генов - область пристального исследовательского интереса. На сегодняшний день много внимания уделено эпигенетическому феномену, когда наследственные изменения экспрессии генов происходят без изменения последовательности ДНК [1]. Эпигенетика – молодая и бурно развивающаяся наука. Этот термин появился в начале 1940 годов, когда эмбриолог Конрад Уоддингтон высказал радикально новую идею, что гены под влиянием эпигенетической регуляции контролируют развитие и дифференцировку клеток [2]. Дисциплина эпигенетики определяется как изучение молекулярных процессов, которые влияют на информационный поток между одной и той же последовательностью ДНК и различными паттернами экспрессии генов. Хорошо изучены основные эпигенетические механизмы: действие малых некодирующих РНК, метилирования ДНК, ремоделирования структуры хроматина и модификации гистонов. Нарушение этих механизмов приводит к целому ряду заболеваний. Дисбаланс в метилировании ДНК широко наблюдался при многих типах рака, таких как рак толстой кишки, молочной железы, печени, мочевого пузыря, Вильмса, яичников, пищевода, простаты и кости, а также при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, сахарном диабете 2 типа, синдроме Ретта, старении и др. [3]. Растет число исследований, обнаруживших связь между aberrантной экспрессией некодирующей РНК в патофизиологии таких заболеваний как онкология, сердечно-сосудистые и неврологические расстройств [4,5]. Показана роль гистоновых модификаций в развитии аллергических заболеваний, нейродегенеративных расстройств [6,7]. Значительные изменения в эпигенетических модификациях и структуре хроматина связаны с дифференцировкой стволовых клеток и репрограммированием соматических клеток. Репрограммирование соматических клеток связано с ремоделированием хроматина и деметилированием генов, связанных с плюрипотентностью [8]. Сегодня исследователи выявили сотни модификаций гистонов, которые считаются эпигенетическими метками, и было изучено большое количество ферментов, которые регулируют как метилирование ДНК, так и модификации гистонов. На сегодняшний день является актуальным изучение механизмов метилирования и деметилирования ДНК, влияющие на экспрессию, что позволяет получать информацию и предсказывать процессы, протекающие в клетке. Уровень метилирование 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 факторы являются потенциальными мишенями для лечения заболеваний, причиной которых является изменение метилирования ДНК.

Белки, имеющие цинковые пальцы, часто выступают не только в роли транскрипционных регуляторов, но и как факторы, влияющие на профиль метилирования ДНК [9,10]. Kaiso является транскрипционным фактором, который может связываться цинковыми пальцами как с метилированными, так и с неметилированными последовательностями [11–13]. Он участвует в прогрессировании рака, контроле клеточного цикла, воспалительных процессах, апоптозе и WNT сигнальном пути, регулирует метилирование локуса в импринтированном районе IGF2/H19 [14–16]. В данной работе исследуется влияние белка 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.

## **2.2 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 [17]. 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 метилцитозиндиоксигеназ (ТЕТ), его активность важна при репрограммировании клеток [18, 19]. А значит, Kaiso потенциально может конкурировать с KLF4 за участки связывания 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 [20,21].

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.

### **2.3 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*.

### **2.4 Основные 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*.

## 2.5 Научная новизна

В работе впервые показано, что в МЭФ 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 МЭФ 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 слабому 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 с заменой аминокислоты лизина на аргинин в 42 положении (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 приводит к снижению метилированию промотора *TRIM25*, как это наблюдалось в *Kaiso* дефицитных клетках.

## **2.6 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.

## **2.7 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

По материалам данной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности молекулярная биология и сделано 5 докладов на всероссийских и международных конференциях. 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; FEBS Congress — 2022 в Лиссабоне, Португалия.

## 2.8 Степень достоверности и апробация результатов

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.

### Публикации

#### *Статьи*

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, no. 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. Kaiso Gene Knockout Promotes Somatic Cell Reprogramming // Biochemistry (Moscow). 2019. – Vol. 84, no. 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. 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).

#### *Материалы конференций*

1. **Kaplun D.**, Litvinova E., Zhigalova N., Prokhortchouk E., Zhenilo S. Involvement of methyl-DNA binding protein Kaiso in environmental stress response // The FEBS Journal. 2017 –Vol. 284, no S1 –P. 175-176.
2. Женило С., Деев И., Литвинова Е., Жигалова Н., **Каплун Д.**, Соколов А., Мазур А., Прохорчук Е. Сумоилирование изменяет транскрипционные свойства белка Kaiso// Acta Naturae (англоязычная версия). – 2017. – Т. 9. no. S. – P. 41–42.
3. Zhenilo S., **Kaplun D.**, Prokhortchouk E. Role of Kaiso in homeostasis regulation. // FEBS Open Bio. – 2018. – Vol. 8, no. S1. – P. 134.

4. **Kaplun D.**, Prokhortchouk E., Zhenilo S. The role of the methylDNA binding protein in establishment of epigenetic landscape in mammalian cells // FEBS Open Bio. – 2019. – Vol. 9, no. S1. – P. 220.
5. **Kaplun D.**, Starshin A., Sharko F., Mazur A., Prokhortchouk E., Zhenilo S. Characterization of Kaiso binding sites in human kidney cancer cells // FEBS Open Bio. – 2022. – Vol. 12, no. S1. – P. 2

### 3) ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 3.1 Эпигенетика

Эпигенетика занимается исследованием изменений экспрессии генов, не связанных с мутациями в последовательности ДНК. Эпигенетические изменения сохраняются по мере деления клеток и могут передаваться из поколения в поколение. Существует несколько эпигенетических механизмов, влияющих на экспрессию генов, не затрагивающих нуклеотидную последовательность ДНК: метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов, регуляторные некодирующие РНК, варианты упаковки нуклеосом [22].

Эмбриональное развитие организма начинается с образования одноклеточной зиготы и заканчивается созданием 220 специализированных типов клеток организма млекопитающего. Каждая клетка имеет характерный профиль метилирования, который коррелирует с ее потенциалом дифференцировки (Рисунок 1). Уоддингтоном была предложена модель «эпигенетического ландшафта»: в каждой точке бифуркации потенциал клетки выбирать разную судьбу уменьшается. Вверху модели располагаются тотипотентные, способные образовывать все 220 типов клеток, включая плаценту, и плюрипотентные стволовые клетки. Плюрипотентные клетки в отличие от тотипотентных не могут дифференцироваться в клетки плаценты. Далее идут мультипотентные стволовые клетки. Спектр клеток, в которые могут дифференцироваться мультипотентные клетки, еще более сильно ограничен. Молекулярные исследования показали, что различные популяции стволовых клеток поддерживаются их эпигенетическим профилем (Рисунок 1) [23].

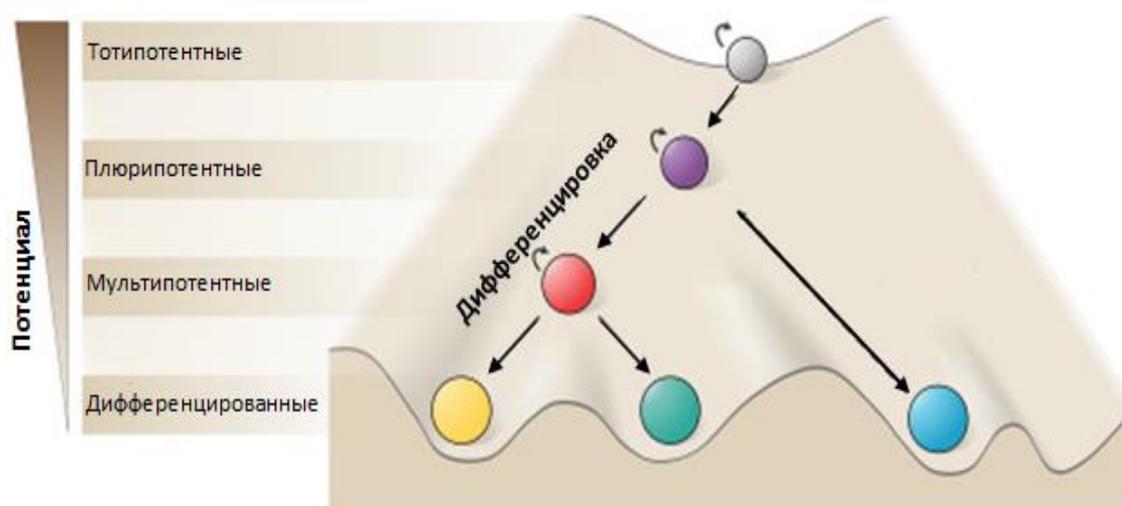


Рисунок 1. Потенциал развития и эпигенетические состояния клеток на разных стадиях развития [23].

Эпигенетические механизмы регулируют транскрипцию, влияя на структуру хроматина, на привлечение различных белковых комплексов. Эти механизмы могут действовать кооперативно, или последовательно [22].

### 3.2 Хроматин

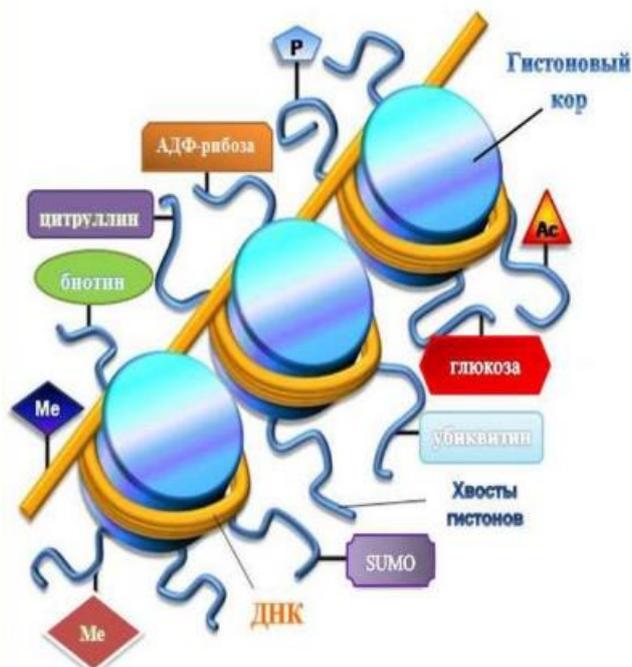
Суммарная длина ДНК в одной клетке равна приблизительно 2 м, тогда как размер ядра 6 мкм. Эукариотическая ДНК в клетке компактно упакована в хроматин с помощью гистонов. Такая упаковка способствует правильной транскрипции, репликации. Структурной составляющей хроматина являются нуклеосомы. Нуклеосома представляет собой октамер из четырех коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4). Вокруг одной нуклеосомы оборачивается 147 п.н. ДНК. Нуклеосомы обернуты в спиральную структуру, называемую соленоидом, и дополнительные линкерные гистоны H1 связаны с каждой нуклеосомой в качестве линкеров для поддержания общей структуры хроматина. Хромосомы организованы в большие топологически ассоциированные домены (ТАД) [24,25]. Внутри таких доменов могут происходить дистанционные взаимодействия между промоторами, энхансерами и сайленсерами, что определяет регуляцию экспрессии генов. Остается открытым вопрос о том, какие транскрипционные факторы обеспечивают установление дистанционных взаимодействий между энхансерами и промоторами и поддерживают структуру ТАДов [26].

Существует два состояния хроматина: эухроматин и гетерохроматин. Эухроматин – это транскрипционно активный открытый хроматин. Для него характерно наличие гиперацетилированных гистонов, ди- и три- метилированных гистонов H3 по 4 лизину (H3K4me2, H3K4me3). Хроматин сохраняет деспирализованное состояние, что позволяет регуляторным факторам взаимодействовать с ДНК [27,28]. Гетерохроматин – это закрытый, транскрипционно неактивный хроматин, который делят на конститутивный и факультативный. Факультативный гетерохроматин характерен для регионов, которые меняют свой статус по мере развития организма, поэтому неактивный он временно, например, в ходе развития или дифференцировки. Конститутивный гетерохроматин конденсирован всегда. Для него характерно гиперметилирование ДНК и триметилирование гистона H3 по лизину 9 (H3K9me3). Последовательности ДНК, из которых состоит конститутивный гетерохроматин, практически не содержат генов. Конститутивный гетерохроматин характерен для высоко повторяющихся (сателлитных)

последовательностей ДНК, расположенных в области центромер, для теломерных участков, а также в некоторых других ее участках [29].

### 3.3 Модификации гистонов

Гистоны – высококонсервативные белки, которые формируют нуклеосомы и богаты лизинами. Гистоновые белки имеют коровую часть и выступающие из нуклеосом N-концевые участки (Рисунок 2).



**Рисунок 2. Структура и модификация гистонов.** Гистоны подвергаются посттрансляционным модификациям: фосфорилированию (P), метилированию (Me), биотинилированию, сумоилированию, гликозилированию, ацетилированию, убиквитинированию, цитруллинированию, рибозилированию.

N-концевые участки гистонов чаще всего посттрансляционно модифицируются: ацетируются, метилируются, фосфорилируются, убиквитинируются, сумоилируются, рибозилируются.

**Таблица 1. Гистоновые модификации**

Аминокислота	Модификации		Расположение	Эффект	Ссылка
Лизин	Метилирование	H3K4me1	Энхансер	+	[30]

(Me)	H3K4me2	Промотор	+	[31]
	H3K4me3	Промотор	+	
	H3K9me1	Промотор	+	
	H3K9me2	Промотор	-	
	H3K9me3	Промотор	-	
	H3K27me2	Промотор	-	
	H3K27me3	Промотор	-	
	H3K36me3	Тело гена (Транскрибируемый регион)	+	
	H3K79me1	Тело гена	+	
	H3K79me2	Промотор	+	
	H3K79me3	Промотор	+	
	H4K20me3	Межгенных областях и вблизи мест начала транскрипции	-	[32]
	Ацетилирование (Ac)	H3K9	Промотор	+
H3K14		Промотор	+	
H3K18		Промотор	+	[33]
			Репарация ДНК	

		H3K23	Промотор	+	[34]
		H3K27	Энхансер	+	[31]
		H3K56	Промотор	+	[35]
		H4K5	Промотор	+	[36,37]
		H4K8	Промотор	+	
		H4K12	Промотор	+	
		H4K16	Промотор	+	
		H4K20	Тело гена	-	
Аргинин	Метилирование (Me)	H3R2me2a	Промотор	-	[31]
		H3R2me2s	Промотор	+	
		H3R17	Промотор	+	[38]
		H4R3me2a	Промотор	+	[31]
Серин		H3S10	Промотор, перицентромерная область	+	[39]
		H3S28	Промотор	+	[40]
		H4S1	Промотор	-	[41]

Эти модификации влияют на общую структуру хроматина, на взаимодействие гистонов с негистоновыми белками, которые в свою очередь модулируют структуру хроматина [42,43]. Функциональные последствия любой модификации зависят от ее типа и места, в котором происходят изменения.

Ацетилирование гистонов коррелирует с активацией транскрипции [44–46]. N-концевые участки гистонов заряжены положительно. Ацетилирование нейтрализует

положительные заряды гистонов. Это приводит к снижению сродства между гистонами и ДНК, открывая конденсированную структуру хроматина, облегчая доступ транскрипционным факторам и ферментам к промоторным регионам. Ацетилированные гистоны привлекают целый класс белков активаторов [47]. Таким образом, ацетилирование гистонов делает структуру хроматина доступной для транскрипции, в то время как деацетилирование делает структуру более компактной и конденсированной.

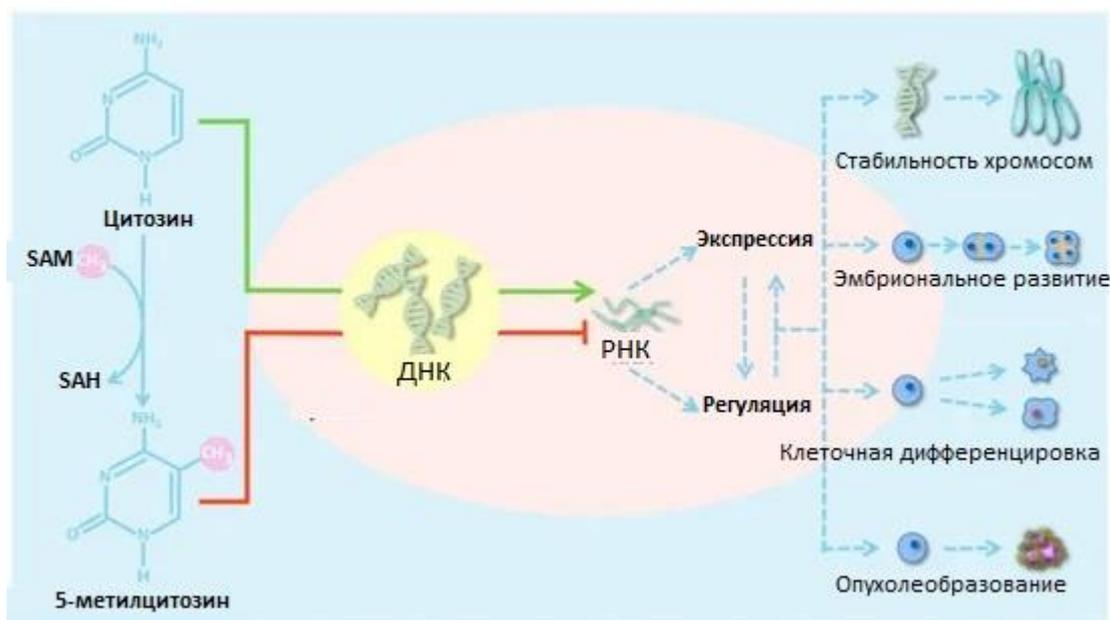
Метилирование гистонов в отличие от ацетилирования не меняет их заряд. Поэтому метилирование гистонов в первую очередь оказывает влияние на спектр белков, взаимодействующих с данной модификацией. Метилирование происходит по аргинину и лизину (моно-, ди- и триметилирование). Вариации уровня метилирования остатков лизина связаны с транскрипционной активностью. Триметилирование H3K27, H3K9 и H4K20 характерно для неактивных генов, в то время как триметилирование H3K4, H3K36 или H3K79 приводит к увеличению транскрипционной активности. [48,49]. Репрессионная H3K27me3 и активная H3K4me2/3 модификации вместе образуют так называемое бивалентное состояние. Присутствие H3K4me3 и H3K27me3 на нуклеосомах остается неизменным в течение переходных процессов развития, независимо от проявлений транскрипционной активности. В мужской зародышевой линии эти метки, как полагают, сохраняются в сперме, чтобы установить тотипотентность в следующем поколении. Показано, что геном сперматозоидов поддерживает на нуклеосомах двухвалентные метки H3K4me3/H3K27me3 на генах регуляторах развития.

Комбинация модификаций гистонов, образовавшаяся на определенных участках генома, называется гистоновым кодом. Этот код позволяет другим белкам распознавать к какой категории регионов, относится данный участок, это эухроматин или гетерохроматин, активный промотор или он находится в бивалентном состоянии. Например, метилирование H3K4 и H3K79 требует предварительного убиквитинирования гистона H2B у дрожжей. Одновременное метилирование H3K4 и H3K27 играет важную роль в сдвиге экспрессии гена, из сбалансированного состояния в активное или неактивное состояние в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) [50, 51].

### **3.4 Метилирование ДНК**

Метилирование ДНК млекопитающих является эпигенетической меткой, которая чаще всего встречается в составе CpG динуклеотидов [3]. Цитозин метилируется по пятому положению пиримидинового кольца. В эмбриональных стволовых клетках,

ооцитах и тканях головного мозга метилированный цитозин может встречаться в контексте CNG и CNN (где N=A,T или G) (Рисунок 3) [46,47]. Метилирование ДНК жизненно важно. Оно может вызывать изменения в экспрессии генов, но не изменять последовательность ДНК или продукта гена [1]. Импринтинг - это процесс, при котором отцовский или материнский аллель не экспрессируется или экспрессируется по-разному в разных тканях. Этот феномен управляется импринтирующим боксом родительско-специфической полинуклеотидной последовательностью, которая дает команду импринтирующему фактору, который может действовать путем метилирования дифференциально метилированных областей (DMR) и который обратимо активирует или инактивирует ген, унаследованный только от одного родителя. Импринтинг проходит через стирание метилирования как родительских, так и материнских хромосом во время развития половых клеток, установление метилирования в зависимости от пола гамет и после оплодотворения поддержание статуса метилирования генома во время митозов эмбрионального гена [52]. В свою очередь метилирование, влияет на стабильность хромосом, развитие эмбриона и дифференцировку клеток [1]. Ключевая роль метилирования CpG динуклеотидов заключается в подавлении транскрипции, поддержании неактивного статуса хроматина. Чаще всего увеличение уровня метилирования CpG островков (CpGIs) в промоторной области коррелирует с отсутствием транскрипции [53]. CpGIs - это регионы длиной не менее 200 п.н., в которых процентное содержание CG более 50% и наблюдаемое отношение CpG пар к ожидаемому более 60%.



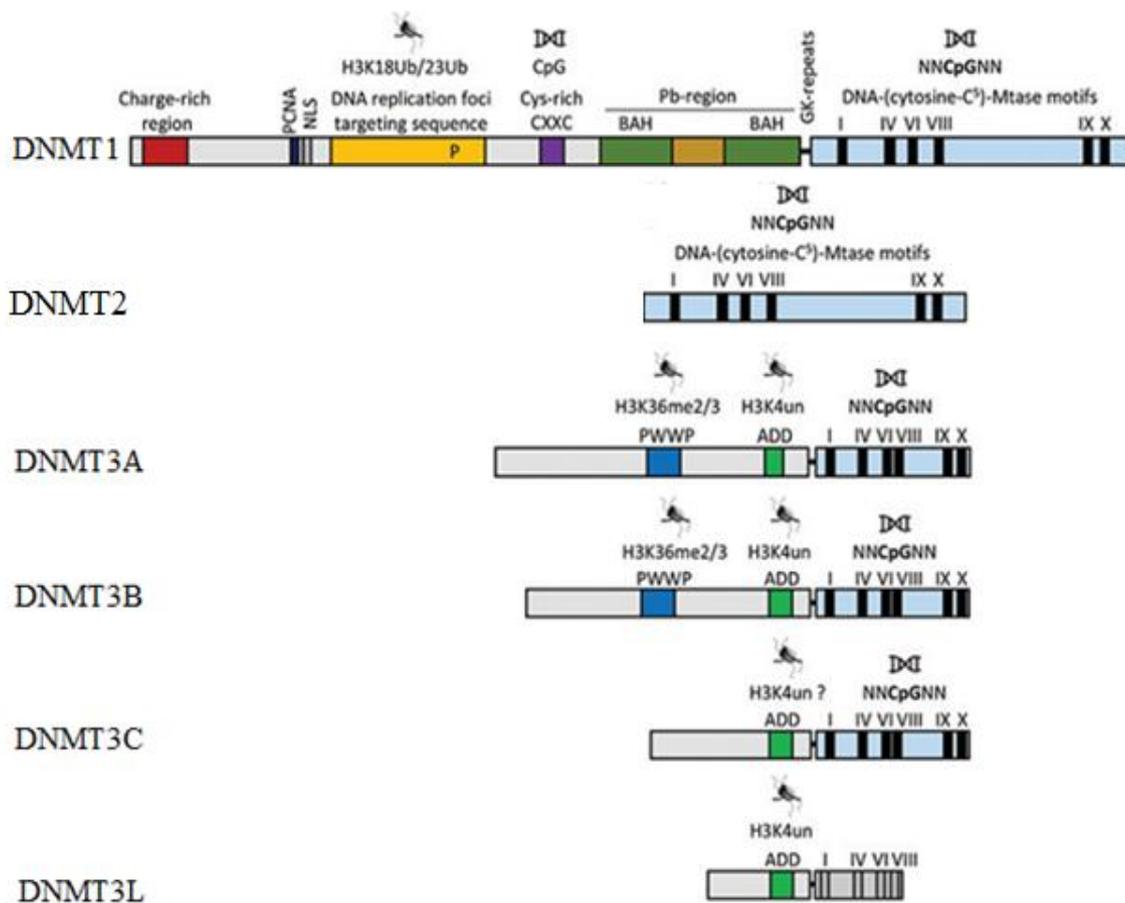
**Рисунок 3. Схема метилирования цитозина.** Метилирование регулирует стабильность хромосом, эмбриональное развитие, клеточную дифференцировку, опухолетворение.

80% CpG пар в геноме метилированы. Однако, в геноме есть участки, избегающие метилирования, это CpGs. В геноме человека имеется около 30000 CpGs. CpGs составляют 1–2% генома млекопитающих [54]. Чаще всего CpGs расположены либо в промоторах, либо в регуляторных элементах [55]. CpGs находятся в промоторах большинства генов домашнего хозяйства и генов, участвующих в развитии организма. Метилирование цитозина приводит к повышению уровня их мутаций за счет дезаминирования.

Метилирование ДНК в телах генов коррелирует с их транскрипционной активностью. Внутригенные CpGs не являются исключением: они часто заметилированы и остаются неактивными в качестве внутренних (альтернативных) промоторов (Jeziorska et al. 2017). Также CpGs метилируются, если расположены на неактивной X-хромосоме, и в DMR при онкотрансформации клеток (E. Li and Zhang 2014).

### **3.5 ДНК-метилтрансферазы**

ДНК-метилтрансферазы (DNMTs) - важный класс модификаторов ДНК. Количество генов DNMT сильно варьирует между геномами, разные организмы кодируют разные наборы ферментов DNMTs и их изоформ [56]. Метилирование ДНК катализируется каноническими ДНК-метилтрансферазами, которые включают DNMT1 (поддерживающую метилтрансферазу) и DNMT3A, DNMT3B (*de novo* метилтрансферазы). Неканонические ДНК-метилтрансферазы: DNMT2, DNMT3C, DNMT3L не обладают каталитической активностью метилировать ДНК (Рисунок 4) [57]. Однако, DNMT2 катализирует метилирование тРНК. А DNMT3L может стимулировать или ингибировать метилирование ДНК активируя DNMT3A и DNMT3B путем связывания с их каталитическим доменом [58].



**Рисунок 4. Доменная структура ДНК-метилтрансфераз.** DNMT1 преимущественно метилирует гемиметилированную ДНК. В DNMT2 отсутствует N-концевой домен, в то время как С-концевой домен содержит полный набор мотивов последовательности, но не обладает трансметилазной активностью. DNMT3A и DNMT3B имеют сходное расположение доменов и одинаковое предпочтение полуметилированной и неметилированной ДНК. DNMT3L, взаимодействует с каталитическим доменом DNMT3A/3B, лишена канонических мотивов ДНК-метилтрансферазы [59].

У млекопитающих DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3C и DNMT3L участвуют в метилировании ДНК для регулирования нормальных биологических функций, таких как развитие эмбриона, дифференцировка клеток и транскрипция генов. Нарушения в работе DNMTs часто связаны с онкогенезом. Изменение активности DNMTs обычно влияет на факторы, связанные с опухолью, такие как гиперметилирование генов-супрессоров и геномной нестабильностью, которые увеличивают злокачественность опухолей, ухудшают прогноз для пациентов и значительно усложняют лечение рака. Однако, влияние DNMTs на опухоли все еще остается спорным, и терапевтические подходы, нацеленные на DNMTs, все еще находятся на стадии изучения.

### 3.5.1 Поддерживающая ДНК метилтрансфераза

Репликация ДНК приводит к появлению полуметилированной ДНК, в которой материнская цепь метилирована, а дочерняя нет (Рисунок 5). DNMT1, поддерживающая ДНК метилтрансфераза, связывается с полуметилированной ДНК и копирует распределение метилированных цитозинов [60].

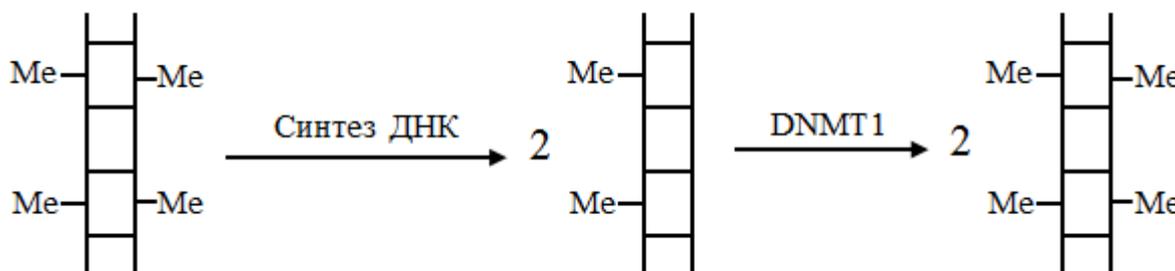


Рисунок 5. Схема метилирования ДНК DNMT1. DNMT1 метилирует только полуметилированную ДНК.

DNMT1 состоит из С-концевого каталитического домена, переносящего метильную группу с Adomet на цитозин, и регуляторного N-концевого домена, направляющего DNMT1 на полуметилированную ДНК. Его N-концевая регуляторная область включает в себя участки, связывающиеся с различными факторами (PCNA, DMAP, Rb, E2F1, SuVar39, гистондеацетилазы и др.).

PCNA-связывающий домен (PBD) взаимодействует с PCNA во время S-фазы в репликационных вилках [61]. ДНК связывающий домен CXXC взаимодействует с неметилированными CpG [62]. Домен связывания DMAP1 участвует во взаимодействиях с репрессором транскрипции и гистондеацетилазой 2 (HDAC2) [63]. RFTS способствует ингибирующему эффекту DNMT1, занимая активный центр каталитического домена [64]. Домены ВАН вовлечены в локализацию DNMT1 в локусах репликацию [65–67]. Таким образом, DNMT1 может не только копировать метилирование с материнской цепи на дочернюю, но и привлекать гистондеацетилазы и влиять на хроматин. DNMT1 в клетках может взаимодействовать примерно с 40 различными белками и с некоторыми молекулами РНК [68–70].

Потеря *DNMT1* летальна для эмбрионов мышей в начале гаструляции на E9.5 [71,72]. *DNMT1* нокаутные эмбриональные стволовые клетки остаются жизнеспособными и обладают пролиферативной активностью, но погибают при дифференцировке из-за апоптоза по p53 зависимому пути. Уровень метилирования в них снижен на 95% [73]. Удаление *DNMT1* у лягушки также приводит к гибели эмбриона из-за апоптоза [74].

### 3.5.2 *De novo* ДНК-метилтрансферазы

DNMT3A и DNMT3B - *de novo* ДНК-метилтрансферазы определяют установление метилирования ДНК на ранних стадиях развития организма (Рисунок 6), их экспрессия на этом этапе развития максимальна [69,75].

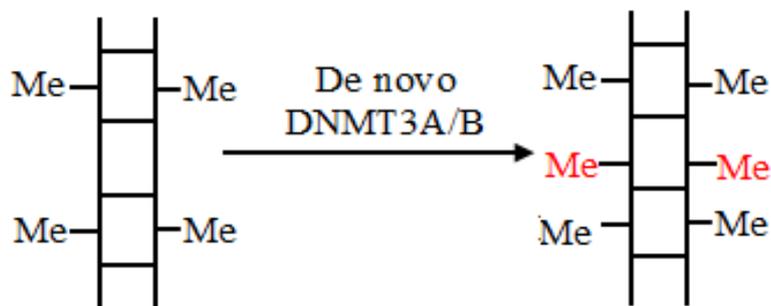


Рисунок 6. Схема метилирования ДНК *de novo* DNMT3A/B. *De novo* DNMT3A/B метилируют обе цепи ДНК.

У млекопитающих DNMT3A и DNMT3B гомологичны. Они содержат PWWP домен, отвечающий за привлечение к ДНК, ADD домен и С-концевой каталитический домен [76]. Домен ADD аутоингибирует ферментативную активность DNMT3A, уменьшая аффинность связывания ДНК с каталитическим доменом. Появление неметилированного H3K4 нарушает взаимодействие между ADD и каталитическим доменами, освобождая каталитический домен [77]. Домен PWWP также распознает H3K36me3. Эта модификация гистона характерна для активно транскрибируемых генов [78]. DNMT3B участвует в метилировании ДНК тела гена, а истощение H3K36 метилтрансферазы SETD2 в ЭСК мыши приводит к снижению уровня обогащения DNMT3B и уровня метилирования ДНК в генных областях [79].

Две изоформы DNMT3A транскрибируются с двух альтернативных промоторов, что приводит к появлению длинной и короткой изоформ. Более длинная изоформа DNMT3A1 преимущественно детектируется на концах CpGIs поликомб-регулируемых ЭСК мыши, что совпадает с промоторами многих факторов транскрипции. Изоформа DNMT3A2 в основном экспрессируется во время раннего развития, в то время как DNMT3A1 экспрессируется на разных этапах. Привлечение DNMT3A наблюдается в местах старта транскрипции (TSS) и сайте завершения транскрипции (TTS) [80]. Для DNMT3B известно около 30 изоформ, которые включают каноническую полноразмерную DNMT3B1, усеченные на N-конце изоформы и каталитически неактивные изоформы [68]. Несмотря на то, что DNMT3A и DNMT3B гомологичны, они делают различный вклад:

DNMT3B экспрессируется в тотипотентных клетках и ранних эмбриональных клетках, а DNMT3A экспрессируется повсеместно начиная с E10.5 [81].

Удаление *DNMT3A* приводит к летальности вскоре после рождения. Потеря *DNMT3B* является эмбрионально летальной на E11.5-15.5. Вклад DNMT3B в метилирование генома больше, чем вклад DNMT3A, и состоит из метилирования последовательностей, ассоциированных с онкогенетическими и импринтированными генами и инактивацией X хромосомы [72]. Конститутивная или условная делеция DNMT3B, но не DNMT3A, приводит к снижению метилирования ДНК по всему геному. То есть DNMT3B, в дополнение к основной поддерживающей метилтрансферазе DNMT1, необходима для поддержания метилирования ДНК в клетках МЭФ. DNMT3B-дефицитные клетки МЭФ показали анеуплоидию и полиплоидию, хромосомные разрывы и слияния. Инактивация DNMT3B приводила либо к преждевременному старению, либо к спонтанной иммортализации клеток МЭФ. G1 контрольная точка S-фазы не изменялась в первичных и спонтанно иммортализованных DNMT3B-дефицитных МЭФ, потому что белок p53 индуцировался повреждением ДНК [82].

### 3.5.3 Неканонические ДНК-метилтрансферазы

К неканоническим ДНК-метилтрансферазам относятся DNMT2 и DNMT3C, DNMT3L, которые не обладают каталитической активностью метилирования ДНК (Рисунок 4).

#### 3.5.3.1 DNMT2

DNMT2, также известна как метилтрансфераза тРНК аспарагиновой кислоты 1 (Trdmt1). Она структурно состоит только из каталитического домена, демонстрирует сильную консервативность последовательности каталитического мотива установленных ДНК-метилтрансфераз. Однако, ДНК-метилтрансферазная активность DNMT2 оказалась существенно слабее, чем у других ДНК-метилтрансфераз [83]. DNMT2 обладает устойчивой метилтрансферазной активностью по отношению к 38-ому остатку цитозина в петле антикодона тРНК Асп(GTC), Глу(GCC) и Вал(AAC) [84-86]. Метилирование тРНК повышает ее стабильность, филогенетический анализ показал, что DNMT2 является древней ДНК-метилтрансферазой, которая переключила свою субстратную специфичность с ДНК на тРНК [56]. DNMT2 является самой консервативной цитозиновой ДНК-метилтрансферазой у эукариот [84]. Вероятно, что любая из двух активностей

DNMT2 может стать преобладающей во время эволюции разных видов. Высокий уровень эволюционной сохранности DNMT2 доказывает, что её активность имеет важное адаптивное значение в естественной среде [84]. Молекула DNMT2 содержит все консервативные мотивы цитозинового ДНК-метилтрансферазы. Она не участвует в метилировании генома у млекопитающих [86]. Активность DNMT2, как было показано на мышах, необходима для установления парамутации, хотя точные механизмы ее участия в этой форме эпигенетической наследственности неизвестны. ЭСК дефицитные по *DNMT2* жизнеспособны. В них отсутствуют аномалии в метилировании ДНК [84]. Мыши нокаутные по *DNMT2* жизнеспособны и обладают нормальной фертильностью [85]. Дефицит *DNMT2* у мышей приводит к гипертрофии сердца, за счет активации комплекса Р-TEFb, критически важного для роста сердца [87]. Протеомный анализ нокаутных по *DNMT2* первичных клеток костного мозга выявил систематические различия в экспрессии белков, которые обусловлены неправильной трансляцией специфических кодонов тРНК, лишенными DNMT2-зависимого метилирования. Вместе эти результаты иллюстрируют регуляторную способность DNMT2-опосредованного метилирования тРНК при перекодировании генома [85].

### 3.5.3.2 DNMT3C

DNMT3C образовалась в результате тандемной дупликации гена *DNMT3B* и на 77% гомологична DNMT3B. Филогенетический анализ показывает, что DNMT3C возникла во время эволюции грызунов и содержит все домены характерные для DNMT3, кроме PWWP домена.

*DNMT3C* экспрессируется исключительно в мужских половых железах, участвует в метилировании и последующей репрессии эволюционно молодых ретротранспозонов в мужской зародышевой линии. Нокаут по *DNMT3C* приводит к небольшим изменениям уровня метилирования ДНК и стерильности самцов мыши из-за остановки развития сперматоцитов, по-видимому, происходящей на IV эпителиальной стадии, в то время у самок изменений не наблюдается [90,91]. Экспрессия DNMT3C в *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* эмбриональных стволовых клетках с тройным нокаутом приводит к усилению метилирования ДНК [90].

### 3.5.3.3 DNMT3L

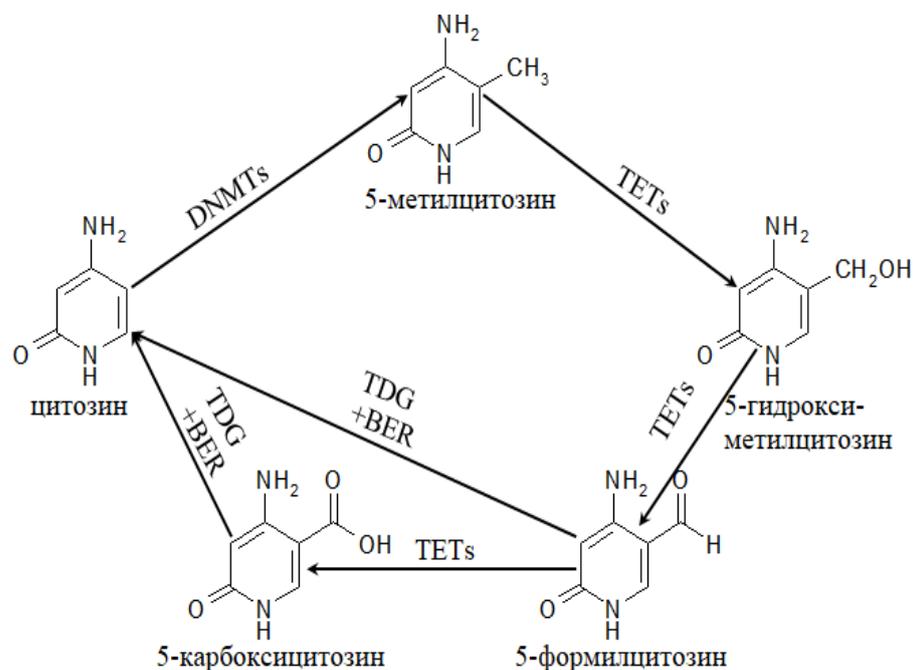
DNMT3L - каталитически неактивная ДНК-метилтрансфераза, присутствующая только у млекопитающих. Он экспрессируется на ранних стадиях развития, в

герминальных клетках. По сравнению с DNMT3A/3B метилтрансферазами DNMT3L не содержит домена PWWP. На С-конце наблюдается делеция, затрагивающая каталитический домен. DNMT3L служит кофактором для DNMT3A/3B. Она на порядок усиливает активность *de novo* ДНК-метилтрансфераз [88].

Дефицит DNMT3L приводит к потере метилирования в основных сателлитных повторах, но не во второстепенных сателлитных повторах. Предполагается, что DNMT3L участвует в регулировании метилирования целевых областей DNMT3A. Клетки нокаутных мышей по *DNMT3L* имеют небольшое количество гипометилированных участков, причем большинство, находится в ICR. Анализ геномного распределения гипометилированных участков показал, что в мышинных ЭСК нокаутных по материнской линии *DNMT3L*, почти половина из них находилась в промоторах, что согласуется с их обогащением в ICR. DNMT3L предпочтительно стабилизирует DNMT3A, особенно изоформу DNMT3A2, в мышинных ЭСК это объясняет функциональную специфичность DNMT3L *in vivo*. В частности, мыши нокаутные по *DNMT3L* и *DNMT3A* обладают почти идентичными фенотипами зародышевой линии. DNMT3A2 и DNMT3L высоко экспрессируются в просперматогониях и растущих ооцитах, стадии, когда происходит активное *de novo* метилирование ДНК во время гаметогенеза. [89]. *DNMT3L*-дефицитные самцы мышей жизнеспособны, но стерильны [90].

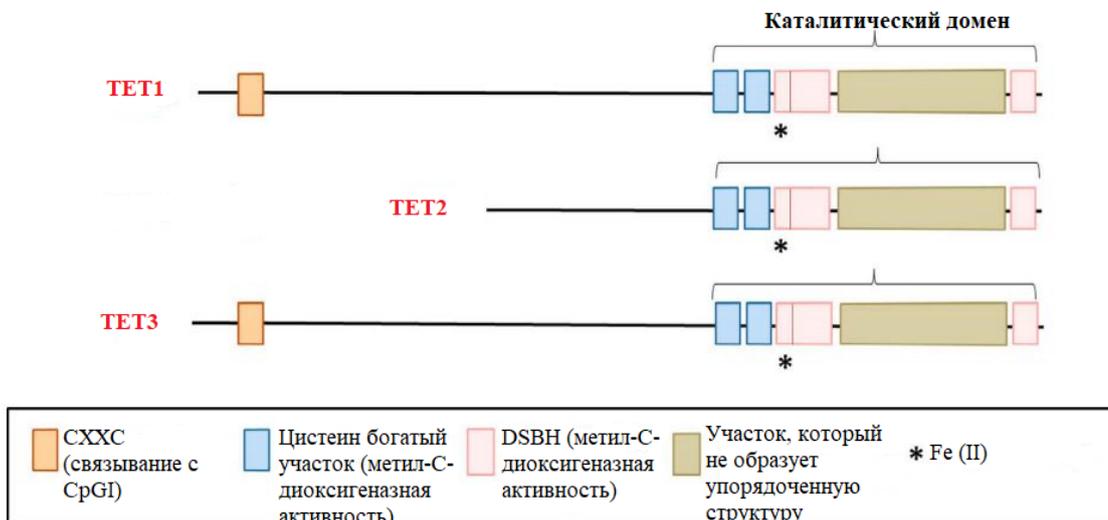
### 3.6 ТЕТ деметилазы

Деметилирование ДНК может быть активным и пассивным при делении клеток. Активное деметилирование ДНК происходит путем окисления метильных групп белками ТЕТ семейства. Ферменты ТЕТ (ТЕТ1, ТЕТ2, ТЕТ3) окисляют 5-метилцитозин (5mC) последовательно до 5-гидроксиметилцитозина (5hmC), далее до 5-формилцитозина (5fC) и в конечном итоге до 5-карбокситимина (5caC). Тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) использует 5fC и 5caC для получения немодифицированного цитозина (Рисунок 7) [92].



**Рисунок 7.** Схема метилирования/деметирирования ДНК взаимного превращения цитозина и 5-метилцитозина

TET белки содержат на N-конце ДНК-связывающий цинковый палец CXXC, а на C-конце каталитический домен (Рисунок 8). В каталитический домен входят сайты связывания для кофакторов Fe (II) и 2-оксоглутарата [93].



**Рисунок 8.** Структура TET-диоксигеназ. Все TET белки в своей структуре содержат каталитический домен, а TET1,3 содержат еще и CXXC домен, который связывается с CpGIs.

TET1, TET2 и TET3 имеют разные паттерны экспрессии во время развития и во взрослых тканях. TET1 экспрессируется как в наивных, так и в плюрипотентных клетках, экспрессия TET2 ограничивается наивным состоянием. Кроме того, TET2 экспрессируется

в ЭСК [94]. Уровни экспрессии TET1 и TET2 очень низки в ооцитах или оплодотворенных зиготах. Нокаут *TET1* у мыши приводит к уменьшению размера тела, однако, они остаются жизнеспособными и фертильными [95]. Удаление *TET2* также не влияет на жизнеспособность и фертильность мышей [96], но способствует развитию хронического миеломоноцитарного лейкоза у мышей и людей [97]. В отличие от TET1 и TET2, TET3 экспрессируется в ооцитах и зиготе, где он участвует в гидроксировании отцовского пронуклеуса и способствует деметилированию ДНК. Удаление *TET3* в ооците приводит к отсроченному деметилированию отцовского генома и нарушению развития. Гомозиготные мутантные мыши по *TET3* умирают при рождении, потеря TET3 не блокирует дифференцировку и эмбриональное развитие [98].

### 3.7 Репрограммирование

Модель Уоддингтона (Рисунок 1) является актуальной на сегодняшний день. Эксперименты со стволовыми клетками заставили под другим углом посмотреть на этот ландшафт. В 2006 году японским ученым Яманаке и другим удалось «забросить камень обратно на гору» — вернуть МЭФ в ИПСК, которые можно дифференцировать в разные типы клеток. Для этого в фибробласты мыши лентивирусной трансдукцией вводили 4 транскрипционных фактора: Oct3/4, Sox2, KLF4, с-Мус (OSKM), обеспечивающих плюрипотентное состояние. Репрограммирование соматических клеток имеет невысокую эффективность: в первых экспериментах репрограммированию подвергалось лишь 0,05% клеток, в некоторых случаях даже до 10%, но большинство клеток всё равно не поддаются репрограммированию. Яманака попытался объяснить это через ландшафт Уоддингтона (Рисунок 1). Предположим, что мы пытаемся забросить шарик обратно на гору. На его пути может возникнуть некоторые препятствия и он может не долететь до верха и скатиться вниз, может долететь до верха, но не удержаться там или может спуститься в неправильном направлении или по соседней колее. Только в редких случаях, когда шарик долетает до верха и остается там, клетка репрограммируется и становится плюрипатентной стволовой клеткой. В качестве препятствий могут выступать: метилирование ДНК, наличие тех или иных гистоновых модификаций, сверхэкспрессия или отсутствие экспрессии белков влияющих на процесс репрограммирования соматических клеток [99–102]. Факторы репрограммирования легче всего связываются в открытом хроматине, характеризующимся активными гистоновыми модификациями, например, метилированием H3K4. OSK способны узнавать не просто последовательность

ДНК, а участок ДНК в контексте нуклеосом. А с-Мус рекрутируется только к хроматину с активными гистоновыми модификациями (H3K4me). По аналогии с факторами инициации в прогениторных ЭСК, связывание OSK с участками закрытого хроматина в начале репрограммирования может стать решающим этапом для событий, которые происходят позже. Учитывая, что некоторые из этих дистальных взаимодействий перекрываются с энхансерами, можно предположить, что OSK взаимодействуют с некоторыми специфическими энхансерами эмбриональных стволовых клеток в начале репрограммирования, даже если они расположены в закрытом хроматине в исходных клетках, таким образом, повышая способность связывать промотор и активировать транскрипцию позже в процессе репрограммирования [103]. На ранних этапах транскрибируются только гены, содержащие активные хроматиновые модификации в исходных фибробластах. При этом происходит полногеномное ремоделирование хроматина как ответ на экспрессию OSKM. Гистоновая метка H3K4me<sub>2</sub>, связанная с активным хроматином, возникает *de novo* во многих промоторных областях при отсутствии транскрипционных изменений и даже до деления клеток. Многие из этих промоторов принадлежат генам, которые транскрипционно активируются позже при репрограммировании, включая различные регуляторы плюрипотентности, такие как Sall4, Pecam1, FoxD3 и Lin28 [104]. Репрограммирование соматических клеток завершается экспрессией генов плюрипотентности, таких как Nanog [105]. Изменения экспрессии в ответ на факторы репрограммирования начинаются немедленно; однако плюрипотентное состояние достигается только через определенное время [100,106,107]. Промоторы генов первичного ответа содержащие модификацию H3K4me<sub>2</sub> на ранних стадиях репрограммирования, часто демонстрируют высокую плотность CpG-динуклеотидов и при этом низкую плотность нуклеосом. В свою очередь это может исключать необходимость АТФ-зависимого ремоделирования хроматина и облегчать быстрые изменения структуры хроматина. Промоторные области многих генов с наибольшим увеличением экспрессии при переходе от МЭФ к ИПСК теряют гистоновую модификацию H3K27me<sub>3</sub> и приобретают H3K4me<sub>3</sub> [108,109]. Смена хроматиновых модификаций, не происходит сразу, потому что пре-ИПСК демонстрируют промежуточный паттерн подмножества модификаций хроматина, который находится между состояниями МЭФ и ИПСК [109,110]. Энхансеры характеризуются наличием гистоновых модификаций H3K4me<sub>1</sub> и H3K4me<sub>2</sub> в сайтах, а сайты старта транскрипции характеризуются наличием H3K4me<sub>3</sub> [107,111,112]. Переключение состояний энхансеров происходит очень стремительно, иногда даже до первого деления клетки. При этом

изменения идут в обоих направлениях: более 60% энхансеров специфичных для фибробластов деактивируются, и более 1000 специфичных для ЭСК устанавливаются в течение первых 24 часов после добавления OSKM [104]. Хроматин в этих дистальных участках приближается к состоянию подобному ЭСК, в ходе репрограммирования [107]. В период репрограммирования в клетках происходит резкое увеличение множества активных модификаций ацетилирования и метилирования гистонов, в то время как уровни H3K27me3 остаются неизменными [110]. Важно отметить, что не все гены плюрипотентности изменяют свой эпигенетический статус на ранних стадиях репрограммирования - для многих генов этот процесс наблюдается на более поздних стадиях [104].

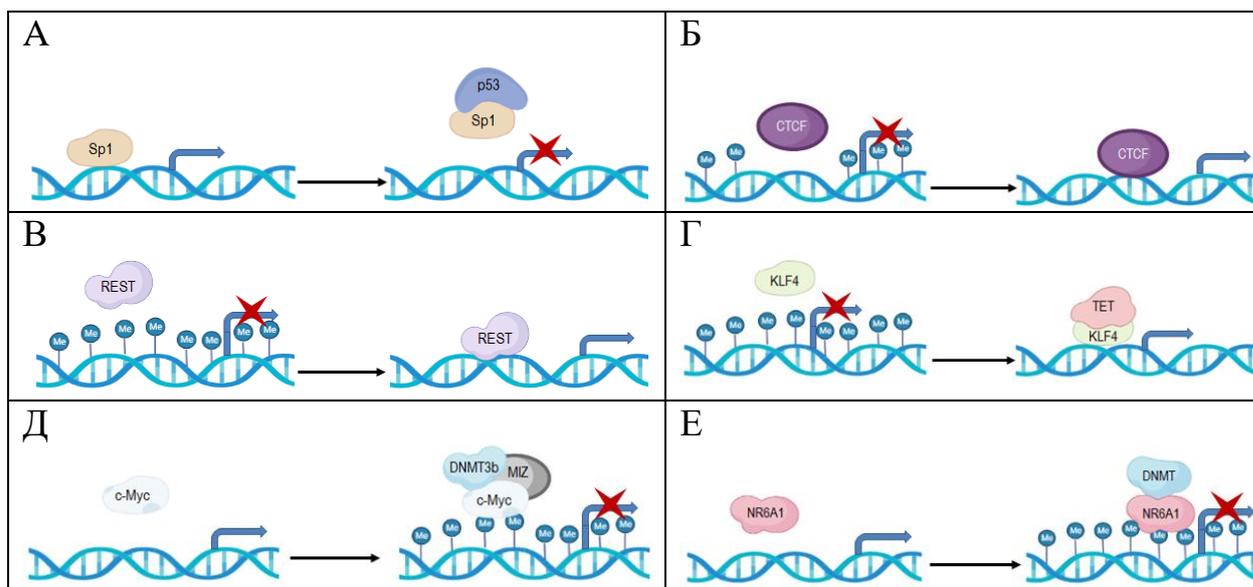
Метилирование ДНК является важным фактором сдерживания на ранних стадиях репрограммирования. Примерно равный уровень гиперметилированных и гипометилированных островков CpG обнаружен как в ЭСК так и в ИПСК. Однако дифференциальное обогащение гипер- и гипометилированными CpGs отличает ИПСК от их родительских фибробластов [113]. В ИПСК большинство дифференциально метилированных районов гипометилированы, а не гиперметилированы, по сравнению с фибробластами, и характеризуются бивалентными модификациями хроматина, которые идентифицируют регуляторы развития. Кроме того, гипометилированные участки CpGs перекрываются с сайтами связывания для Oct4, Nanog и Sox2. Это говорит о том, что для приобретения плюрипотентности требуется глобальное ремоделирование метилирования ДНК. Сравнение паттернов метилирования примерно на 66 000 участках CpG в фибробластах, ЭСК и ИПСК показало, что в глобальном масштабе ИПСК и ЭСК более метилированы, чем фибробласты, и что клетки ИПСК более метилированы, чем клеточные линии ЭСК. Однако небольшая часть CpGs, расположенных в генах, ассоциированных с плюрипотентностью, гипометилирована в плюрипотентных клетках [114]. Баланс между метилированием ДНК и деметилированием строго регулируется во время репрограммирования. Гиперметилирование промоторов ключевых генов плюрипотентности, таких как *Nanog* и *Oct4*, наблюдается до поздних стадий репрограммирования, свидетельствуя о том, что деметилирование этих промоторов является скоростью-лимитирующей стадией процесса репрограммирования. Промоторы и энхансеры, которые имеют активные модификации хроматина (H3K4me2) в начале репрограммирования, напротив, гипометилированы на протяжении всего процесса репрограммирования. Метилирование ДНК, по-видимому, ограничивает участки возможных изменений модификаций гистонов [115]. Таким образом, ДНК должна быть

деметирирована для сброса эпигенетической памяти, реактивации плюрипотентной транскрипционной программы.

По сравнению с развернутой линейной ДНК нуклеосомная ДНК менее доступна для ДНК-связывающих факторов и большинство транскрипционных факторов нуждаются в структурном изменении связанной нуклеосомой ДНК или нуклеосом-свободной области для связывания своих комплементарных последовательностей для регуляции транскрипции.

### **3.8 Влияние транскрипционных факторов на метилирование ДНК**

В зависимости от типа клетки в ней поддерживается и устанавливается характерное для нее состояние транскрипции генов. На регуляцию транскрипции влияют транскрипционные факторы, которые обладают свойством связываться с определенной последовательностью ДНК и влиять на экспрессию генов. Транскрипционный фактор связывается с ДНК путем узнавания небольшого специфического мотива нуклеотидной последовательности. Доступность ДНК для транскрипционного фактора может также регулироваться посредством эпигенетических меток. Например, за счет метилирования CpG, появления определенных гистоновых модификаций или позиционирования нуклеосом. Около 70% промоторов содержат CpGs в геноме человека. Несмотря на это значительная часть их защищена от метилирования в промоторных участках. Вероятно, CpG в промоторах имеют механизм защиты от метилирования. В качестве такого механизма могут выступать транскрипционные факторы, которые препятствуют метилированию. Например, одним из таких транскрипционных факторов является Sp1. Он связывает мотив CCGCCC, который часто локализуется в цис-элементах в промоторных областях CpGs различных генов. Sp1 является часто встречаемым активатором транскрипции, он принимает участие в различных биологических процессах, одним из которых является пролиферация клеток. Регуляция транскрипции с помощью белков Sp основана на взаимодействиях между GC-богатым сайтом связывания (GGGCGG) в ДНК и C-концевыми мотивами цинковых пальцев в белках [116]. Одним из способов регуляции его активности является прямое взаимодействие с p53, приводящие к репрессии транскрипции генов мишеней (Рисунок 9). Например, было показано, что p53 путем прямого взаимодействия с Sp1 ингибирует активацию транскрипции VEGF и PKC $\alpha$  [117].



**Рисунок 9. Механизмы регуляции активности генов.** А) регуляции активности гена под действием Sp1; Б) влияния CTCF на статус метилирования ДНК и активность гена; В) влияния REST на статус метилирования ДНК и активность гена; Г) влияния KLF4 на статус метилирования ДНК и активность гена; Д) влияния с-Мус на статус метилирования ДНК и активность гена; Е) влияния NR6A1 на статус метилирования ДНК и активность гена [117].

Взаимодействуя с промоторной областью Sp1 препятствует связыванию с ДНК DNMT1, тем самым защищая CpGI от метилирования [118,119]. С другой стороны, Sp1 может привлекать гистонацетилацетилтрансферазу р300, которая ацетилирует гистоны в области промотора, способствуя деметилированию ДНК [120,121]. Мутация в сайте взаимодействия Sp1 с ДНК приводит к метилированию этой области и подавлению транскрипции гена мишени [122].

Одним из транскрипционных факторов связывающих не метилированную ДНК является CTCF, выступая в качестве репрессора транскрипции. Он регулирует импринтинг генов, взаимодействуя с неметилированными ICR на материнском аллели, препятствуя активации генов.

Снижение уровня CTCF в ооците с помощью RNAi приводит к увеличению метилирования материнского аллеля в то время как мутация сайтов связывания CTCF в IGF2/H19 приводит к увеличению метилирования после оплодотворения, но не в терминальных клетках. CTCF связывая область контроля импринтинга IGF2/H19, действует как пограничный элемент для контроля импринтированной экспрессии материнских и отцовских копий генов IGF2 и H19. Таким образом, связывание таких факторов, как SP1 и CTCF, может защищать регуляторные области от метилирования.

Связывание транскрипционных факторов с промоторными областями также может влиять на поддержание неметилированного уровня ДНК, вызывая активную транскрипцию. Активная транскрипция GC-богатых промоторных областей приводит к образованию гибридов ДНК-РНК (R-петель), которые защищают промотор-проксимальную транскрибируемую область от действия DNMT.

Транскрипционные факторы могут связываться с метилированной областью и приводить к деметилированию ДНК. Было показано, что взаимодействие CTCF с метилированным сайтом связывания приводит к его деметилированию (Рисунок 9). Это кажется противоречащим исследованиям *in vitro*, показывающим, что метилирование мотива CTCF препятствует связыванию [123]. Однако этот участок ДНК, имеет низкую плотность CpG, возможно, связывание CTCF происходит между метилированными CpG или же CTCF имеет сродство к определенным метилированным последовательностям. Аналогичный эксперимент проводили с транскрипционным фактором REST. Анализировали участки связывания REST в ЭСК дикого типа и REST нокаутных. Области, окружающие сайты связывания транскрипционного фактора REST неметилированы в клетках дикого типа, но те же самые участки метилированы в нокаутных клетках. Восстановление экспрессии REST в нокаутных клетках приводило к потере метилирования в сайтах связывания, что свидетельствует о том, что REST связывается с метилированной областью и опосредует потерю метилирования (Рисунок 9).

Мотив связывания консенсуса REST не содержит CpG, что указывает на то, что метилирование ДНК, вероятно, не играет роли в его физическом взаимодействии с ДНК, позволяя белку связываться в областях, содержащих метилированные CpG. Механизм, с помощью которого связывание таких факторов, как CTCF и REST, может привести к деметилированию когда-то метилированных областей, еще не ясен. Возможным механизмом может быть взаимодействие с TET белками. Однако прямое взаимодействие CTCF с белками TET семейства еще не продемонстрировано.

Существует целый ряд транскрипционных факторов, которые могут привлекать TET белки для деметилирования ДНК. TET2 может взаимодействовать с SPI1. Оба фактора связывают промоторы, которые теряют метилирование ДНК во время остеокластогенеза. Связь между SPI1 и низкими уровнями метилирования ДНК согласуется с данными, показывающими, что сайты связывания SPI1 не метилированы в клетках острого миелоидного лейкоза, которые высоко экспрессируют SPI1. С другой стороны, он также может взаимодействовать с DNMT3B. Таким образом, SPI1 может играть противоположные роли в регуляции метилирования ДНК. Еще для двух белков AP-

1 и NFKB1 показано, что их ДНК-связывающие мотивы обогащены в областях, которые деметируются во время процесса развития и дифференциации гемопоэтической клетки предшественника в зрелые остеокласты, что позволяет предположить, что эти белки могут также играть роль в рекрутировании TET белков. PPARG может опосредованно рекрутировать TET белки в область метилированного энхансера. PPARG представляет собой ядерный гормональный рецептор, который взаимодействует с коактиваторами, чтобы регулировать экспрессию генов, специфичных для адипоцитов. Комплекс коактиватора PPARG поли-(АДФ-рибозил)ируется при рекрутировании на ДНК. Белки TET семейства связываются с поли-(АДФ-рибозил)ированным комплексом и катализируют превращение 5mC в 5hmC, индуцируя, таким образом, регион-специфическое деметилирование ДНК [124]. C/EBP $\alpha$ , KLF4 и Tfcg211 также взаимодействуют с TET2 и рекрутируют фермент на специфические сайты ДНК, что приводит к их деметилированию (Рисунок 9) [125].

Существуют транскрипционные факторы, которые связываются с неметелированной ДНК и привлекают ДНК-метилтрансферазы, тем самым увеличивая её метилирование. Одним из таких факторов является с-Мус. Он взаимодействует с *de novo* метилтрансферазой DNMT3B, формируя комплекс из трех белков (с-Мус, DNMT3B, MIZ1) (Рисунок 9).

Ко-трансфекция факторов транскрипции, с-Мус и DNMT3A, усиливает специфическое метилирование ДНК, катализируемое DNMT3A [126]. E2F6 может рекрутировать DNMT3B на целый спектр промоторов, что приводит к их метилированию и последующей репрессии. NR6A1 (ядерный фактор зародышевых клеток (GCNF)) взаимодействует с DNMT3A и DNMT3B. Совместной экспрессии NR6A1 и DNMT3A достаточно для запуска метилирования ДНК промотора, содержащего сайт связывания NR6A1.

Существует несколько примеров непрямого рекрутирования DNMT к ДНК с помощью транскрипционных факторов. Недавние исследования продемонстрировали пространственную связь между метилированием ДНК и H3K9me3, H3K27me3 [127,128]. Метилтрансфераза H3K9 (SETDB1) является частью механизма поддержания гетерохроматина и работает совместно с белками MBD1, HP1 и гистондеацетилазой, подавляя экспрессию генов [129–131].

Известно, что N-концевой домен белка SETDB1 может напрямую взаимодействовать как с DNMT3A, так и с DNMT3B, и что SETDB1 и DNMT3A совместно локализуются на промоторе гена RASSF1. Хотя SETDB1 не является ДНК-

связывающим белком, он связывается с репрессивным белком TRIM28 (широко известным как KAP1) и рекрутируется вместе с TRIM28 в определенные геномные сайты с помощью цинковых пальцев белков, содержащих KRAB домен (KRAB-ZNF), таких как ZNF274, ZNF57 [132–135]. Существует более 300 KRAB-ZNF белков, представляющих самый большой класс TF, кодируемых в геноме человека. Специфическая для клеточного типа экспрессия KRAB-ZNFs может обеспечивать механизм, с помощью которого DNMT нацелены на промоторы тканеспецифическим образом. Однако очень немногие KRAB-ZNF функционально охарактеризованы из-за их относительно низкой экспрессии в большинстве типов тканей. Также как и SETDB1 H3K27 метилтрансфераза (EZH2), компонент репрессивного комплекса PRC2, может взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами [136]. EZH2 не взаимодействует напрямую с ДНК, а скорее рекрутируется в ее сайты связывания такими факторами как JARID2 и длинными некодирующими РНК [137,138]. Связывание EZH2 с промотором MYT1 необходимо для рекрутирования DNMT, что позволяет предположить, что EZH2 может участвовать в установлении метилирования ДНК в промоторных областях [136]. Однако другие исследования показали, что метилирование ДНК сохраняется на промоторах после истощения EZH2 [139]. Возможно, что EZH2 играет роль в рекрутировании DNMTs в некоторых локусах генома, необходимы дальнейшие исследования для выяснения его роли в регуляции метилирования ДНК.

Белки, связываются с метилированными CpG с различной степенью специфичности. Маловероятно, что факторы, которые связываются с метилированными CpG в отсутствие расширенного мотива, участвуют в сайт-специфической регуляции метилирования ДНК, они могут быть важны для поддержания глобальных паттернов метилированных и неметилированных доменов. Члены семейства MBD белков, включая MBD1, MBD2, MBD4 и MESP2, содержат специфические домены, ответственные за распознавание метилированных последовательностей [140–142]. Белки MBD семейства связывают метилированную ДНК *in vivo* с наивысшим сродством в областях с высокими концентрациями метилированных CpG, тогда как метилированные области с низким содержанием CpG диктуют более низкие уровни связывания MBD [143]. Это сродство к связыванию с регионами, густо расположенными метилированными CpG, наряду с тем фактом, что MBD могут рекрутировать репрессивные модифицирующие гистоновые комплексы в свои сайты связывания, приводит к более сильному подавлению транскрипции в генах с метилированными промоторами в CpGs [144–146].

Некоторые сайт-специфичные ТФ распознают последовательность, которая содержит CpG в расширенном мотиве распознавания ДНК. Поскольку метилирование цитозина вызывает серьезные структурные изменения нуклеотида, вполне вероятно, что оно будет влиять на взаимодействие ДНК-белок. 25% всех охарактеризованных мотивов содержат CpG в последовательности узнавания [147,148]. Не все CpG-содержащие мотивы имеют динуклеотидную последовательность CpG в положении, которое могло бы влиять на взаимодействия ДНК-белок. Однако есть несколько мотивов, для которых наличие CpG играет важную роль. Можно было бы предсказать, что изменения в состоянии метилирования этих мотивов будут влиять на связывание с белками. На сегодняшний день влияние метилирования ДНК на взаимодействия белок-ДНК в основном исследовалось *in vitro* с использованием методов связывания, таких как анализ сдвига подвижности геля, и структурных методов, таких как рентгеновская кристаллография. Используя такие методы, белки были охарактеризованы как принадлежащие к трем классам: те, которые предпочитают связываться с неметилированной ДНК [149,150], те, которые предпочитают связываться с метилированной ДНК [151,152], и те, связывание которых не зависит от присутствия метилирования ДНК [153,154]. Например, в работе Камперо и др. показано, что метилирование CpG по-разному регулирует ответ определенных элементов E2F на разных членах семейства E2F. Консенсусный мотив E2F может содержать два CpG (TTTCGCGC может быть TTTSSCGC); в неметилированном состоянии это самые сильные мотивы узнавания E2F. Однако мотивы, содержащие два CpG, не могут связываться с E2F1–5, когда сайты метилированы. Напротив, метилирование E2F-связывающего сайта, который содержит только один CpG, не влияет на связывание E2F2-5, но отменяет связывание E2F1 [155]. ДНК-связывающие белки с-Мус, USF1 и TFE3 спираль-петля-спираль могут связываться с мотивом CACGTG. Метилирование центрального CpG сильно влияет на Мус, но не на USF1 или TFE3, в эксперименте *in vitro* [153]. Белки bZIP связываются с палиндромными мотивами CRE, которые имеют центральный динуклеотид CG. Исследования *in vitro* показывают, что метилирование усиливает связывание SEBPA и SEBPB, но ингибирует связывание CREB1, ATF4, JUN, JUND, SEBPD и SEBPG [156–158].

Белки семейства Kaiso подобных белков: ZBTB33 (широко известный как Kaiso), ZBTB4 и ZBTB38 - связываются с метилированными последовательностями *in vivo* и *in vitro*. Причем, Kaiso может связывать как участки с одиночно метилированными цитозинами, так и участки с высокой плотностью метилированных CpG. Для ZBTB38

было найдено два консенсусных метилированных мотива, с которыми он связывается *in vivo*, которые чаще всего располагались рядом с CpG островками [159].

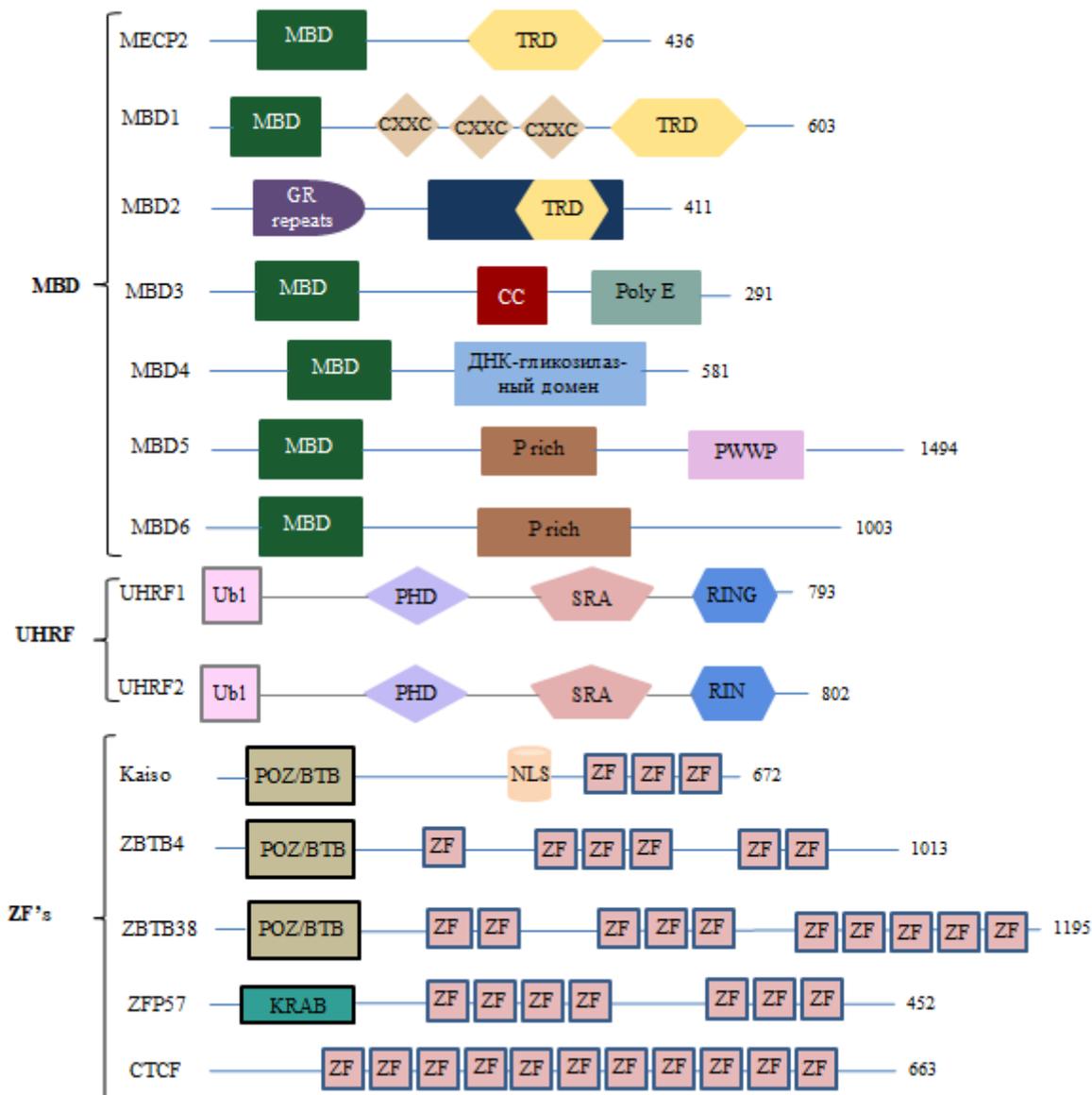
Некоторые белки, такие как KLF4, ZFP57 и SEBPB, также участвуют в связывании с метилированной ДНК *in vivo*. Около 18% геномных областей, с которыми связывается KLF4, сильно метилированы в мышечных эмбриональных стволовых клетках. Интересно, что метилированная последовательность, связанная с KLF4, отличалась от предпочтительного неметилированного мотива. Однако функциональное значение этих сайтов связывания еще не ясно. ZFP57 может связываться с метилированным мотивом TGCCGC *in vitro*, а именно с метилированным аллелем трех импринтированных генов мыши [151]. SEBPB может связываться с последовательностью TTGCGCAA, показано, что метилирование усиливает связывание с этим мотивом *in vitro* [156]. Было найдено около 200 мест в геноме, где SEBPB связывался с участками метилированными более чем на 50%. Вероятно, что плотность CpG, процент метилирования и плотность нуклеосом в геномной области сильно влияют на способность таких факторов, как KLF4, ZFP57 или SEBPB, получать доступ к метилированной последовательности [160–162].

Данные исследования подтверждают идею о том, что факторы транскрипции являются неотъемлемыми участниками гомеостаза метилирования ДНК. Большое количество взаимодействий DNMT3A/ТФ ограничено в клетках тем фактом, что экспрессия некоторых транскрипционных факторов является тканеспецифичной; нарушение структуры белка, участвующего в формировании мультибелковых комплексов DNMT-транскрипционный фактор; и потенциальными посттрансляционными модификациями, влияющими на DNMT и/или факторы транскрипции [126]. Также известно, что такая посттрансляционная модификация белка как сумоилирование DNMT3A нарушает его способность взаимодействовать с деацетилазами гистонов. На сегодняшний день существует очень мало доказанных случаев, когда сайт-специфический фактор надежно связывается с высокометилированным мотивом.

### **3.9 Белки интерпретаторы метилирования ДНК**

Метил-ДНК связывающие белки (MBP) - это белки, которые связываются с метилированной ДНК, могут привлекать к участкам связывания гистоновые деацетилазы и корепрессорные белковые комплексы, связывая между собой метилирование ДНК и модификации гистонов. Метил-ДНК связывающие белки делят на три структурных семейства [163]. Первое семейство содержит белки с MBD доменом (метил-ДНК-

связывающий домен): MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 и MBD4. Второе семейство включает UHRF1 и UHRF2, которые связывают ДНК с помощью домена SRA. Третье семейство белки цинковых пальцев, связывающие метил-CpG, представляют собой большое семейство MBP, и все члены содержат мотивы цинковых пальцев на С-конце, хотя они также могут связываться с метилированными и неметилированными последовательностями ДНК. Это семейство состоит из 8 членов: Kaiso (также известный как ZBTB33), ZBTB4, ZBTB38, ZFP57, KLF4, EGR1, WT1 и CTCF содержащих в своей структуре цинковые пальцы (Рисунок 10) [164].



**Рисунок 10. Структура метил-ДНК-связывающих белков.** Три типа доменов наделяют белки способностью распознавать метилированную ДНК: домен MBD, домен цинковых пальцев и домен SRA.

### 3.9.1 MeCP2

MeCP2 содержит MBD и TRD репрессионный домены [165,166]. MeCP2 сильнее репрессирует метилированные внутригенные энхансеры, он оказывает наибольшее влияние на гены в топологически ассоциированный домен (TAD) с высоким содержанием mCA, которые содержат множественные энхансеры. MeCP2 репрессирует внутригенные энхансеры больше, чем внегенные энхансеры, а дисрегуляция внутригенных энхансеров тесно связана с генными изменениями у мутантов MeCP2. Внутригенные энхансеры более легко контактируют со своими таргетными промоторами [167]. Ген, кодирующий *MeCP2*, расположен на X хромосоме. Мутации в гене *MeCP2* вызывают синдром Ретта, который характеризуется прогрессирующим неврологическим расстройством [168]. Мальчики с мутацией в этом гене имеют более тяжелые проявления заболевания, и умирают в раннем возрасте. Девочки, за счет случайной X инактивации имеют мозаичную картину экспрессии мутантного *MeCP2* в случае гетерозиготной мутации. Связываясь с метилированной ДНК, MeCP2 является репрессором транскрипции, привлекая к генам-мишеням гистондеацетилазы и корепрессор Sin3a [169]. MeCP2 важен для ремоделирования и сайленсинга хроматина [170]. У мышей, у которых *MeCP2* был удален в мозге, наблюдаются тяжелые неврологические симптомы в возрасте приблизительно шести недель. В других тканях компенсация отсутствия MeCP2 происходит за счет MeCP1. Через несколько месяцев после рождения у гетерозиготных самок мышей по *MeCP2* также проявились поведенческие симптомы. Отсутствие *MeCP2* влияет на стабильность функции мозга, а не на развитие мозга как такового [171]. Дефицит MeCP2 способствует репрограммированию клеток за счет стимуляции передачи сигналов IGF1 / АКТ / mTOR на ранней стадии репрограммирования [21]. Механизмом может быть то, что MeCP2 использует REST в качестве корепрессора, который, взаимодействует с промотором LIN28 [172]. При репрограммировании LIN28 усиливает экспрессию LIN41, прямой мишени микроРНК Let-7. МикроРНК Let-7 способствует дифференцировке, ингибируя гены, на которые нацелены основные факторы репрограммирования Oct4, Sox2 и Nanog, а ингибирование Let-7 повышает эффективность перепрограммирования у мышей [173] и человека [174].

### 3.9.2 MBD1

MBD1 содержит N-концевой домен MBD и C-концевой репрессионный домен TRD, а также два или три внутренних домена цинковые пальцы типа CXXC, число

которых зависит от сплайсинга. Изоформы MBD1, которые содержат только первые два цинковых пальца CXXC, связывают метилированную ДНК. Это связывание позволяет ему запускать метилирование H3K9 и приводит к репрессии транскрипции [175]. Присутствие третьего цинкового пальца CXXC обеспечивает MBD1 способность связывать неметилированную ДНК [175]. Использование доменов MBD и CXXC определяет специфичность связывания MBD1 и мишени MBD1 как для метилированных, так и неметилированных областей ДНК, в зависимости от ситуации. Основная роль MBD1 заключается в подавлении транскрипции путем метилирования гистонов и поддержания статуса гетерохроматина [176]. Нокаут по *MBD1* проявляется отклонением в поведении, у мышей наблюдается снижение способностей к обучению и нарушение памяти, изменения связанные с проявлением тревожного фенотипа [177].

### 3.9.3 MBD2 и MBD3

Из всех членов семейства MBD2 и MBD3 наиболее гомологичны. Гомология по аминокислотной последовательности составляет 71,1% [140]. MBD2 имеет несколько изоформ белка: MBD2, MBD2b и MBD2t. В MBD2b используется альтернативный сайт старта транскрипции затрагивающий MBD домен, в то время как в MBD2t изоформе теряется С-концевой репрессивный домен TRD, что приводит к раннему стоп-кодону. MBD2 не только связывается с гистондеацетилазой 1 (HDAC1), но также связывается с поддерживающей метилтрансферазой (DNMT1) и *de novo* метилтрансферазой (DNMT3A). DNMTs ассоциированы с комплексом белков ремоделинга хроматина (NuRD), и поскольку MBD2 рекрутирует NuRD к метилированной ДНК, это позволяет предположить, что метилирование ДНК работает в сочетании с ремоделированием хроматина [178]. MBD2 является репрессором транскрипции, привлекая гистондеацетилазу, репрессивные комплексы NuRD/Mi-2 и корепрессивные комплексы Sin3A [179]. Мыши нокаутные по MBD2 жизнеспособны, фертильны [180]. В соматических и частично репрограммированных клетках MBD2 связывается с метилированными промоторными областями *Nanog* и ингибирует транскрипцию. MBD2 напрямую регулирует экспрессию *Nanog*, что важно для достижения полного репрограммирования ИПСК. Подавление экспрессии *MBD2* в клетках СВ-CD34+ (лимфоидная линия клеток) и MRC-5 (линия культуры диплоидных клеток, состоящая из фибробластов, первоначально полученных из ткани легких 14-недельного абортинрованного плода мужского пола европеоидной расы) значительно увеличивает

эффективность репрограммирования с использованием факторов Яманаки. Это предполагает, что экспрессия *MBD2* накладывает определенный барьер для репрограммирования в клетках разных типов, и устранение опосредованного *MBD2* подавления *Nanog* с использованием экспрессии кластера *miR-302* имеет решающее значение не только для повышения эффективности репрограммирования, но и для обеспечения полного репрограммирования в клетках [20].

*MBD3* является единственным членом семейства у млекопитающих, который не связывается напрямую с метилированной ДНК. Он привлекается к метилированной ДНК в комплексе белков корперессоров. У лягушки в отличие от млекопитающих *MBD3* взаимодействует с метилированной ДНК напрямую [181]. *MBD3* является необходимым компонентом комплекса *NuRD* и участвует во многих путях регуляции генов эмбриогенеза. Роль *MBD3* в репрессии транскрипции связана с его взаимодействием с комплексом *NuRD/Mi-2*, *MBD3* считается необходимым для образования и стабильности *NuRD/Mi-2*. *MBD3-NuRD/Mi-2* играет ключевую роль в плюрипотентности и дифференцировке ЭСК [182]. Нокаут по *MBD3* у мыши летален в отличие от других метил-ДНК связывающих белков [183]. ИПСК, возникшие после нокаута *MBD3*, не способны к дифференцировке, хотя они экспрессировали все маркеры плюрипотентности. Напротив, чрезмерная экспрессия изоформы *MBD3b* вместе с факторами Яманаки увеличивала количество колоний ИПСК, образовавшихся из фибробластов как минимум в два раза [184].

### 3.9.4 *MBD4*

*MBD4* впервые найден по его метил-ДНК-связывающему домену, который гомологичен последовательности *MBD* доменам других белков [185]. На N-конце расположен *MBD* домен отвечающий за связывание с метилированной ДНК. На C-конце расположен каталитический домен, участвующий в вырезания, репарации ДНК. *MBD4* специфически катализирует удаление Т и У в паре с гуанином (G) внутри сайтов CpG [186]. *MBD4* способен удалять 5-mC из полуметилированной ДНК в системе *in vitro*, а фосфорилирование *MBD4* усиливает его активность 5mC гликозилазы [187,188]. Мыши дефицитные по *MBD4* жизнеспособные, однако, частота С -> Т замен в сайтах CpG увеличивается в три раза. На предрасположенных к раку *Apc* (Min / +) мышах с дефицитом *MBD4* показали ускоренное образование опухоли с мутациями CpG → TpG в гене *Apc* (adenomatous polyposis coli). Таким образом, *MBD4* подавляет мутабельность

CpG и онкогенез *in vivo* [189]. MBD4 связан с деметилированием ДНК. Рай и др. ранее показали, что MBD4 опосредует деметилирование ДНК у эмбрионов рыбок Данио-рерио, инициируя эксцизионную репарацию ошибочных пар GT, а также направляя действия индуцированной активацией дезаминазы (AID) и остановку роста и индуцируемый повреждением ДНК белок 45 альфа (Gadd45a). Однако некоторые исследователи придерживаются противоположного мнения. Как сообщают Детич и др., нет доказательств опосредованного AID-MBD4 деметилирования ДНК у эмбрионов рыбок Данио-рерио, что согласуется с результатами у человека. В некоторых статьях не обнаружено дефекта метилирования ДНК у мышей с нокаутом *MBD4*. MBD4 участвует в репрессии транскрипции посредством метил-CpG связывающей активности, что подтверждается исследованием, проведенным Кондо и др., предполагающим, что MBD4 является важным компонентом эпигенетического молчания [190].

### 3.9.5 UHRF1

Одна из основных функций UHRF1 - это воспроизведение профиля метилирования ДНК во время репликации. UHRF1 связывается с полуметилированной ДНК, чем облегчает связывание DNMT1 на вновь синтезированную цепь ДНК во время деления клеток [191]. На N-конце UHRF1 расположен убиквитин-подобный домен (UBL) обладающий убиквитинирующей активностью, тандемный тюдоровский домен (TTD) позволяет UHRF1 связываться с ди-/три-метилированным H3K9, гомеодомен растений (PHD) определяет специфичность связывания UHRF1 с H3R2 и H3K9me2/3, домен SRA связывается с полуметилированной ДНК и способствует поддержанию метилирования ДНК и модификаций гистонов путем привлечения DNMT1 и HDAC1 соответственно. Это необходимо для точного воспроизведения профиля метилирования ДНК при репликации. RING домен на C-конце обладает активностью E3-лигазы по отношению к гистоновым и негистоновым белкам [192,193]. UHRF1 является ключевым регулятором в поддержании метилирования ДНК. Он связывает гистон H3K9me2/3 и полуметилированную ДНК и рекрутирует DNMT1 к вилкам репликации ДНК во время S-фазы. Однако регуляторный механизм полуметилированной ДНК-связывающей активности UHRF1 остается неизвестным [194]. Потеря *UHRF1* приводит к гипометилированию и эмбриональной летальности у мышей [195]. UHRF1 важен на ранних стадиях эмбриогенеза [196–198]. Хотя ЭСК мыши с нокаутом *UHRF1* жизнеспособны, но демонстрируют замедление клеточного цикла, потерю метилирования ДНК, изменение структуры хроматина и

усиление транскрипции повторяющихся элементов [196,198]. *UHRF1* также высоко экспрессируется в нервных стволовых клетках. Интересно, что потеря *UHRF1* в нервных стволовых клетках ведет к активации ретровирусных элементов, подобно тому, что наблюдается в нокаутных по *UHRF1* ЭСК [199]. Добавление UHRF1 к трехфакторному коктейлю из Oct4, Sox2 и KLF4 приводит к увеличению эффективности репрограммирования МЭФ [191].

### 3.9.6 UHRF2

UHRF2 является паралогом UHRF1, который имеет сходную последовательность и архитектуру домена, но его биологическая функция не ясна [195]. UHRF2 был первоначально идентифицирован как регулятор клеточного цикла [200]. Он обладает более сильной аффинностью связывания с 5hmC, чем с C или 5mC [164,187,188]. UHRF2 содержит несколько доменов, в том числе SRA домен, который связывает 5hmC, на С-конце расположен RING домен с E3 убиквитин лигазной активностью [192,201].

UHRF2 является потенциальным онкосупрессором. UHRF2 также контролирует экспрессию генов, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, и способствует клеточной инвазии [202]. Несмотря на отсутствие глобальных изменений метилирования ДНК, уровни 5mC снижены в определенных геномных локусах в мозге мышей с нокаутом *UHRF2*. UHRF1 и UHRF2 сходным образом обогащены H3K9me3-богатым перичентрическим гетерохроматином, что указывает на то, что они имеют общие сайты связывания. Поскольку UHRF1 и UHRF2 имеют различную структуру своих доменов SRA и, вероятно, также в других доменов, возможно, что UHRF2 имеет уникальные позиции связывания, которые не заняты UHRF1 [195]. Мыши нокаутные по *UHRF2* жизнеспособны, но у них развиваются спонтанные судороги и наблюдается аномальная электрическая активность в мозге [195]. UHRF2 поддерживает уровни 5mC только в определенных геномных локусах. Это согласуется с фенотипами, наблюдаемыми у мышей: глобальное снижение уровня 5mC у мышей с нокаутом *UHRF1*, вызывающее раннюю эмбриональную летальность, и умеренный дефект 5mC у мышей с нокаутом по *UHRF2*, совместимый с эмбриональным развитием и вызывающий тонкие дефекты в головном мозге. Это также согласуется с предыдущими исследованиями экспрессии генов, которые показывают, что *UHRF2* сильно экспрессируется в соматических клетках, предполагая, что функция UHRF2 вряд ли требуется для глобальных уровней 5mC, которые важны для всех клеток, включая стволовые клетки. Вместо этого наиболее яркий

фенотип у мышей с нокаутом *UHRF2* встречается в головном мозге, который в основном состоит из дифференцированных клеток. Пока неясно, почему нокаут *UHRF2* у мышей специфически влияет на функцию мозга. Одна возможность состоит в том, что *UHRF2* сильно экспрессируется в головном мозге, как сообщают другие, и играет более важную роль в регулировании уровней 5mC в головном мозге [195].

### 3.9.7 ZNF57

*ZFP57* является членом семейства KRAB-белков цинковых пальцев. *ZFP57* высоко экспрессируется в недифференцированных ЭСК, но его экспрессия подавляется при дифференцировке. *ZFP57* у мышей и его ортолог *ZNF57* у человека нацеливает DNMTs на ICR для метилирования ДНК в областях контролирующим импринтинг путем связывания с метилированной гексонуклеотидной последовательностью TGCCGC в ICR и впоследствии взаимодействует с TRIM28. TRIM28 выполняет функцию кофактора для KRAB-белков. Взаимодействовать *ZFP57* с DNMTs напрямую не может. Он осуществляет свое взаимодействие через TRIM28, который связывается как с *de novo*, так и с поддерживающей DNMTs, тем самым опосредует взаимодействие между *ZFP57* и DNMTs. В большом количестве импринтированных областей *ZFP57* поддерживает уровень метилирования ДНК в ЭСК. Эту функцию *ZFP57* осуществляет за счет KRAB домена. Потеря только зиготической функции *ZFP57* вызывает частичную неонатальную летальность у мышей, в то время как устранение как материнской, так и зиготической функций *ZFP57* приводит к эмбриональной летальности с высокой пенетрантностью.

### 3.9.8 KLF4

Впервые KLF4 идентифицирован, как фактор связанный с задержкой роста. KLF4 принадлежит к семейству SP/KLF, которое характеризуется наличием на С-конце трех цинковых пальцев [203]. На N-конце содержится домен трансаактивации (TAD), и прилегающие к нему репрессивный домен, которые совместно определяют специфичность транскрипционной регулирующей активности KLF4, взаимодействуя с другими факторами и влияют на эффективность взаимодействия с ДНК. KLF4 в своей структуре содержит сигнал ядерной локализации (NLS) [204,205]. Мышиный KLF4 на 91% идентичен человеческому, состоит из 483 аминокислот [205]. У человека есть несколько вариантов сплайсинга, которые идентифицированы в нормальных и раковых клетках [206–208]. Экспрессия *KLF4* регулируется на транскрипционном и

посттранскрипционном уровне. На посттрансляционном уровне активность регулируется фосфорилированием по 132 серину, что приводит к индукции дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [209]. Ацетилирование по 225 и 229 остаткам лизина комплексом p300/CBP, ингибирует способность активировать ниже стоящие мишени метаболических путей [210]. Увеличение экспрессии *p300/CBP* приводит к ацетилированию KLF4. В структуре KLF4 содержится SUMO-взаимодействующий домен (SIM). В ЭСК сумоилирование KLF4 по лизину 275 снижает его влияние на транскрипцию генов мишеней [211]. В 2006 году было показано, что KLF4 при определенных условиях культивирования эмбриональных клеток и фибробластов мыши индуцируются в плюрипотентные стволовые клетки с помощью сверхэкспрессии четырех специфических факторов: *Oct3/4*, *Sox2*, *C-Myc* и *KLF4*. Первоначально при индукции плюрипотентности KLF4 репрессирует маркеры дифференцировки и облегчает экспрессию генов плюрипотентности на более поздней стадии [212]. Например, сумоилирование KLF4 по лизину 275 приводит к ингибированию транскрипции *Nanog* и тем самым ингибирует индукцию ИПСК [213]. Сумоилирование KLF4 в клетках человека способствует его деградации [214]. Большое количество лизинов облегчает убиквитинирование и дальнейшую деградацию [215]. Гиперметилирование CpG в промоторе *KLF4* и метилирование гистонов влияют на его активность в раковых и стволовых клетках [216–219]. Одна из основных функций KLF4 способствовать выживанию путем подавления апоптоза. KLF4 подавляет p-53-зависимый путь апоптоза путем прямого ингибирования TP53 и подавления экспрессии *BAX* [220–223]. Мыши нокаутные по *KLF4* демонстрируют минимальные фенотипические изменения, а именно утолщенную интиму артерий после повреждения сосудов [224,225].

### 3.9.9 ZBTB4

ZBTB4 содержит на С-конце цинковые пальцы и N-конце VTB/POZ домен. ZBTB4 обладает двойной специфичностью. Он распознает специфическую олигонуклеотидную последовательность CT/CGCCATC, а также метилированные CpG-динуклеотиды. ZBTB4 также связывается с очень похожим консенсусным сайтом связывания Kaiso (KBS) *in vitro* [226]. *ZBTB4* высоко экспрессирован в гиппокампе, стволе мозга, обонятельной луковице, грушевидной коре и мозжечке [152]. Он функционирует как белок-репрессор транскрипции, рекрутирует Sin3/HDACs и способствует подавлению экспрессии гена мишени [227]. Снижение экспрессии *ZBTB4* коррелирует с высокой нестабильностью

гена при многих распространенных раковых заболеваниях человека. Низкие уровни экспрессии *ZBTB4* обнаруживаются на поздних стадиях, тогда как высокая на ранних стадиях прогрессирования заболевания. В линиях клеток человека дефицита *ZBTB4* достаточно для увеличения распространенности микроядер и двуядерных клеток параллельно с нарушением экспрессии гена контрольной точки митоза, ослабленной контрольной точкой митоза и повышенной частотой отставания хромосом во время митоза. Мыши с дефицитом *ZBTB4* имели меньший размер тела, чем у их однопометников дикого типа. Первичные клетки, выделенные из *ZBTB4* нокаутных мышей, проявляли пониженную активность митотических контрольных точек, повышенные митотические дефекты, анеуплоидные клетки и повышенную геномную нестабильность. Мыши нокаутные по *ZBTB4* более восприимчивы к канцерогенезу кожи, вызванному 7,12-диметилбенз (*a*) антраценом/12-*O*-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом [226].

### 3.9.10 ZBTB38

ZBTB38 имеет несколько цинковых пальцев на С-конце и на N-конце POZ/BTB домен. ZBTB38 может связываться с более высоким сродством с метилированными динуклеотидами CpG в консенсусной последовательности 5'-CGCG-3', но также может связываться с элементами E-box (5'-CACGTG-3'). Также может специфически связываться с одной парой метил-CpG. Активирует или подавляет транскрипцию метил-CpG-зависимым образом [152]. ZBTB38 регулирует экспрессию генов, репликацию ДНК и стабильность генома [228]. ZBTB38 обнаружен в мозге и нейроэндокринных органах, высоко экспрессируются в головном мозге [152,229]. Может участвовать в дифференцировке и / или выживании нейронов позднего постмитоза. ZBTB38 играет роль в подавлении активности IL1R2 при аутоиммунном артрите [230]. ZBTB38 способствует пролиферации ЭСК, ингибирует дифференцировку ЭСК по направлению к мезодермальному профилю и подавляет апоптоз в клетках мышей. У людей уровень экспрессии ZBTB38 важен для его нормальных физиологических функций, а его неправильная регуляция приводит к развитию онкологии и нейродегенеративных заболеваний. Потеря одиночного аллеля *ZBTB38* ведет к нарушению эмбрионального развития. Потеря *ZBTB38* снижает экспрессию *Nanog* и *Sox2*, оба из которых имеют решающее значение для пролиферации и дифференцировки эпибласта [231].

### 3.9.11 Kaiso

Kaiso (кодируемый геном *ZBTB33*) содержит на N-конце ВТВ/POZ домен, а на C-конце три цинковых пальца, а также сигнал ядерной локализации (NLS). Используя цинковые пальцы C2H2 типа, Kaiso распознает метилированную ДНК и последовательности, содержащие CTGCNA (KBS) [232,233]. Гидроксиметилирование ингибирует связывание Kaiso с ДНК [234,235]. Kaiso наряду с ZNF57 имеет наибольшее сродство к метилированной ДНК по сравнению с остальными факторами. Связывание Kaiso с метилированными участками более чем в 20 раз лучше по сравнению с неметилированными последовательностями, в отличие от остальных белков с цинковыми пальцами, для которых эффективность связывания с метилированным последовательностям выше до трех раз или не отличается от неметилированной последовательности. Kaiso обладает способностью функционировать как транскрипционный репрессор и активатор, в зависимости от участков связывания и посттрансляционной модификации сумоилирования [236]. Сумоилирование Kaiso происходит по 42 лизину, расположенному в ВТВ/POZ домене. Десумоилированный Kaiso является сильным репрессором по сравнению с сумоилированной формой белка. Было предпринято несколько попыток определить профиль связывания Kaiso в геноме мыши и человека. Основная сложность в идентификации таких участков заключается в подборе антител для специфичной хроматин иммунопреципитации. Первая попытка определить сайты показала, что Kaiso преимущественно связывается с неметилированными последовательностями, но не с KBS, содержащими участками, что противоречило данным *in vitro*. Вторая работа показала диаметрально противоположную картину, большинство участков связывания Kaiso было метилировано, и опять не было найдено обогащение KBS последовательностями [159,237]. Таким образом, на данный момент времени имеется несколько различных результатов с полногеномным распределением Kaiso, ни один из которых не показал обогащения сайтами KBS, хотя *in vitro* ситуация обратная. Основным недостатком применяемых антител в данных работах - это неспецифичное узнавание других факторов, что было подтверждено иммунофлуоресцентным окрашиванием Kaiso нокаутных клеток [238].

Kaiso также известен как модулятор WNT-сигнального пути. Он связывается с целым рядом регуляторных элементов WNT-зависимых мишеней: *PPAR $\delta$* , *c-Myc*, *Cyclin D1* и *Matrilysin* [239,240]. Он вовлечен в развитие воспаления кишечника. Так, увеличение экспрессии Kaiso в тонком кишечнике мышей вызывало сильный воспалительный ответ

[241]. Подтверждение важности *Kaiso* в развитии воспаления и онкообразования было показано на модели рака кишечника APC<sup>min</sup>. Удаление *Kaiso* в этой модельной системе приводило к увеличению времени жизни мыши, снижению объема и количества опухолей [242]. *Kaiso* связывает метилированные CpG и участвует в подавлении транскрипции нескольких генов-супрессоров опухолей, таких как *CDKN2A*, *HIC1* и *MGMT*. С другой стороны, *Kaiso* подавляет протуморогенный сигнальный путь WNT с помощью множества механизмов, включая прямую регуляцию канонических мишеней WNT, таких как *MYC*, *FOS*, *Siamois* и *CCND1*, а также посредством белок-белковых взаимодействий с TCF3/TCF4, которые нарушает связывание с  $\beta$ -катенином и промоторами мишеней [233]. Белковое взаимодействие с цинковыми пальцами *Kaiso* может нарушать их способность связываться с ДНК, как было показано при образовании комплекса p120-*Kaiso*, или может не влиять на связывание ДНК, как в случае с геном миелоидной транслокации MTG16 [243]. Взаимодействие белков с цинковыми пальцами *Kaiso* может регулировать наличие NLS, расположенного вблизи цинковых пальцев. Например, p120 катенин может маскировать NLS *Kaiso*, что приводит к его транслокации в цитоплазму [244,245].

Нокаут гена *Kaiso* не влияет на развитие мышей, их фертильность, однако, как и для многих метил-ДНК связывающих белков он важен при формировании памяти и при обучении. Дефицит *Kaiso* увеличивает двигательную и исследовательскую активность мышей, а также подавлял препульс акустического рефлекса испуга без какого-либо неблагоприятного воздействия на поведение, связанное с тревогой, обучением и памятью. В то же время дефицит *Kaiso* вызывает выраженный антидепрессантный эффект. Таким образом, удаление *Kaiso* влияет на локомоцию и развитие депрессивно-подобного поведения. Также у *Kaiso* нокаутных мышей наблюдается снижение объема боковых желудочков мозга в три раза по сравнению с животными дикого типа [246]. Клетки нервной системы подтверждены наиболее частому изменению метилирования ДНК при обучении и формировании памяти, поэтому исследование функциональной значимости метил-ДНК связывающих белков является необходимым для раскрытия этих механизмов.

Участие *Kaiso* в интерпретации метилирования ДНК, влиянии на эпигенетический паттерн в первую очередь связано с привлечением корепрессоров NCoR и SMRT, в комплекс с которыми входят гистондеацетилазы [16,247]. Однако, недавно было показано, что *Kaiso* участвует в регуляции метилирования импринтированного локуса H19/IGF2. *Kaiso* детектируется на метилированном аллеле. Удаление *Kaiso* приводит к снижению метилирования в контролирующем импринтинг локусе в данном участке, но не

приводит к изменению транскрипционной активности данного локуса [17]. Однако, данных о том, может ли влиять Kaiso на метилирование в полногеномном масштабе нет.

### **3.10 Заключение**

Изучение влияния белка Kaiso на динамический процесс метилирования ДНК в клетках представляет собой важный аспект в понимании механизма регулирования метилирования ДНК. Метилирование ДНК является эпигенетическим механизмом, участвующим во многих важных клеточных процессах, таких как пролиферация и дифференцировка клеток, репрессия транскрипции, геномный импринтинг, организация хроматина и инактивация X-хромосомы [248]. Большое количество факторов участвует в поддержании баланса между метилированием и деметилированием ДНК. Известно, что метил-ДНК-связывающий белок Kaiso влияет на деацетилирование гистонов, привлекая репрессивные комплексы NCoR, SMRT. Однако, появляются данные, что Kaiso может участвовать в установлении и поддержании метилирования определенных локусов. Так, дефицит Kaiso приводит к снижению метилирования ICR в локусе H19/IGF2. Однако на сегодняшний день не известно, может ли Kaiso влиять на метилирование ДНК на уровне генома, может ли Kaiso взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами или же конкурировать с KLF4, может ли Kaiso как эпигенетический регулятор влиять на процесс репрограммирования соматических клеток.

## 4) МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 4.1 Экспериментальные животные

В эксперименте использовали мышей линии C57BL/6 (WT) и нокаутных по гену *Kaiso* C57BL/6/*Kaiso*<sup>-/-</sup> (*Kaiso* KO), которые получены из «SPF-вивария» ИЦиГ СО РАН, а также трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6, несущих доксициклининдуцибельную кассету с факторами Яманаки (*Sox2*, *cMyc*, *Klf4*, *Oct4*) и трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6 с нокаутом гена *Kaiso* (предоставлены д.б.н. Томилиным А.С., Институт цитологии РАН). Для работы использовали эмбрионы в возрасте 13,5 дней WT и *Kaiso* KO. Содержание мышей и все экспериментальные манипуляции выполнялись в соответствии с международными правилами обращения с животными (Директива 86/309 Европейского сообщества от 24 декабря 1986 г.).

### 4.2 Клеточные линии

МЭФ были получены из эмбрионов мышей, согласно протоколу Nefzger et al. [249]. МЭФ и клетки эмбриональной почки человека линии HEK293, HEK293T, клетки опухоли светлоклеточного рака почки линии Saki-1 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Hyclone», США) и 1× пенициллина/стрептомицина. ИПСК культивировали в среде KnockOut DMEM (ThermoFisher, США) с добавлением 5% FBS, предназначенной для работы со стволовыми клетками, 10% SR (Serum Replacement; «Gibco», США), 1% MEM NEAA (100×, non essential amino acids, «ThermoFisher», США), 1% глутамакса, 1×пенициллина/стрептомицина, 1×доксициклина, 1000 ед/мл LIF (leukemia inhibitory factor, «ThermoFisher», США), 50 мМ β меркаптоэтанола.

### 4.3 Генотипирование мышей

Геномную ДНК выделяли из головы эмбриона. Голову лизировали в буфере: 100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8.0, 25 мМ ЭДТА, 0.5% SDS, 0.1 мг/мл протеиназа К. Лизирующий буфер брали из расчета 1 мл на 100 мг ткани и инкубировали ткань в буфере ночь при температуре 37°C. Далее проводили очистку ДНК смесью фенол/хлороформ (1:1). К лизату добавляли 1 объем смеси фенол/хлороформ, перемешивали, центрифугировали 5 минут на максимальных оборотах. Затем отбирали верхнюю фазу и к ней добавляли 1 объем хлороформа. Центрифугировали 5 минут при максимальных оборотах, отбирали водную фазу. Далее добавляли два объема 96% этанола и 1/10 объема

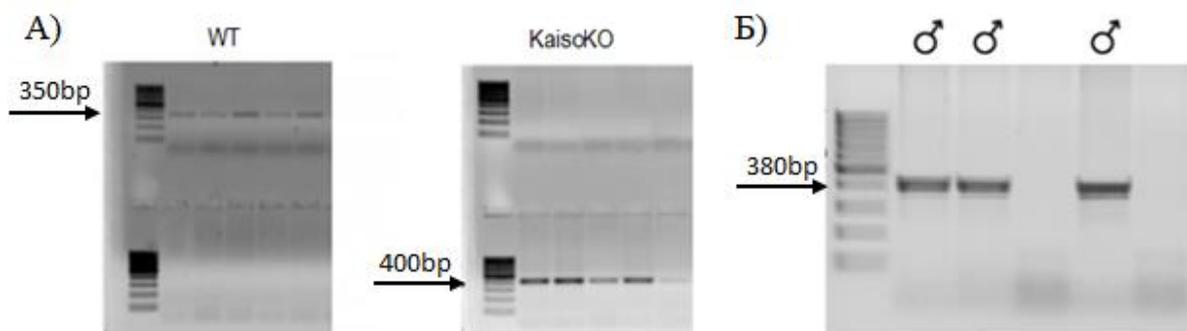
5M NaCl. Инкубировали 10 минут на льду, после чего центрифугировали при максимальных оборотах в течение 10 минут. Отбирали супернатант и осадок промывали 70% этанолом. Центрифугировали в течение 5 минут на максимальных оборотах и отбирали супернатант. Образовавшийся осадок содержащий ДНК сушили в термостате при +37°C и растворяли в деионизованной воде (mQ). Генотипирование осуществлялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Условия ПЦР: 95°C 3 мин; 30 циклов: 95°C - 30 сек, 59°C - 30 сек и 72°C - 1 мин; 72°C - 10 мин) с использованием следующих последовательностей праймеров (Таблица 2).

**Таблица 2. Последовательность праймеров для генотипирования.**

Ген	Праймер	Последовательность
Kaiso	Kaiso LS3	5'GACACACAGTCAAAAGCTAGTG 3'
	Kaiso BTBrev	5' AGGCTGAAAGGATGTTCCSTATG 3'
	KaisoRev	5' AGAAGGCTGATCTCCATTTGGA 3'
SRY	SRY2	5' TCTTAAACTCTGAAGAAGAGAC 3'
	SRY4	5' GTCTTGCCTGTATGTGATGG 3'
Col/4F2A	Col frtA For	5' GCACAGCATTGCGGACATGC 3'
	Col frtB Rev	5' CCCTCCATGTGTGACCAAGG 3'
	Col 4F2A Rev	5' TTGCTCAGCGGTGCTGTCCA 3'

ПЦР продукты разделяли в 1.5% агарозном геле, с использованием 1xTAE буфера с добавлением бромистого этидия (10мг/мл). Перед нанесением к образцу добавляли 6xкраску (0.25% бромфенола, 0.25% ксиленцианола и 30% глицерина). Электрофорез проводили при условиях: сила тока в 40А; 1xTAE буфер. Результаты электрофореза фиксировались с помощью цифровой камеры УФ трансиллюминатора, при длине волны УФ — 280 нм. Результаты фиксировали на приборе для документирования гелей (Typhoon trio Amersham, Англия).

Размеры продуктов амплификации соответствовали 338 п.о. (WT, Kaiso LS3 – Kaiso BTBRev) и 403 п.о. (КО, Kaiso LS3 – KaisoRev); 382 п.о. (самец, SRY2 – SRY4). Эмбрионы генотипировали по половому признаку, а также по Kaiso -/y. (Рисунок 11).



**Рисунок 11. Генотипирование.** А - WT 350 п.н., Kaisc KO 400 п.н. Б - Генотипирование по половому признаку. Самцы 380 п.н.

#### 4.4 Получение эмбриональных мышечных фибробластов

МЭФ были получены на 13-й день развития эмбрионов мыши. Рог матки клали на чашку Петри содержащую 10 мл 1×PBS. Переносили в клеточный бокс. Разрезали рог матки на куски содержащие один эмбрион. Помещали каждый эмбрион в отдельную 10 см чашку с 10 мл 1×PBS. Удаляли голову, конечности и внутренние органы с помощью скальпеля. Голову помещали в 1,5 мл пробирку для генотипирования, которое позволяло отбирать эмбрионы мужского пола. Переносили туловище в новую 10 см чашку Петри. Используя хирургические лезвия, измельчали эмбрион в течение 2 минут. Добавляли 200 мкл триплекса к измельченному эмбриону и инкубировали 3-5 минут при комнатной температуре. Затем продолжали измельчать в течение 2 минут, после добавляли 1 мл среды DMEM+/+ для инактивации триплекса. Пипеткой на 1000 мкл дополнительно осторожно механически диссоциировали ткани. Добавляли 9 мл среды DMEM+/+. После 24-48 часов чашка была полностью покрыта МЭФ.

#### 4.5 Анализ клеточной пролиферации

МЭФ высевали в 96-луночные планшеты (в расчете 1000-7000 клеток на лунку). Через 24 часа оценивали пролиферативную активность клеток при помощи колориметрического теста (МТТ). МТТ (98% тиазолиловый синий тетразолий бромид; SigmaAldrich, США) добавляли в каждую лунку до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение трех часов и затем ресуспендировали в 50 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность образовавшегося МТТ-формазана, растворенного в ДМСО, измеряли при 540 и 595 нм при помощи устройства для считывания микропланшетов iMark™ (Bio Rad, США).

## 4.6 Получение лентивируса и трансдукция МЭФ

Лентивирус был получен путем кальций-фосфатной трансфекции клеток HEK293T вектором pHAGE-STEMCCA (Profection Mammalian Transfection System; Promega, США). Вектор содержал индуцируемую доксициклином кассету, которая обеспечивала эквимольную экспрессию факторов Yamanaka (Oct4, Sox2, cMyc, Klf4) в присутствии доксициклина в среде. Вирус осаждали 40% ПЭГ в конечной концентрации 12,5%, ресуспендировали в среде OptiMEM (ThermoFisher), хранили при -70°C. При трансдукции МЭФ лентивирусом к среде добавляли полибрэн до концентрации 8 мкг/мл. Начиная со следующего дня после трансдукции клетки культивировали в среде ИПСК, содержащей 2 мкг/мл доксициклина. Эффективность МЭФ-трансдукции определяли иммунофлюоресцентным окрашиванием на Oct4 на следующий день после добавления доксициклина.

## 4.7 Окрашивание на щелочную фосфатазу (ЩФ)

Клетки фиксировали в 4% формалине в 1×PBS в течение 10 минут. Затем промывали 2 раза 1×PBS. Предварительно в день окраски готовили 3 раствора.

Раствор 1. Триса 0,103г, трис гидрохлорида 0,032г, натрия хлорида 0,183г растворяли в 30 мл mQ.

Раствор 2. 180 мкл и 0,015г нафтол AS-VI фосфата.

Раствор 3. 0,06 г нитрита натрия, 60 мкл фуксина и 150 мкл mQ.

Добавляли раствор 3 в раствор 1 и затем добавляли раствор 2. Тщательно перемешивали и добавляли к клеткам. Инкубировали 15 минут, затем промывали 1×PBS.

## 4.8 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки культивировали на покровном стекле, промывали 1×PBS и фиксировали в течение 10 минут при комнатной температуре в 4% параформальдегиде. Затем клетки промывали 3 раза PBS/глицином, инкубировали в течение 5 минут в 0,2% Tween20/PBS, 3 раза промывали PBS/глицином и блокировали в 0,3% молоко/PBS в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали в блокирующем буфере, содержащем первичные антитела против Oct4 (ab19857; Abcam, США), Sox2 (ab97959; Abcam, США), Nanog (ab80892; Abcam, США) и SSEA1 (ab16285; Abcam, США) в течение ночи при 4°C. После отмывания первичных антител клетки окрашивали вторичными антителами кролика Alexa Fluor 488 в течение одного часа в блокирующем буфере. После отмывания

от вторичных антител клеточные ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; ThermoFisher, США). Заключили в среду ProLong Dimond Antifade Mountant (Invitrogen, США) и анализировали клетки под микроскопом Eclipse TiS (Nikon, Япония) [242].

#### 4.9 Таргетный бисульфитный анализ

Бисульфитную конвертацию проводили с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (ZymoResearch, США) в соответствии с инструкциями производителя. Конвертированную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР на приборе T100 Thermal Cycler (BioRad, США) с использованием праймеров (Таблица 3). Условия ПЦР: 95°C - 3 мин; 35 циклов: 95°C - 30 с, 59°C - 1 мин и 72°C - 1 мин; 72°C - 10 мин. ПЦР продукты очищали с помощью набора для экстракции из геля QIAquick (Qiagen, США) и затем клонировали в векторе pTZ57R/T (Thermo Scientific, США) с использованием набора для клонирования Ins TAclone PCR (Thermo Scientific). Полученные клоны анализировали секвенированием по Сэнгеру с помощью праймера M13 с использованием анализатора ДНК 3730.(Applied Biosystems, США) [242].

**Таблица 3. Последовательность праймеров**

Мишень	Название праймера	Последовательность праймера
Nanog	Nanog For	5' ATTTATAGGGTTGGTGGGGCG 3'
	Nanog Rev	5' TTTTGGGTGTGAGTATAGTTAT 3'
Oct4	Oct4 For	5' TGGATATGGGTTGAAATATTGGG 3'
	Oct4 Rev	5' TCCTCTACCCCTACCTTAAAT 3'
TRIM 25	TRIM 25 For	5' TTGAATTCTTAGATGAGTGTGGGAAGG 3'
	TRIM 25 Rev	5' TTGGATCCAATCGAAACACAАСТАСТАСС 3'

#### 4.10 Анализ метилирования ДНК методом ограниченного бисульфитного секвенирования CpG-богатых областей (RRBS)

Три отдельных биологических повтора из клеточной линии МЭФ дикого типа и Kaiso КО МЭФ были взяты для бисульфитного секвенирования. Два микрограмма геномной ДНК образца рестрицировали с использованием 60U MspI (Fermentas, США) в 50 мкл при 37°C в течение 18–24 ч с последующей очисткой набором QIAquick (Qiagen,

Германия). Рестрицированную ДНК восстанавливали, и к 3'-концу фрагментов ДНК добавляли аденин в соответствии со стандартном Illumina и протоколом add\_A (Illumina, США). Предварительно отжигали адаптеры Illumina, содержащие 5'-метилцитозин вместо цитозина, лигировали с обоих концов фрагментов ДНК с использованием стандартного протокола лигирования адаптера Illumina (Illumina, США). Лигированные фрагменты затем разделяли в 2% агарозном геле (Sigma-Aldrich, США). Фрагменты от 170 до 350 п.н. (включая длину адаптера) были отобраны и вырезаны из геля. ДНК выделяли из геля с использованием набора для экстракции геля Qiagen (Qiagen, Германия). Обработку бисульфитом натрия и последующую очистку выделенной ДНК нужного размера проводили с помощью набора EZ DNA Methylation™ (ZymoResearch, США) в соответствии с инструкциями производителя. Обработанные бисульфитом фрагменты ДНК амплифицировали с помощью ПЦР и следующей реакции: 5 мкл элюированной ДНК, 1 мкл NEB PE ПЦР, два праймера (1,0 и 2,0) и 45 мкл Platinum PCR Supermix (Invitrogen, США). Условия амплификации были следующими: 5 мин при 95°C, 30 с при 98°C, затем 15 (10 с при 98°C, 30 с при 65°C, 30 с при 72°C), затем 5 мин при 72 ° C. ПЦР-продукт очищали с помощью набора для очистки MinElute PCR (Qiagen, США), и бисульфитную библиотеку элюировали в 15 мкл буфера EB. Концентрацию библиотеки измеряли, используя биоанализатор Agilent 2100 (Agilent Technologies, США). Библиотека была секвенирована на платформе Illumina 2500 в соответствии со стандартными протоколами генерации и секвенирования Illumina. Генерировали одноцепочечные прочтения по 100 п.н. Далее работа выполнялась сотрудниками лаборатории Геномики и Эпигеномики Позвоночных ФИЦ Биотехнологии РАН. Прочтения были выравнены на геном hg19 с помощью программного обеспечения Bismark15. Дифференциальный анализ метилирования проводили с помощью программного пакета MethPipe/RADmeth [250]. Подсчеты метилирования ДНК были объединены между прямой и обратной цепями для каждого CpG, таким образом исключая потенциально мутированные сайты CpG. Сначала нашли дифференциально метилированные отдельные позиции CpG. Затем позиции были агрегированы в DMR с параметрами по умолчанию.

#### **4.11 Клонирование ПЦР продукта**

ПЦР-продукт разгоняли в 1% агарозном геле и проводили очистку с использованием набора для элюции ДНК из геля QIAquick Gel-extraction kit («Qiagen»,

США) в соответствии с протоколом производителя. Полученный фрагмент клонировали в Т-вектор согласно протоколу набора TA Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific, США).

#### 4.12 Редактирование генома

Редактирование с помощью CRISPR/Cas9 было проведено как описано в статье [26]. Клетки Саки-1 трансфецировали только плазмидой рХ459-Kaiso для получения клеток КО (сдвиг рамки) или с помощью ssODN 5'-CGTGGCCATGGACTCTTCTGTGATGTTACCGTTATTGTGGAAGACCGACGCTTCCGC GCTCACAAGAATATTCTTTTCAGCTTCTAGTACC для получения клеток К42R (замена одного нуклеотида), рХ459-KLF4 или рХ459-Kaiso или обеими плазмидами для генерации сдвига рамки считывания. Клетки трансфецировали. Добавляли пурамицин через 24 часа в концентрации 1 мкг/мл для клеток НЕК293 и 2 мкг/мл для клеток Саки-1. Инкубировали в течение 72 ч, пассировали в 96-луночный планшет в расчете 1 клетка на 2 лунки на среде без пурамицина. Далее анализировали клоны с помощью вестерн блот анализа.

#### 4.13 Получение конструкции

Для получения плазмидных конструкций использовали вектор для геномного редактирования с использованием CRISPR/Cas9 системы и вектора рSPCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene #48139), в который была добавлена последовательность, направляющая конструкцию к месту внесения мутации:

Crisp\_ZBTB33\_for 5'-CACCGTGTGGAAGACCGAAAATTCC,

Crisp\_ZBTB33\_rev 5'-AAACGGAATTTTCGGTCTTCCACAC,

Crisp\_KLF4\_for 5'-CACCGGAGCCGGTGCGGCTTGCGG,

Crisp\_KLF4\_rev 5'-AAACCCGCAAGCCGCACCGGCTCC.

Для формирования вставки для каждой конструкции было взято по 100 мкмоль каждого из пары олигонуклеотидов, 1 мкл Т4-лигазы, 10хбуфер для Т4-лигазы, общий объем смеси доводился до 10 мкл. Смесь инкубировали 30 минут при 37°C, 5 минут при 95°C, после чего температура смеси опускалась до 25°C. Плазида была обработана рестриктазой Bbs1. Лигирование в вектор осуществлялось с помощью Т4 лигазы на +4°C в течение ночи.

Сдвиг рамки в генах *KLF4* и *Kaiso* были подтверждены секвенированием по Сэнгеру соответствующих ампликонов, полученных в результате ПЦР с геномной ДНК (KLF4\_for 5'-TCCCACATGAAGCGACTTCC, KLF4\_rev 5'-GGATGGGTCAGCGAATTGGA;

Kaiso\_for 5'-CATGGAGAGTAGAAAACCTGATTT, Kaiso\_rev 5'-  
CACTCCTAATAACTGCCCTGA).

#### 4.14 Иммунопреципитация хроматина и секвенирование

Иммунопреципитацию хроматина проводили с помощью магнитного набора ab156907 (Abcam, США) в соответствии с инструкциями производителя. Иммунопреципитацию проводили антителами H3K27ac (ab4729; Abcam, США) H3K9me3 (ab8898 Abcam, США) в двух повторах. Библиотеки были сконструированы с помощью набора для подготовки библиотек ДНК NEBNext® Ultra™ II для Illumina® (NEB, США) и секвенированы в режиме однократного прочтения с длиной чтений 50 п.н. Количество считываемых данных было скорректировано для достижения максимального насыщения. Далее работа выполнялась сотрудниками лаборатории Геномики и Эпигеномики Позвоночных ФИЦ Биотехнологии РАН. Для контроля качества данных секвенирования ДНК использовали программу FastQC [251]. Прочтения с качеством ниже 20 были отфильтрованы с помощью cutadapt, а также были усечены до 50 нуклеотидов. Прочтения были выравнены на геном человека (GRCh37/hg19) с использованием базы Bowtie2. MACS2 [252], использовали для поиска пиков, а пики были аннотированы с помощью Bedtools.

#### 4.15 ChromHMM анализ

Треки были загружены из базы данных ENCODE: wgEncodeAwgSegmentationChromhmm, wgEncodeRegTfbsClusteredV3. Для всех состояний ChromHMM оценили соотношение гипер- или гипометилированных CpG к общему числу CpG. Консервативные сайты связывания транскрипционных факторов были взяты из трека транскрипционных факторов. Пропорцию #Гипер / (# Гипер + # Гипо) рассчитывали для каждого фактора транскрипции. Данные об энхансерах взяты из базы данных Fantom [176], их активность подтверждалась наличием гистоновой модификации H3K27ac.

#### 4.16 Анализы полногеномного метилирования ДНК

Далее работа выполнялась сотрудниками лаборатории Геномики и Эпигеномики Позвоночных ФИЦ Биотехнологии РАН. Прочтения выравнивали на геном GRCh37/hg19 с помощью программы Bismark [253]. Эффективность бисульфитной конвертации (> 99%) оценивали с использованием как лямбда-фага, так и метилирования вне-CpG-контекста.

Индивидуальные дифференциальные CpG были идентифицированы с использованием подхода бета-биномиальной регрессии, реализованного в MethPipe [254]. Чтобы получить DMR, сначала выполнили тест хи-квадрат для отдельных CpG, которые были покрыты по крайней мере четырьмя прочтениями в каждой повторности, затем выполнили корректировку Бенджамини-Хохберга. Последовательные CpG, попадающие под критерии ( $FDR < 0,2$ , разница в метилировании  $> 0,1$ ), были определены как DMR. Таблица сопряженности для теста хи-квадрат состояла из метилированных и неметилированных чисел прочтений, как описано в [255].

#### 4.17 Секвенирование РНК

Суммарную РНК выделяли из клеток с использованием реагента TRIzol в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific) в трех повторах. Качество полученной РНК проверяли с помощью BioAnalyser и RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США). ПолиА-РНК очищали используя набор для очистки мРНК Dynabeads® (Ambion, Inc., Остин, Техас, США). Набора для подготовки библиотеки РНК NEBNext® Ultra™ II для Illumina® (NEB) в соответствии с руководством использовали для получения библиотек Illumina из полиА РНК. Секвенирование проводили на HiSeq1500 длина прочтений составила 50 п.н. (BioProject ID PRJNA386575). Для каждого образца получили не менее 10 миллионов прочтений. Прочтения РНК отфильтровывали по качеству ( $phred > 20$ ), а адаптеры библиотек обрезали с использованием программного обеспечения Cutadapt (версия 1.12) [256]. Далее работа выполнялась сотрудниками лаборатории Геномики и Эпигеномики Позвоночных ФИЦ Биотехнологии РАН. Прочтения были картированы на геном человека (GRCh37 / hg19) с помощью STAR [257]. Экзонные фрагменты были взяты из базы данных RefSeq. Для каждого гена посчитали покрытие с помощью программы Bedtools (версия 2.26.0). Экспрессию генов количественно определяли с помощью HTSEQ v0.11.1 [258]. Анализ дифференциальной экспрессии был выполнен с применением нормализации чисел прочтений по умолчанию (`estimateSizeFactors`) и выполнения отрицательных биномиальных тестов для каждого гена (`nbinomTest`), реализованных в пакете DESeq R (версия 1.22.0), с параметрами по умолчанию 15. Анализ функциональных категорий был проведен с использованием биоинформатической программы DAVID, с предварительно ранжированными генами в соответствии с их кратностью изменения [25].

Все необработанные данные по севкенированию РНК и WGBS были отправлены в архив чтений последовательностей под номером доступа PRJNA734133.

#### **4.18 Иммуноблоттинг**

К лизатам клеток добавляли буфер для нанесения на гель (денатурирующий полиакриламидный гель: 50 мМ трис-НСl, рН 6.8, 100 мМ β-меркаптоэтанол, 1% SDS, 0.01% бромфенолового синего и 10% глицерина), прогревали 5 мин при 95°C и наносили на денатурирующий SDS- ПААГ (6%, 8% или 12% в зависимости от размера белка). Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, для этого использовали камеру для переноса («GE Healthcare», Швеция). Мембрану блокировали в 5% растворе сухого обезжиренного молока («Bethyl laboratories», США) растворенного в TBS-T буфере (10мМ Трис-НСl, рН-7.4, 150мМ NaCl, 0.1% Tween-20) с постоянным покачиванием при комнатной температуре в течение 1 часа. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами в разведении согласно рекомендации производителя в 5% растворе сухого обезжиренного молока в TBS-T буфере при +4°C 12 ч («Bethyl laboratories», США). После промывали 3 раза TBS-T буфером, мембрану инкубировали со вторичными антителами в разведении 1:10000 («Sigma», США) при комнатной температуре в течение 1 часа. Результат детектировали, используя хемилюминесцентную систему ECL+ («Amersham», США). Далее экспонировали на рентгеновскую пленку Kodak- BioMAX или сканировали мембраны на приборе Fusion Solo.6X PRO F0.70 (Vilber, Южная Корея).

#### **4.19 Получение компетентных клеток**

Клетки TOP10 высаживали на чашку со стрептомицином. Затем с чашки несколько колоний высаживали в 2 мл LB со стрептомицином на +37°C на ночь с постоянным покачиванием. Затем 1 мл ночной культуры переносили в 100 мл LB со стрептомицином и растили при +37°C до OD<sub>600</sub>=0.4-0.5. Культуру переносили в охлажденные пробирки и центрифугировали 10 минут на +4°C и 4000 об/мин. Осадок растворяли в 40 мл буфера (100 мМ CaCl<sub>2</sub>), инкубировали на льду 20-30 минут. Затем центрифугировали 10 минут при 4000 об/мин. Эту процедуру повторяли ещё раз. Осадок растворяли в 2 мл 100мМ CaCl<sub>2</sub>, добавляли глицерин до 10%, аликвотировали по 100 мкл в охлажденные пробирки и замораживали в жидком азоте. Хранили при температуре -70°C.

## 4.20 Трансформация

Компетентные клетки (100 мкл) размораживали на льду. Добавляли к клеткам от 10 до 50 нг ДНК в объеме не более 10 мкл (лигирующая смесь). Инкубировали во льду 15-20 минут. Клетки помещали на 1,5 минуты на +42°C. Затем быстро переносили в лед на 2-5 минут. Добавляли 1 мл питательной среды, предварительно подогретой до комнатной темпера, перемешивали. Культивировали 1 час на +37°C в термостате. После центрифугировали на микроцентрифуге при 3000об/мин 2-5 минут. Удаляли супернатант и в малом объеме ресуспендировали и высевали на селективную среду.

## 4.21 Антитела

В работе были использованы следующие антитела: anti-Kaiso поликлональные кроличьи антитела (ab) (предоставленные доктором А. Рейнольдсом), anti-SUMO1 (sc5308, Санта-Крус, sc-32058 Abcam, США), anti-НА (A190-108A, Bethyl), anti-НА (H6908, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, США), anti-НА agarose (A2095, Sigma-Aldrich, США), anti-НЗК4me3 (ab1012, Abcam, США), anti-НЗК27ac (ab4729, Abcam, США), anti-НЗК9me3 (ab8898 Abcam, США), anti-actin (ab8227, Abcam, Cambridge, Великобритания), anti-Kaiso 6F (ab12723, Sigma-Aldrich, США), anti-myc (ab9106, Abcam, США), anti-myc mouse (предоставленные доктором И. Деевым), anti-KLF4 (ab215036, Abcam, США), anti-TRIM25 (ab86365, Abcam, США).

## 4.22 Получение клеточных лизатов

Трансфицированные эукариотические клетки линии HEK293, Saki-1 промывали 1×PBS буфером и лизировали в RIPA буфере (50мМ Трис pH 7,4, 0,5% NP-40, 20mM NEM (N-ethylmaleimide, 10% SDS, 150мМ NaCl, ингибитор протеаз (Roche, Швейцария)). Инкубировали 10 минут на льду. Центрифугировали 10 минут на максимальных оборотах. Отбирали супернатант, хранили при -70°C. Лизаты использовали в дальнейшем для иммунопреципитации и ко-преципитации.

## 4.23 Иммунопреципитация

Иммунопреципитация была проведена с использованием мышиных антител против Kaiso (предоставленные доктором А. Рейнольдсом), против myc (предоставленных доктором И. Деевым), контрольных IgG (ab6708; Abcam, США) и НА-агарозы (Sigma, США). Использовали лизаты клеток HEK293 или трансфицированных клеток. Клетки

HEK293 высевали в 6-луночный планшет и трансфицировали реагентом Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Через 2 дня клетки промывали 1×PBS и лизировали в 300 мкл холодного буфера RIPA с ингибитором протеазы (Roche, Швейцария) и 10 мМ NEM в течение 10 мин на льду. Лизаты центрифугировали при 16000 об/мин и +4°C в течение 10 мин. Супернатанты хранили при -70°C. К супернатантам добавляли 1 мкг антител против Kaiso, HA, мус или контрольного IgG и инкубировали при 4 °С с вращением в течение ночи. После этого добавляли 20 мкл белка G-Sepharose (Amersham, Великобритания) и инкубировали при вращении. Затем трижды промывали промывочным буфером (10 мМ Трис-НСl рН 7,4, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 150 мМ NaCl, 1% Тритон x100) и добавляли к смеси супернатанта и антител. Белки элюировали, добавляя 60 мкл буфера SDS для электрофореза и нагревая затем до 95°C в течение 5 минут. Супернатант использовали для электрофореза с последующим вестерн-блоттингом.

#### **4.24 Экспрессия рекомбинантных белков**

Конструкции pGEX2T-GST, pGEX2T-DNMT3A, pGEX2T-DNMT3B1 перетрансформировали в компетентные клетки E.coli BL высаживали в 2 мл LB с ампициллином на ночь +37°C с постоянным покачиванием. Затем полученную ночную культуру разводили 1:100 (1 мл ночной культуры + 100 мл среды LB + 1:1000 ампициллин) и инкубировали с постоянным перемешиванием при +37°C 2 часа. Отбирали аликвоту для контроля. При достижении необходимой плотности добавляли к культуре IPTG (изопропил-тио-β-галактозид, «Хеликон» Россия) в конечной концентрации 0,1 мМ. Продолжали инкубировать с постоянным перемешиванием при +37°C до OD=0.6. Культуру центрифугировали 10 минут при 4200 об/мин +4°C. Затем удаляли супернатант. Осадок хранили на -70°C.

Осадок ресуспендировали в 1×PBS + 2мМ PMSF (фенилметансульфонил флюорид-ингибитор сериновых протеаз). Обработывали ресуспендированные клетки ультразвуком. Затем добавляли 20% Triton X-100 до конечной концентрации 1%. Медленно перемешивали 30 минут. Центрифугировали при 10000 об/мин при +4°C. Отбирали супернатант в чистую пробирку. Добавляли смолу в соответствии с таблицей (Таблица 4), предварительно отмыв ее 1×PBS с PMSF в соотношении 1:5. Откручивали на min оборотах 5 минут.

**Таблица 4. Соотношение компонентов**

Компонент	Объем
Объем культуры	20 мл
Объем культуры, для обработки ультразвуком	1 мл
Смола Glutation Sepharose 4B	20 мкл
1×PBS (на одну промывку)	100 мкл
Glutation Elution Buffer	10 мкл

К супернатанту добавляли Glutation Sepharose 4B в объеме указанном в таблице (Таблица 4). Медленно перемешивали 30 минут при комнатной температуре. Центрифугировали на 500 об/мин 5 минут. Далее удаляли супернатант, промывали 1×PBS с PMSF в соотношении 1:30. Центрифугировали 5 минут при 500 об/мин. Удаляли промывочный раствор и повторяли еще 2 раза. Хранили на +4°C.

#### **4.25 Ко-преципитационный анализ (GST-pull down анализ)**

Glutation Sepharose 4B, связанную с GST белками, инкубировали с лизатами, трансфицированных клеток HEK293, в течение ночи на +4°C с постоянным перемешиванием. Glutation Sepharose 4B промывали RIPA буфером ((50мМ Трис pH 7,4, 0,5% NP-40, 20mM NEM (N-ethylmaleimide, 10% SDS, 150mM NaCl, ингибитор протеаз (Roche)). К смоле добавляли буфер (125мМ Трис pH 6,8, 4% SDS, 20% глицерин, 10% β-меркаптоэтанол, 0,025% бромфенол). Затем кипятили в термостате на +95°C 5 минут. Далее наносили на ПААГ.

#### **4.26 Выделение суммарной РНК из клеток**

Суммарную РНК из эукариотических клеток выделяли с использованием реагента TRIzol Reagent (Invitrogen, США) из расчёта 1 мл на концентрацию  $5 \times 10^6$  клеток. Инкубировали при комнатной температуре в течении 5 минут и затем добавляли 0.2 мл хлороформа в расчете на 1 мл TRIzol Reagent. Тщательно перемешивали и далее инкубировали в течение 3 минут при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали при 12000 g в течение 15 минут. Отбирали водную фазу и переносили в пробирку; затем добавляли изопропиловый спирт из расчета 0.5 мл на 1 мл TRIzol Reagent, перемешивали и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Раствор центрифугировали в течение 10 минут при 12000 g при температуре +4°C.

Образовавшийся осадок промывали 75% этанолом, сушили при комнатной температуре на воздухе и растворяли в mQ.

#### **4.27 ПЦР в реальном времени (qRT-PCR)**

Тотальную РНК (2 мкг) обрабатывали 2 ед. ДНКазой I (ThermoFisherScientific) и подвергали обратной транскрипции из случайных гексамеров и набора для синтеза кДНК (ThermoFisherScientific, США). qRT-PCR выполняли с использованием зондов TaqMan на приборе CFX96 (BioRad, США). Амплификация транскрипта GAPDH служила контролем РНК для относительного количественного определения. Используемые праймеры: TRIM25 (для: 5'-GCCTGGTGGAGCATAAGACC-3'; rev: 5'-TCTGACTGTACATGACAGTTAGT-3'; зонд: FAM 5'-CCTGGAGGCCACCCTGAGGCAC-3' RTQ1), GAPDH (для: 5'CTAGG; rev: 5'-AGATGGTGGATGGGATTTCCA; зонд: FAM 5'-TCATTGACCTCAACTACATGGTTTACA-3 RTQ1).

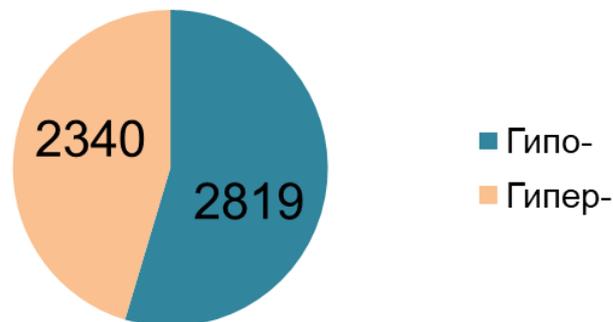
#### **4.28 Статистическая обработка результатов**

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводился с использованием однофакторного анализа Стьюдента и ANOVA (GraphPad).

## 5) РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

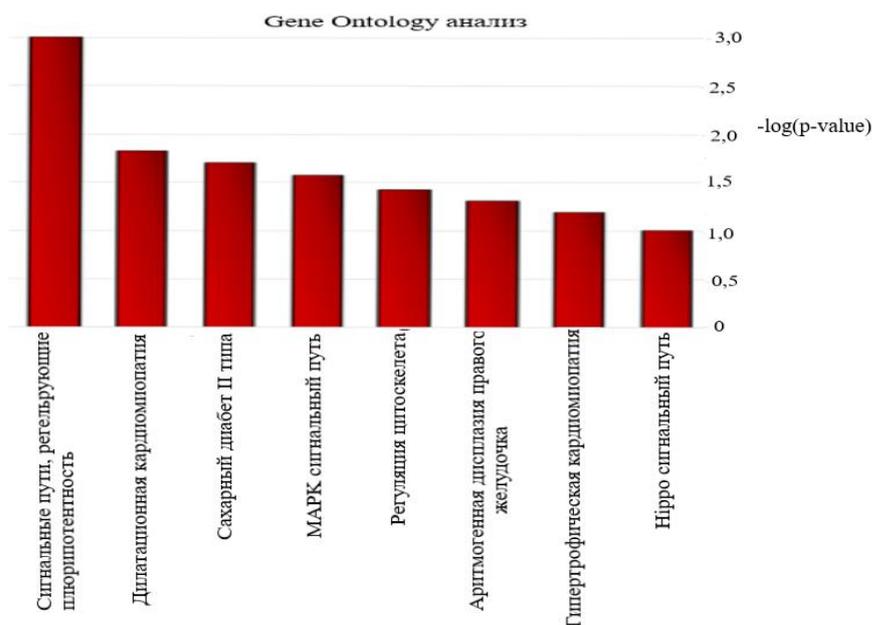
### 5.1 *Kaiso* регулирует метилирование генов плюрипотентности

Для оценки изменения уровня метилирования ДНК при удалении *Kaiso* были получены мышинные эмбриональные фибробласты (МЭФ) из линий C57BL6 (*Kaiso*<sup>+/-</sup>) и C57BL6 (*Kaiso*<sup>-/-</sup>). Анализ метилирования ДНК из этих клеток проводили методом RRBS, который позволяет определить метилирование CG богатых областей, но при этом его применение ограничено в отношении профилирования областей CG “бедных” районов [259]. При анализе данных были найдены дифференциально метилированные CpG-динуклеотиды, которые были объединены в DMR. Затем был проведен анализ генов, в промоторных областях в 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 (Рисунок 12).



**Рисунок 12.** Сравнительный анализ данных RRBS в МЭФ. Количество гипер- и гипометилированных DMR в МЭФ 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 (Рисунок 13).



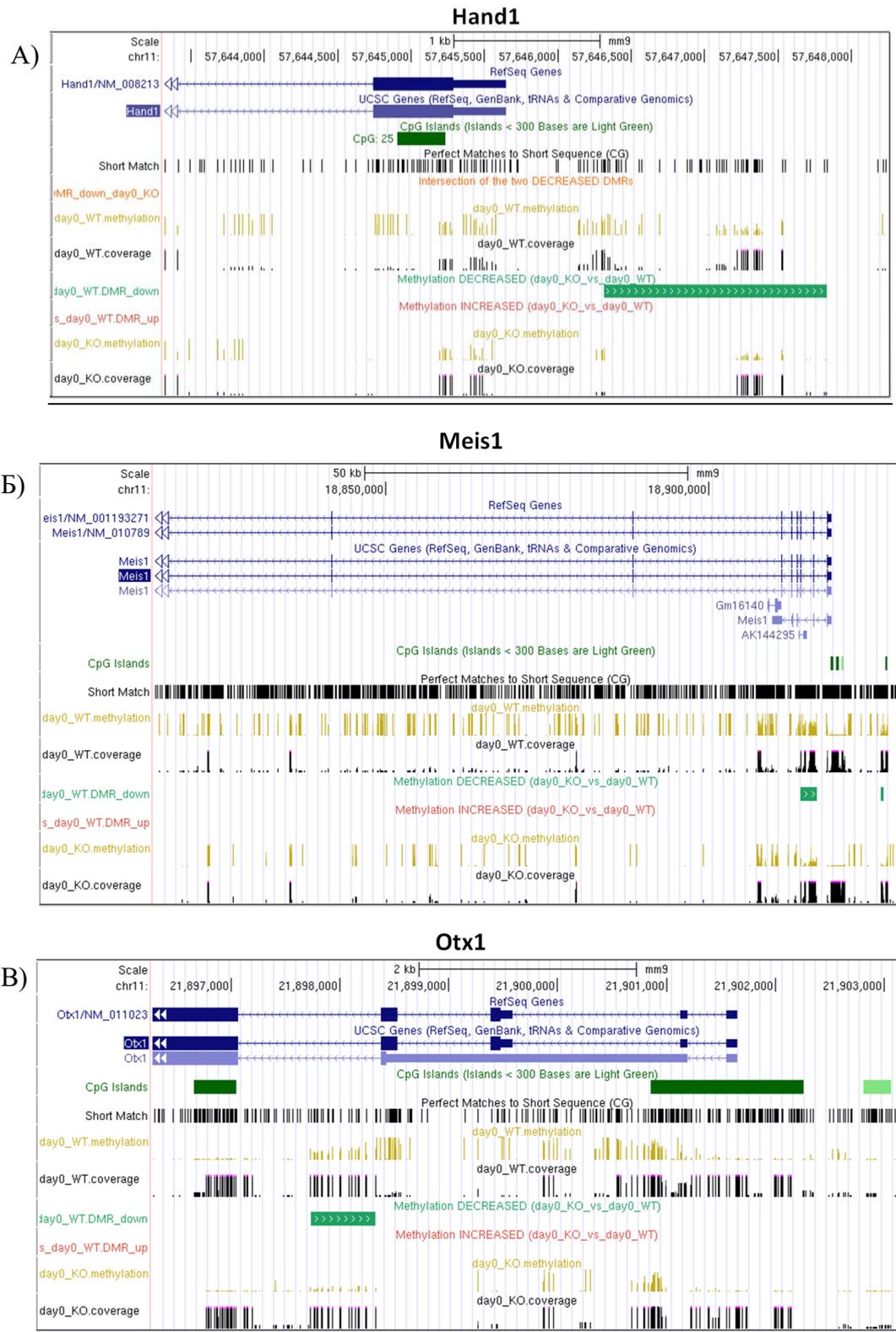
**Рисунок 13.** Анализ функциональных категорий генов, промоторы которых гипометилированы в *Kaiso* КО МЭФ. По оси абсцисс отложен  $-\log(p\text{-value})$  точного теста Фишера (логарифмическая шкала).

Снижение уровня метилирования наблюдалось в промоторных и регуляторных областях 21-ого гена, участвующих в процессе репрограммирования соматических клеток в ИПСК в клетках с нокаутом по гену *Kaiso* (Таблица 5).

**Таблица 5.** Гены, вовлеченные в процесс репрограммирования и снизившие уровень метилирования в промоторах

Название гена		
<i>Jak3</i>	<i>Dlx5</i>	<i>Fgfr4</i>
<i>Pou5f1 (Oct4)</i>	<i>Dusp9</i>	<i>Otx1</i>
<i>Smad3</i>	<i>Esx1</i>	<i>WNT10b</i>
<i>Smad9</i>	<i>Meis1</i>	<i>WNT11</i>
<i>Apc2</i>	<i>Hand1</i>	<i>WNT3</i>
<i>cMyc</i>	<i>Lifr</i>	<i>WNT5a</i>
<i>Axin2</i>	<i>Myf5</i>	<i>Zic3</i>

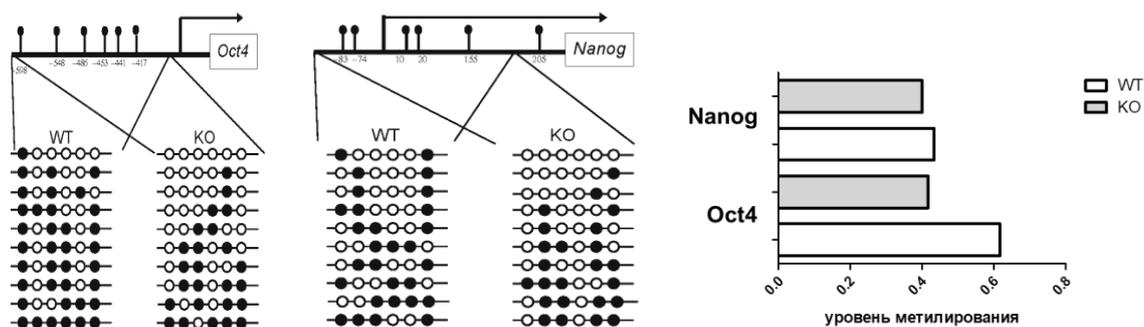
В качестве иллюстрации данных приведено несколько графических изображений данных RRBS анализа (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Данные анализа ограниченного бисульфитного секвенирования. Графическое представление данных анализа промоторной области гена А - *Hand1*. Б - *Meis1*. В - *Otx1*.

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 (Рисунок 15).



**Рисунок 15.** Анализ метилирования промоторных областей генов *Oct4* и *Nanog*. А - Метилирование промоторной области гена *Oct4* снижается в МЭФ нокаутных по гену *Kaiso*. Б - 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.

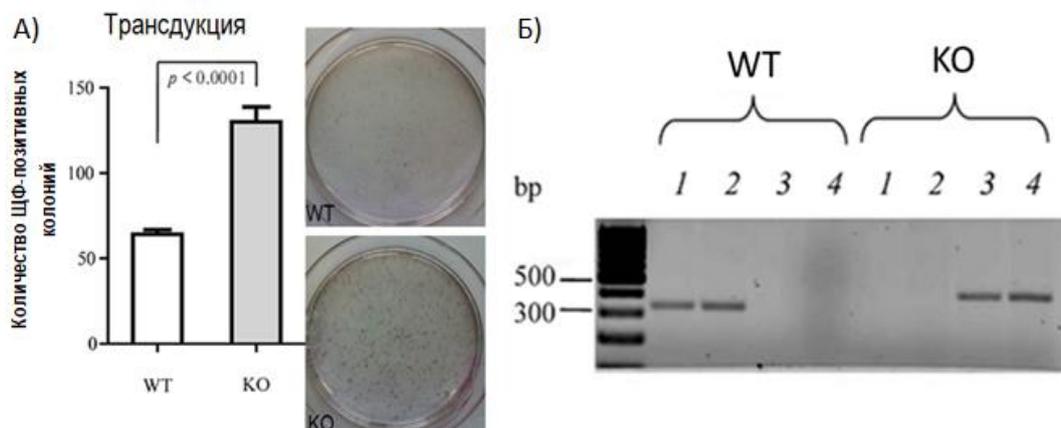
Учитывая, что метилирование ДНК является одним из препятствий, ограничивающим скорость во время репрограммирования клеток [260], было предположено, что эффективность репрограммирования МЭФ в ИПСК будет изменена в клетках нокаутных по гену *Kaiso*, которые исходно имеют модифицированный “ландшафт метилирования” ДНК.

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

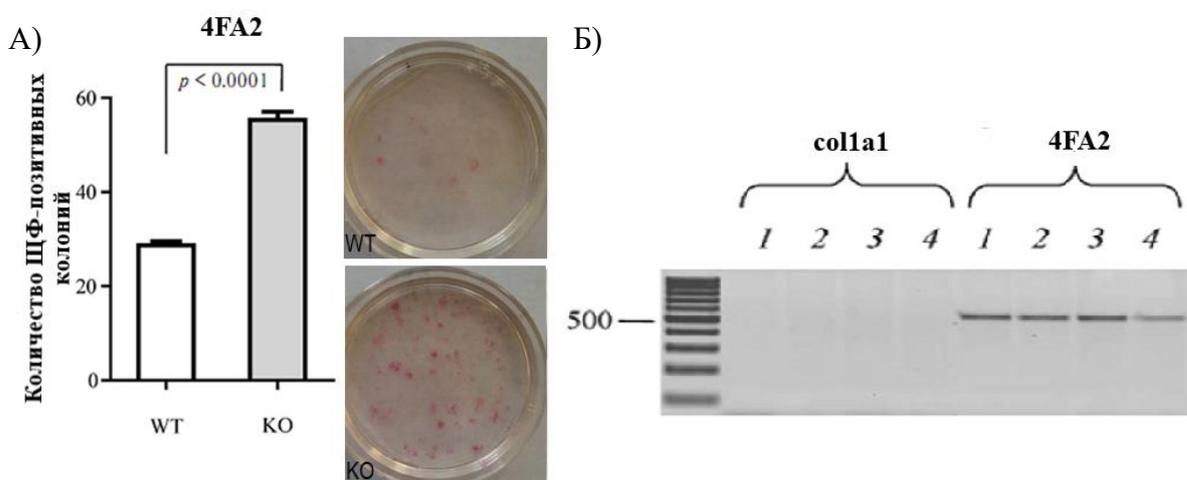
Для визуализации результатов проводили окрашивание репрограммированных клеток на ЩФ на 14-й день после добавления доксицилина. Подсчет показал 2-кратное увеличение числа ЩФ-позитивных колоний в нокаутных по гену *Kaiso* клетках по сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 16). Этот результат был подтвержден на

МЭФ, полученных из трансгенных мышей, несущих доксициклин-индуцируемую кассету (4F2A), кодирующую факторы Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4 и cMyc) (Рисунок 17).

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

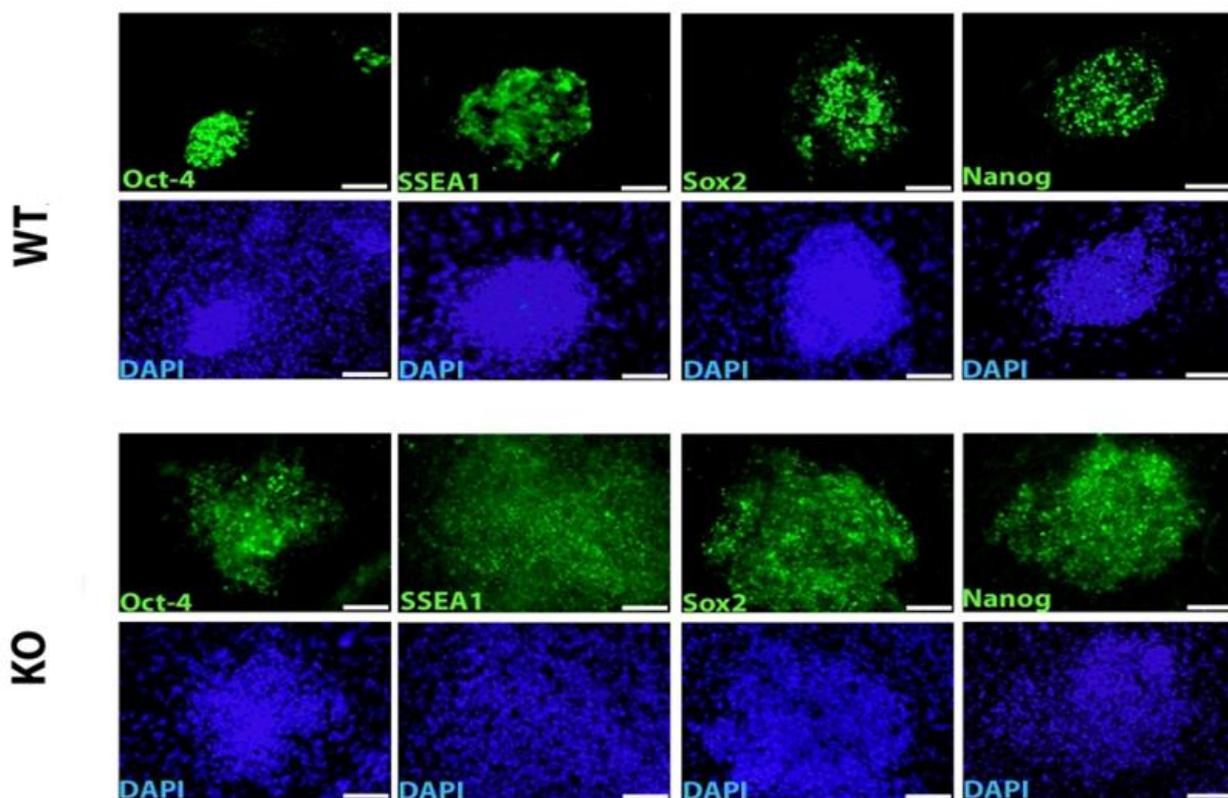


**Рисунок 16. Нокаут по гену *Kaiso* способствует репрограммированию МЭФ в ИПСК.** А - Подсчет колоний ИПСК окрашенных на ЩФ в контроле и нокаутных по гену *Kaiso*. Б - Генотипирование эмбрионов дикого типа и нокаутных по гену *Kaiso* мышей (в 3-х повторях). WT -клетки дикого типа, KO - *Kaiso* нокаутные клетки.



**Рисунок 17. Нокаут по гену *Kaiso* приводит к увеличению эффективности репрограммирования МЭФ, полученных из трансгенных мышей.** А) Колонии ИПСК окрашены на ЩФ в контроле и клетках со встроенной доксициклин-индуцируемую кассету *Kaiso* KO 4F2A на 14-й день репрограммирования. Б) Генотипирование на наличие доксициклин-индуцируемой кассеты у эмбрионов мышей WT и *Kaiso* KO мышей 4F2A; *colla1*, локус со вставленной кассетой 4F2A.

Иммунофлуоресцентное окрашивание на четыре фактора плюрипотентности Oct4, SSEA1, Sox2 и Nanog на 21-й день репрограммирования подтвердило статус плюрипотентности полученных клонов (Рисунок 18).



**Рисунок 18. Окрашивание колоний ИПСК на основные факторы плюрипотентности.** Иммунофлуоресцентное окрашивание на Oct4, Sox2, SSEA1 и Nanog. Ядра окрашены на 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) на 21 день.

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

### 5.1.1 Влияние *Kaiso* на скорость формирования колоний

Далее было определено, как *Kaiso* влияет на скорость образования ИПСК-подобных колоний. На рисунке 19 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 нокаутных по гену *Kaiso* по сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 19). Одна из причин более активного образования колоний ИПСК может заключаться в изменении пролиферативной активности клеток нокаутных по гену *Kaiso*.

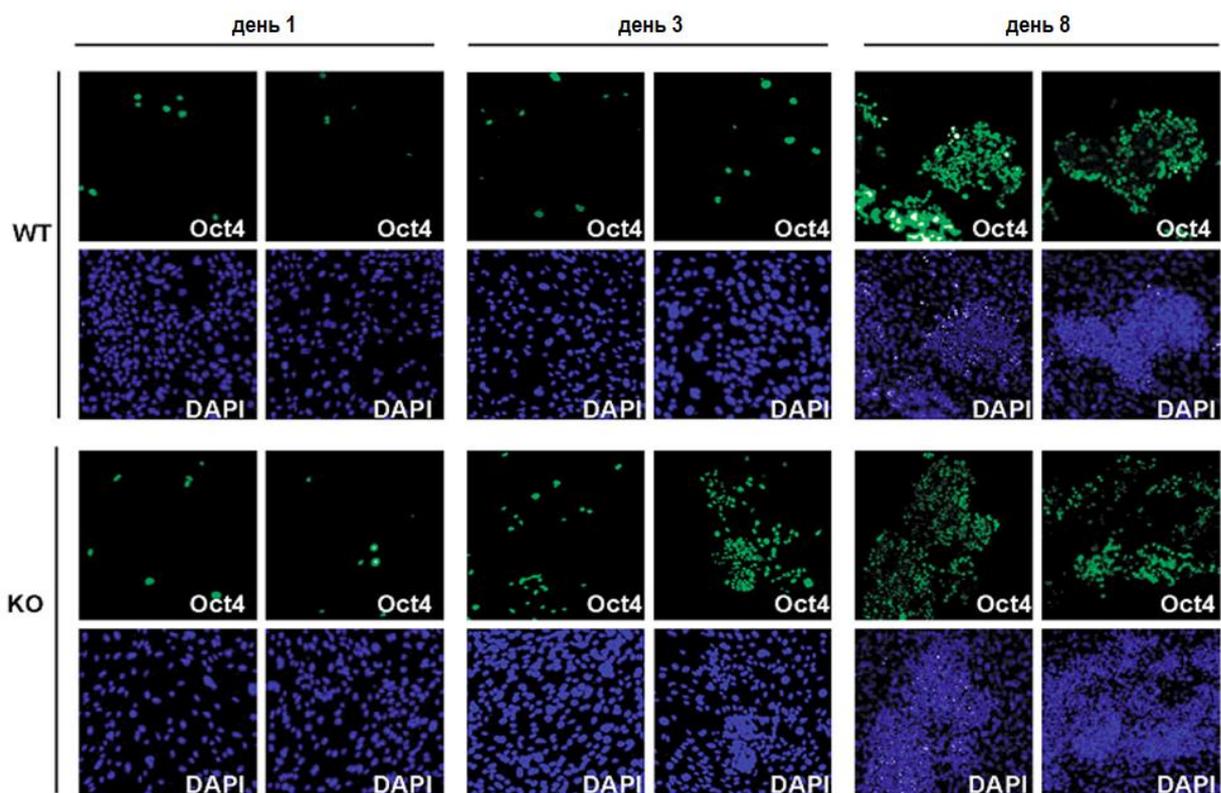


Рисунок 19. Иммунофлуоресцентное окрашивание нокаутных по гену *Kaiso* дикого типа клеток на Oct4. Окрашивание на Oct4 1-й, 3-й и 8-й дни репрограммирования. Ядра окрашены на DAPI.

Для определения пролиферативной активности был проведен колориметрический тест (МТТ) 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 (Рисунок 20).

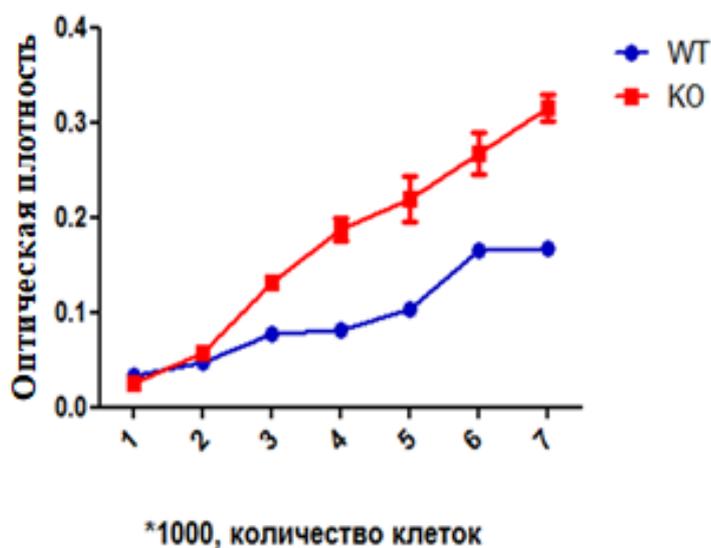


Рисунок 20. МТТ-анализ пролиферативной активности МЭФ дикого типа и *Kaiso* нокаутных при различной плотности клеток (в 3-х повторях).

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

## 5.2 Получение и характеристика клеток рака почки человека Saki-1 со сдвигом рамки считывания в гене *Kaiso*

Для подтверждения влияния *Kaiso* на профиль метилирования ДНК была получена модельная клеточная линия со сдвигом рамки считывания в гене *Kaiso* с помощью CRISPR/Cas9 геномного редактирования. Сдвиг рамки приводил к остановке транскрипции в области 42-ого лизина в ВТВ/POZ домене *Kaiso* (Рисунок 21). Было отобрано три клона, в которых *Kaiso* не детектировался методом вестерн блота (Рисунок 21).

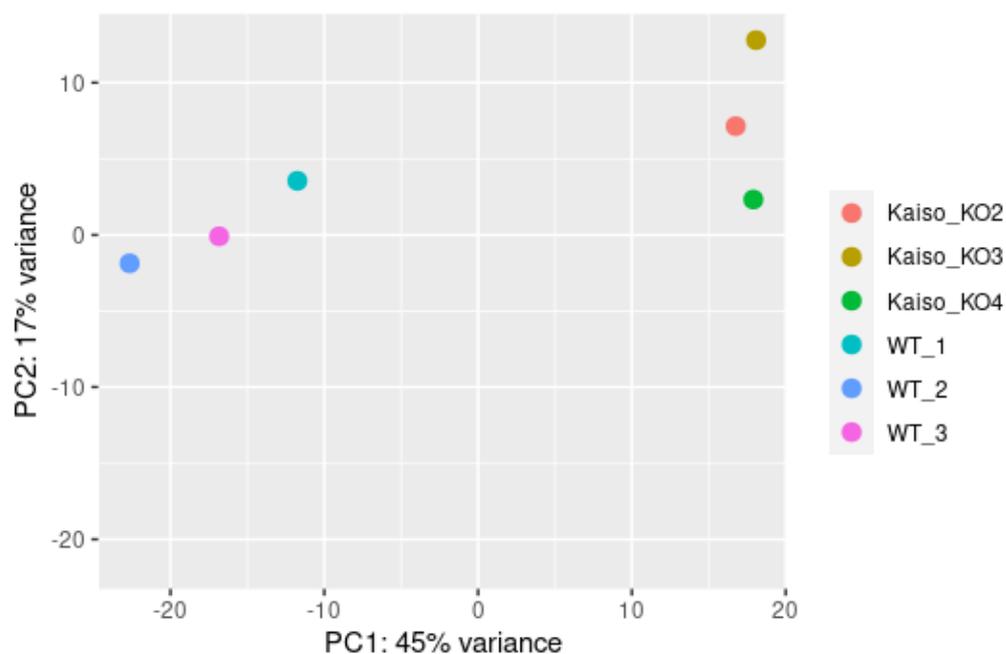


**Рисунок 21.** Редактирование клеточной линии Saki-1. А - Схематическое представление редактирования гена *Kaiso* в клеточной линии Saki-1 с помощью CRISPR/Cas9. Б - Вестерн-блот анализ эффективности редактирования гена *Kaiso* в клеточной линии Saki-1 с помощью CRISPR/Cas9.

Иммунопреципитация с антителами на *Kaiso* подтвердила, что редактирование с помощью CRISPR/Cas9 прошло эффективно (Рисунок 21).

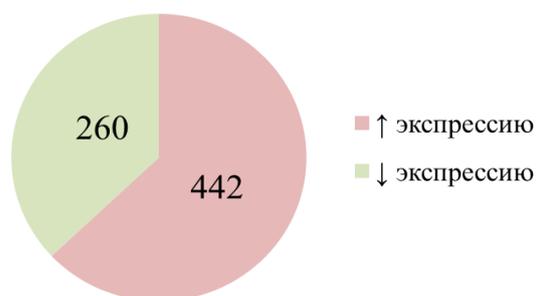
Отобранные клоны были проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру, которое позволило детектировать делеции от 10 до 20 нуклеотидов в области, кодирующей ВТВ домен, приводящие к сдвигу рамки считывания и как результат к измененной аминокислотной последовательности и раннему формированию стоп-кодонов.

Анализ методом главных компонентов, показал, что наблюдается изменение транскриптомы в клетках нокаунных по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом (Рисунок 22). Три полученных клона со сдвигом рамки в гене *Kaiso* кластеризовались вместе.



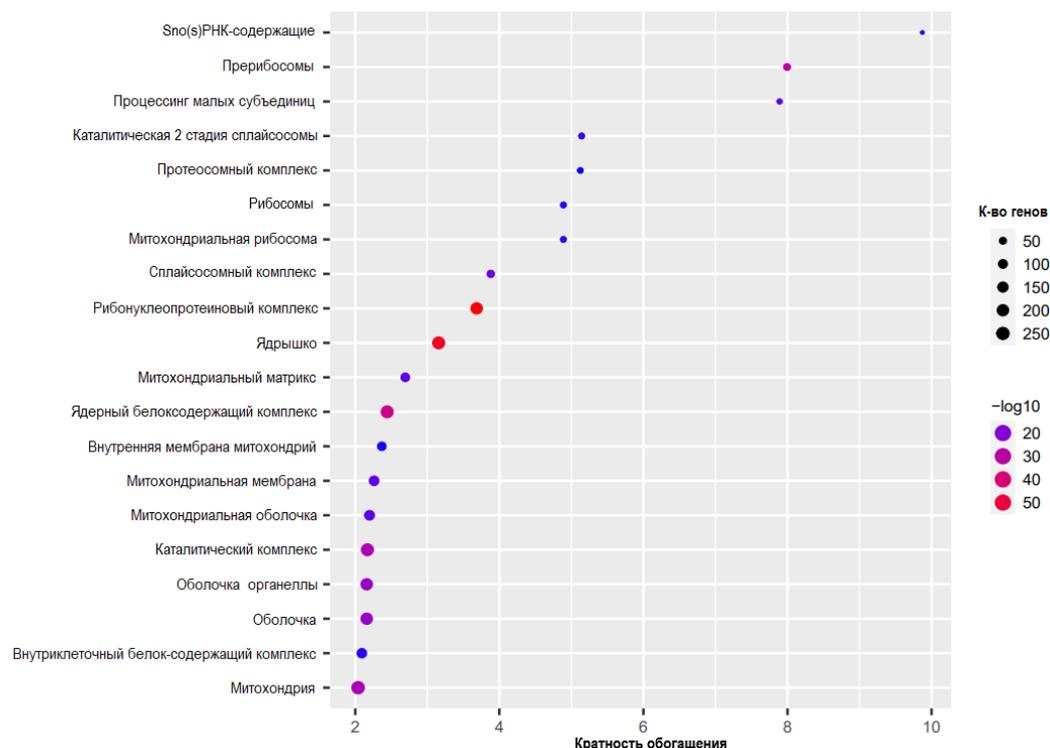
**Рисунок 22.** Анализ транскриптомы методом главных компонент при сдвиге рамки считывания в гене *Kaiso* в клетках Saki-1.

Анализ секвенирования РНК показал, что 442 гена повысили свою экспрессию и 260 снизили ( $p_{adj} < 0,001$ ) в нокаутных клетках по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом (Рисунок 23).



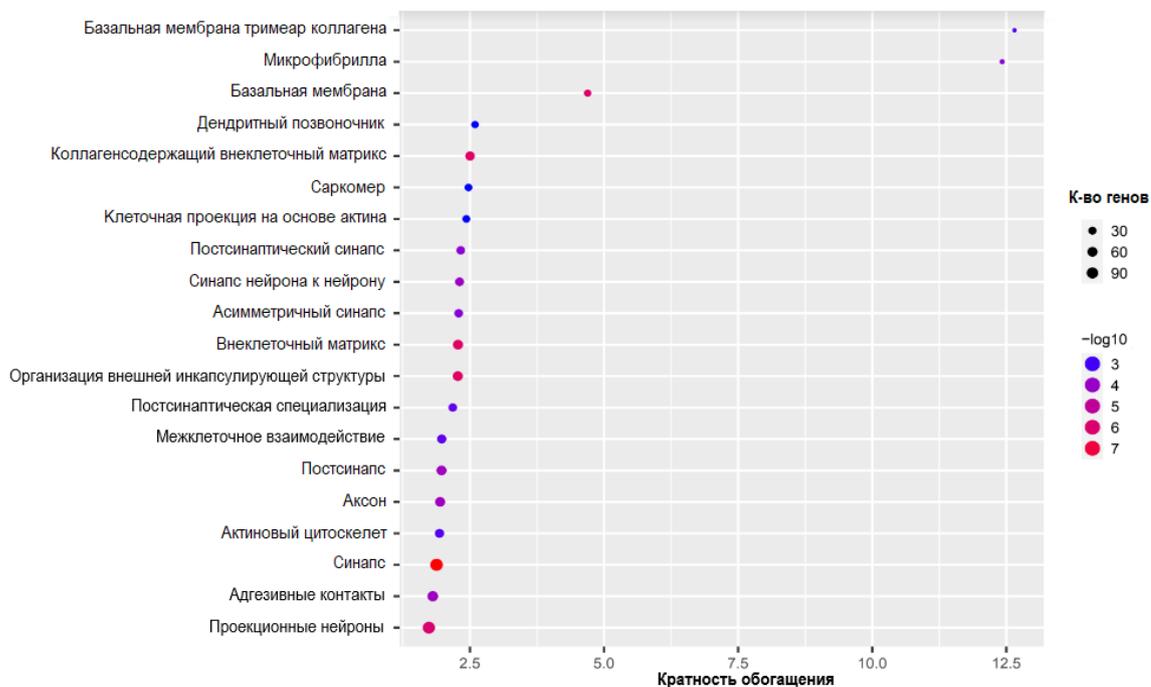
**Рисунок 23.** Количество генов, увеличивающих и уменьшающих свою экспрессию в линии клеток Saki-1 нокаутной по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом.

Анализ функциональных категорий (GO) выявил, что среди генов, увеличивающих свою транскрипцию при удалении *Kaiso*, есть факторы, связанные с процессингом РНК, метаболическими процессами, с формированием протеасом и сплайсосом (Рисунок 24).



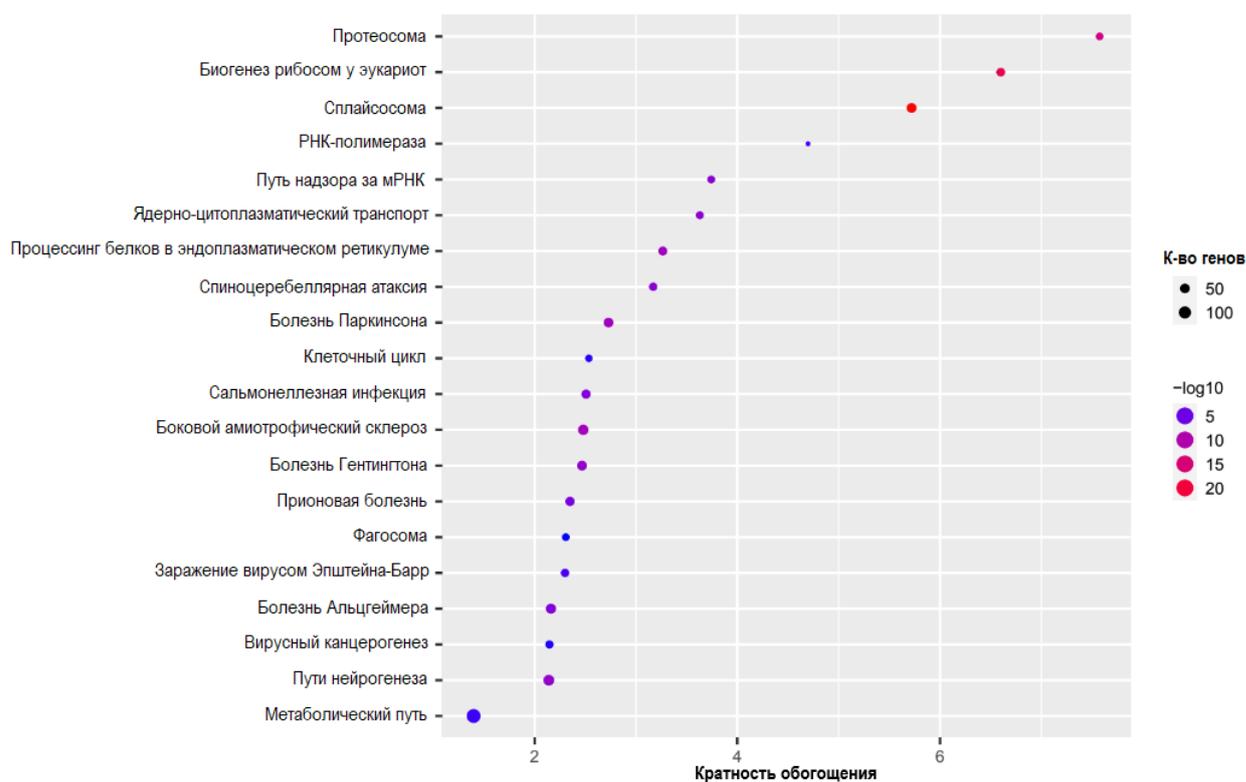
**Рисунок 24.** Анализ функциональных категорий генов увеличивших свою экспрессию в при удалении *Kaiso* в клетках *Saki-1*.

Среди генов, снизивших транскрипцию при удалении *Kaiso*, были найдены факторы вовлеченные в нейрогенез, дифференциацию и развитие клеток, а также в формирование ионных каналов (Рисунок 25).



**Рисунок 25.** Анализ функциональных категорий генов снизивших свою экспрессию в при удалении *Kaiso* в клетках *Saki-1*.

Анализ сигнальных путей в которые вовлечены гены увеличившие свою экспрессию показал изменения в процессах биогенеза РНК, характерных для заболеваний с нарушением функционирования нервной ткани и головного мозга (Рисунок 26).



**Рисунок 26.** Сигнальные пути, которые увеличили свою активность в Kaiso KO клетках.

Анализ сигнальных путей в которые вовлечены гены снизившие свою экспрессию показал изменения в процессах участвующих в изменении транскрипции при раке, сигнального пути p53, взаимодействия с рецептором ECM, MAPK сигнального пути, сплайсосомами и убиквитин-опосредованного взаимодействия (Рисунок 27).

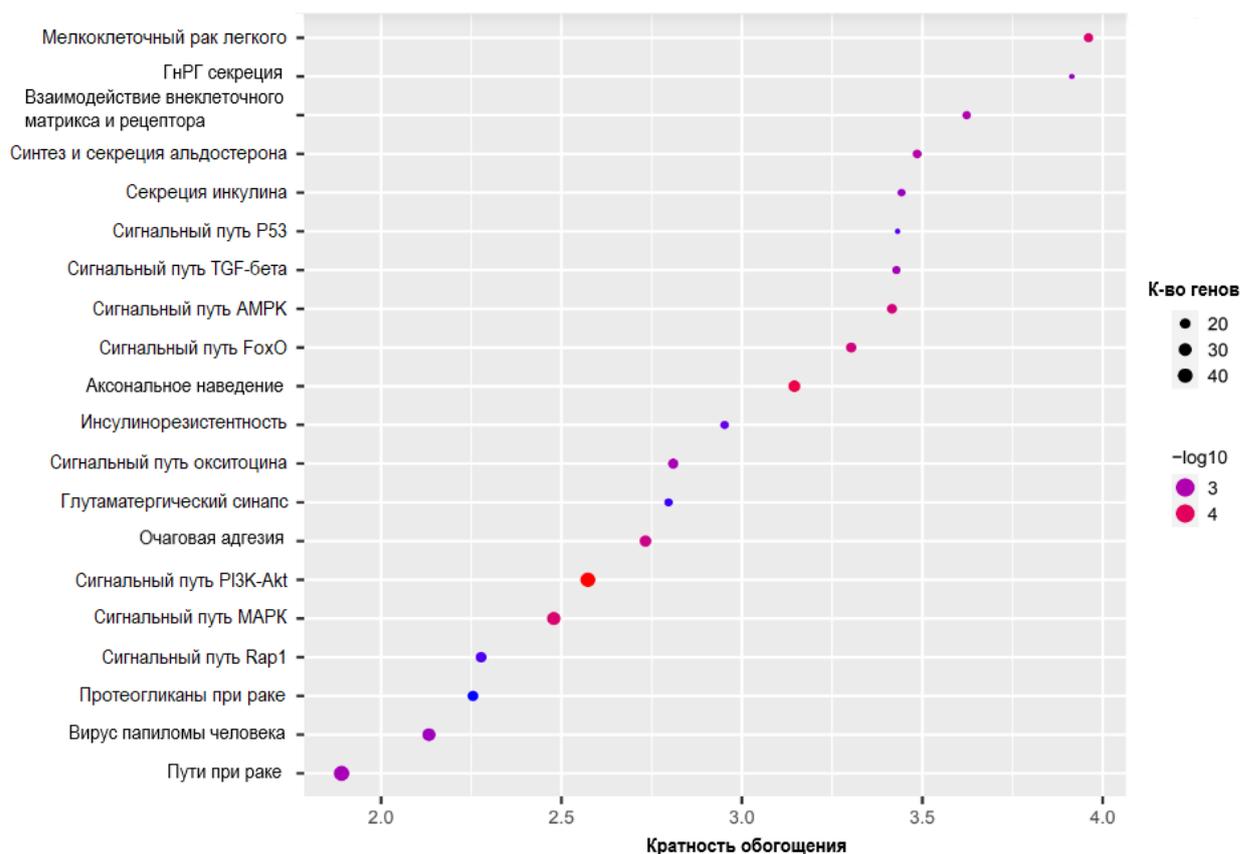


Рисунок 27. Сигнальные пути, которые снизили свою активность в Kaiso KO клетках.

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

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 [261]. При анализе метилирования ДНК в этих клеточных линиях детектировали небольшое статистически значимое увеличение метилирования ДНК по всему геному при удалении гена *Kaiso* (Рисунок 28).

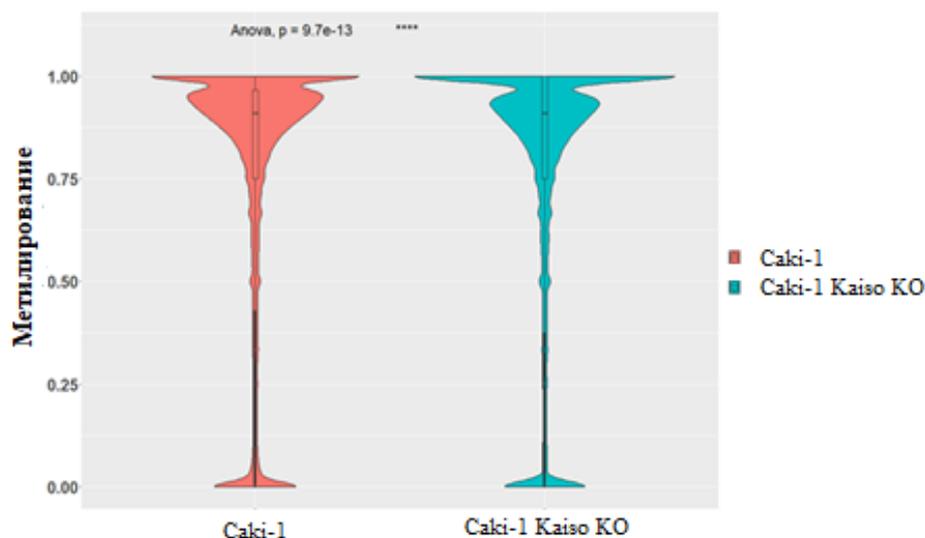


Рисунок 28. Полногеномное метилирование в клетках дикого типа Caki-1 и в клонах нокаутных по гену *Kaiso* Caki-1 (\*\*\*\* p-value =  $9,7 \cdot 10^{-13}$ ).

Далее было определено, связан ли этот эффект с нарушением регуляции ферментов, ответственных за деметилирование или метилирование ДНК. Транскрипция поддерживающей и *de novo* ДНК-метилтрансфераз (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), TET2 и TET3 диоксигеназ оставалась стабильной в нокаутных по гену *Kaiso* клетках, в то время как экспрессия диоксигеназы TET1 снижена в клетках нокаутных по гену *Kaiso* (Рисунок 29).

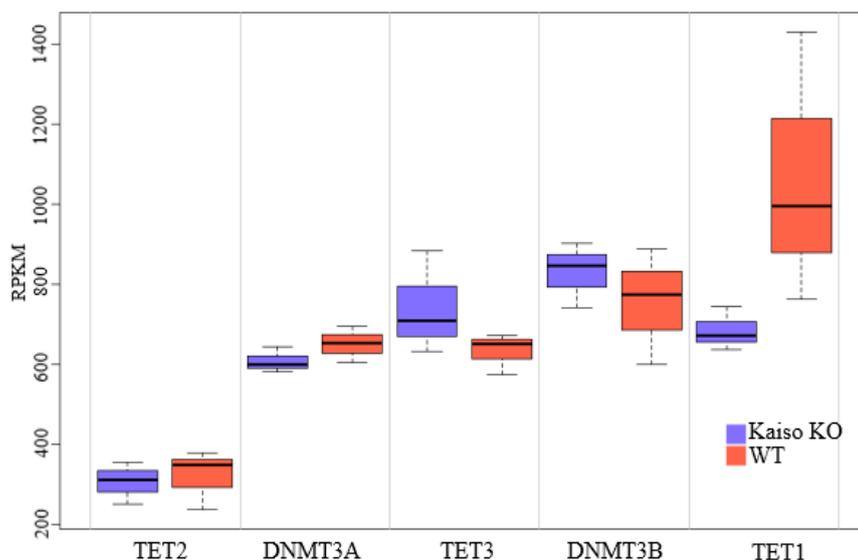
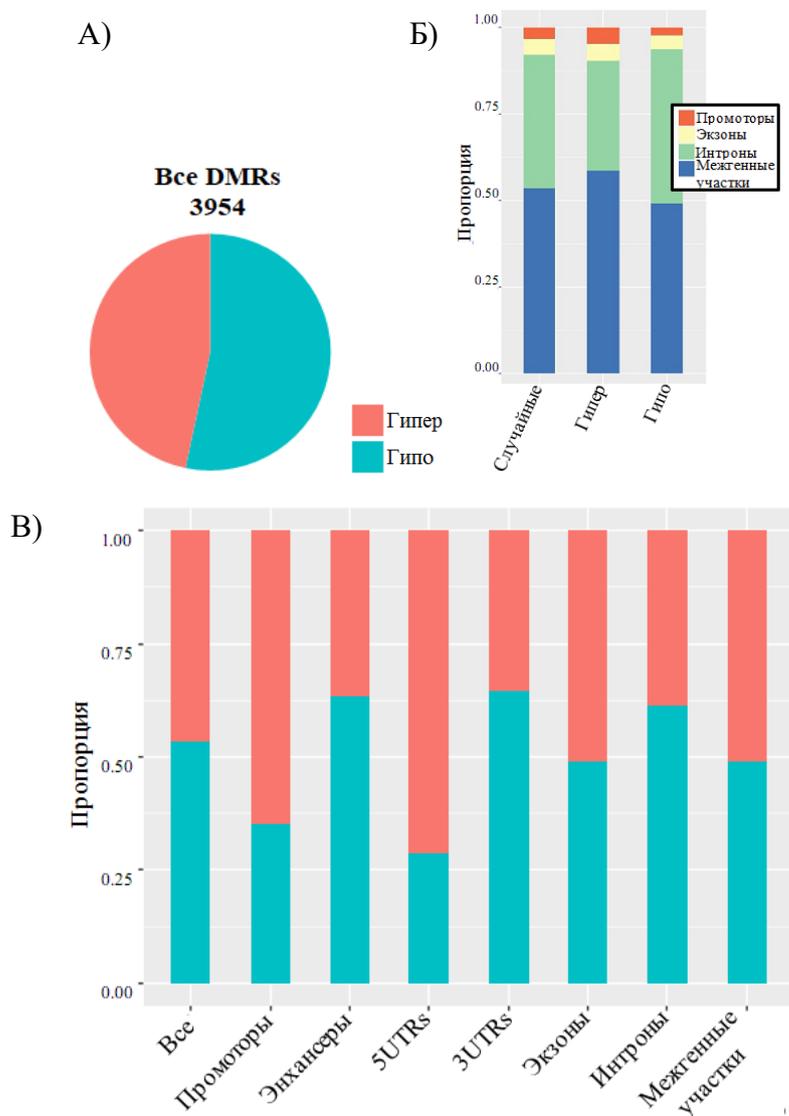


Рисунок 29. Анализ экспрессии генов ответственных за метилирование и деметилирование ДНК. Экспрессия генов диоксигеназ TET1, TET2, TET3 и DNMT1, DNMT3A и DNMT3B ДНК-метилтрансфераз.

Исходя из этих данных, можно предположить, что изменение уровня метилирования определенных участков при нокауте *Kaiso* может происходить за счет снижения экспрессии диоксигеназы TET1.

### 5.2.2 *Kaiso* защищает промоторы и CpG островки от гиперметилирования и энхансеры от гипометилирования.

Анализ метиломы показал, что нокаут по гену *Kaiso* приводит к появлению 3954 дифференциально метилированных участков (DMR): 2107 - гипометилированных и 1847 - гиперметилированных (Рисунок 30).



**Рисунок 30. Анализ метилома.** А - Количество гипер- и гипометилированных DMR в клетках нокаутных по гену *Kaiso* по сравнению с диким типом *Saki-1*. Б, В - Относительные количества гипо – и гиперметилированных DMR, которые перекрываются с различными геномными участками.

DMR были детектированы по всему геному (Рисунок 30). 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. DMR пересекающиеся с CpGIs, чаще имели увеличенное метилирование в нокаутных клетках, по сравнению с DMR, расположенными вблизи CpGIs (Рисунок 31). При этом большинство гиперметилированных CpGIs в *Kaiso* дефицитных клетках расположены в межгенных регионах. 137 DMR пересекается с промоторами, 89 из которых увеличили метилирование в *Kaiso* нокаутных клетках и 48 снизили (Рисунок 31).

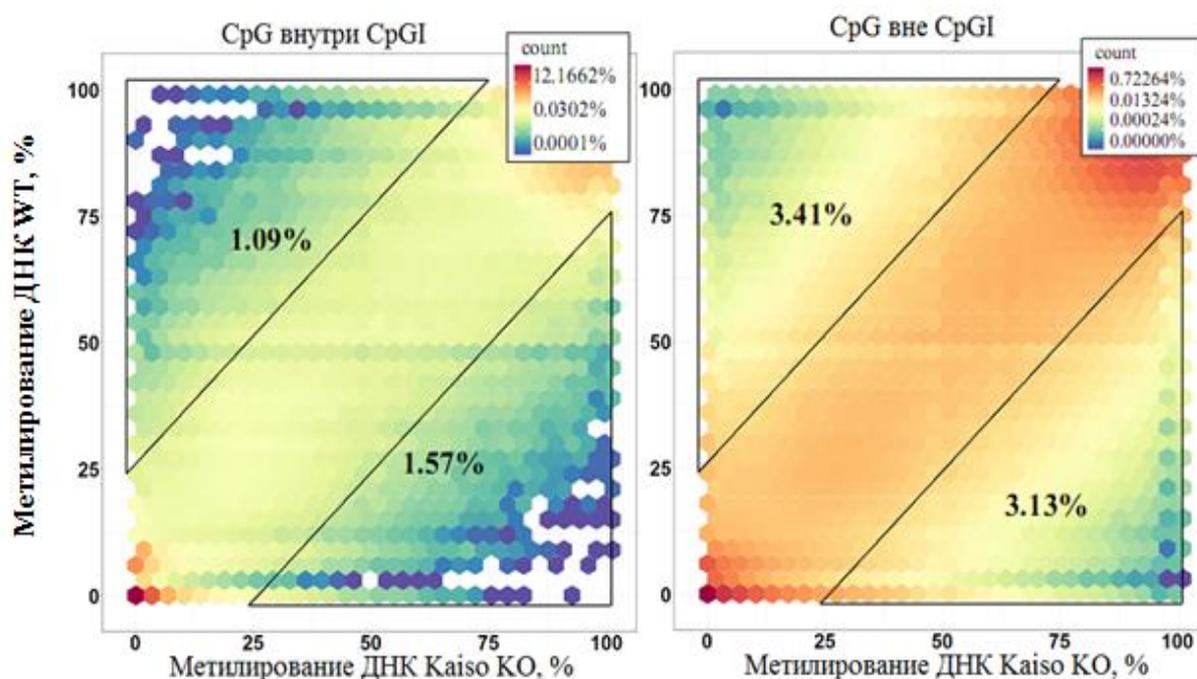


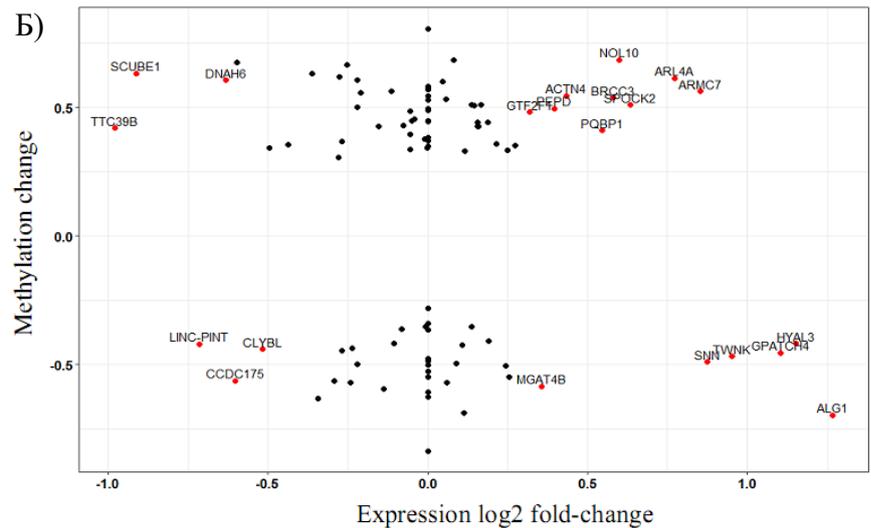
Рисунок 31. Метилирования в DMR, в зависимости от пересечения с CpGI.

Задача данной части работы заключалась в анализе взаимосвязи между изменением метилирования промоторных областей и дифференциальной экспрессией соответствующих генов при удалении *Kaiso*. Установили, что изменения метилирования промоторных областей в нокаутных клетках зачастую не влияет на их транскрипционную активность (Рисунок 32). Во многих случаях гены, в промоторах которых найдено изменение метилирования, не экспрессируется, либо содержат альтернативные промоторы.

А)

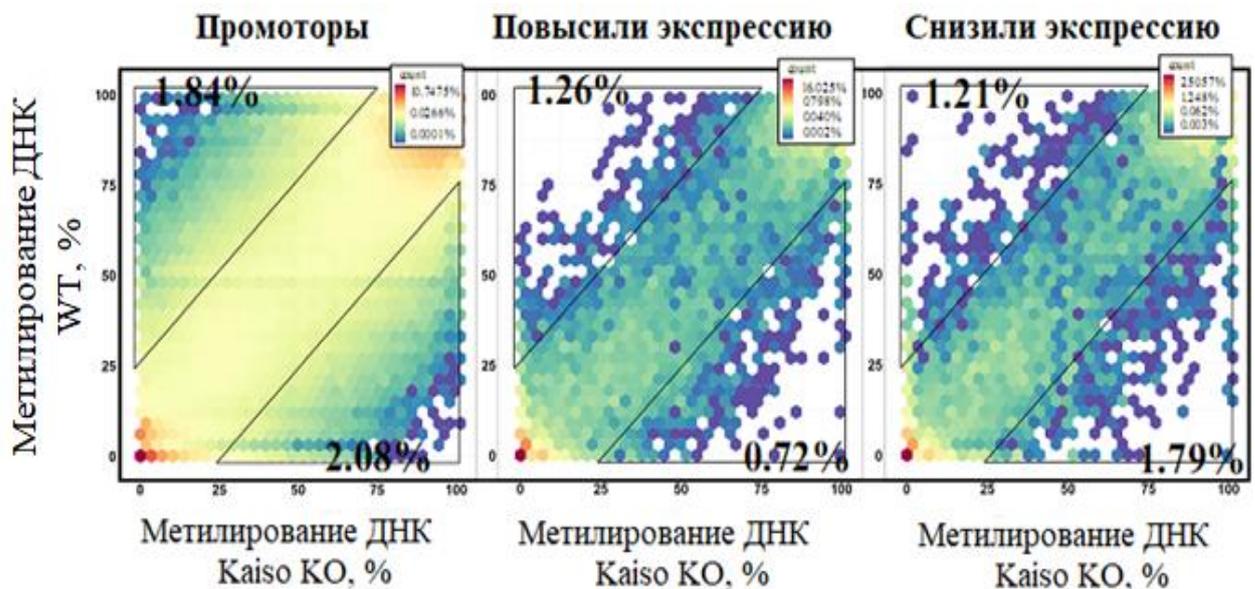


Б)



**Рисунок 32. Анализ взаимосвязи изменения метилирования и транскрипции.** А - Относительное количество гипер- и гипометилированных DMR, которые перекрываются с промоторами. Б - Связь между экспрессией гена и изменениями метилирования DMR в промоторных областях.

Общий уровень метилирования CpG в промоторах имеет тенденцию к увеличению (Рисунок 33). Причем в промоторах генов, увеличивших экспрессию при удалении *Kaiso*, детектировалось больше гипометилированных CpG, чем гиперметилированных.



**Рисунок 33. Оценка общего уровня метилирования CpG в промоторах.** Гексагональный график, показывающий уровень метилирования для CpG: во всех промоторах ( $n = 1\,514\,345$ ), в клетках *Kaiso* KO с повышенной экспрессией ( $n = 505\,656$ ), со сниженной экспрессией в клетках *Kaiso* KO ( $n = 32\,328$ ).

DMR в энхансерах и супер-энхансерах в клетках нокаутных по гену *Kaiso* имеют тенденцию к гипометилированию, независимо от их транскрипционной активности (Рисунок 34, 35).

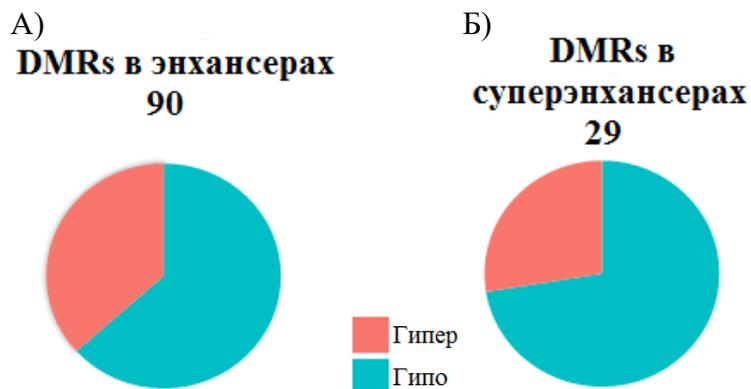


Рисунок 34. Относительное количество гипер- и гипометилированные DMR, которые перекрываются с А - энхансерами и Б - суперэнхансерами.

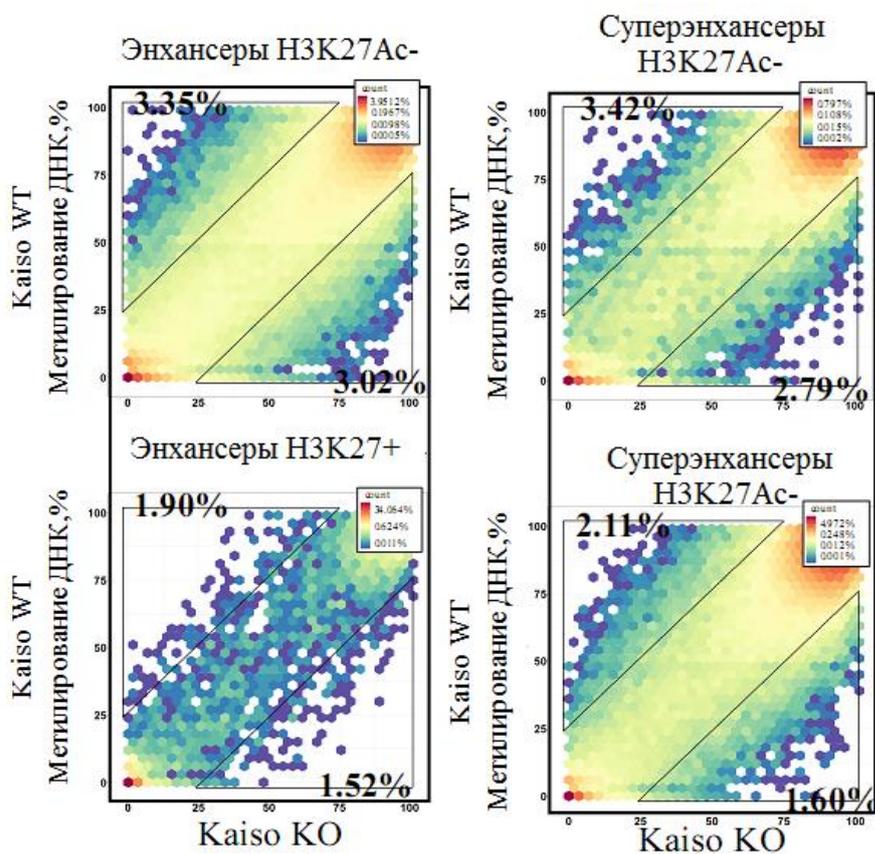
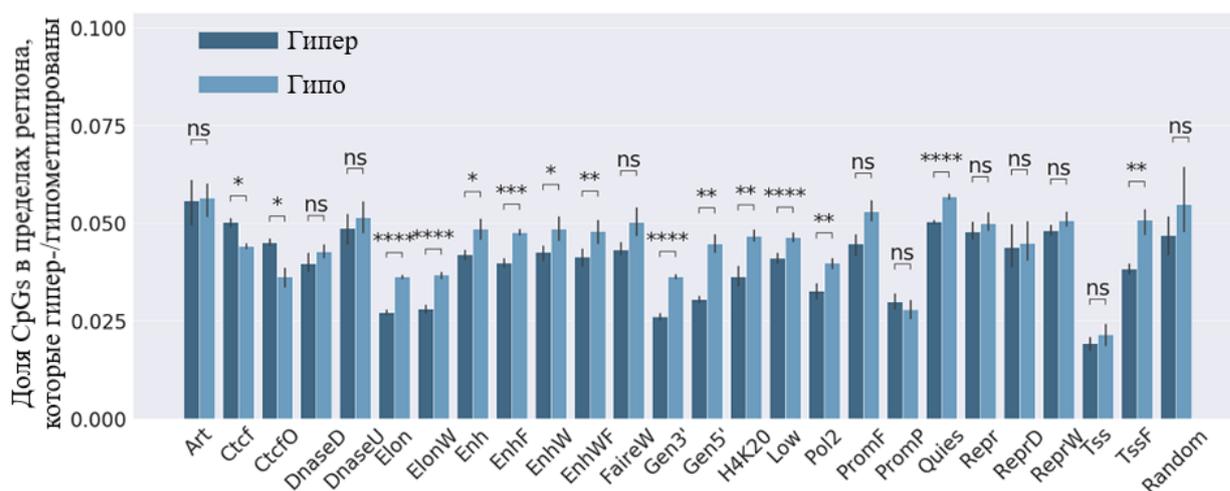


Рисунок 35. Анализ метилирования энхансеров. Гексагональный график, показывающий уровень метилирования для CpG: в энхансерах (n = 254 090) с (n = 10 551) или без гистоновой модификации H3K27ac (n = 243 539).

### 5.2.3 При удалении Kaiso CpG, расположенные в участках связывания факторов Kaiso, Nanog и Oct4, гипометилированы

Далее было проведено исследование, как меняется профиль метилирования ДНК в различных геномных и эпигеномных структурах. Сегментация генома проводилась с помощью ChromHMM [262]. ChromHMM разделил геном в соответствии с данными множественных геномных характеристик на неперекрывающиеся участки, представляющие различные состояния хроматина. Хотя слабое гиперметилирование в нокаутных по гену *Kaiso* клетках наблюдается на уровне всего генома, анализ областей с различными состояниями хроматина показал наличие участков, для которых есть как увеличение, так и снижение метилирования, так и участков с преобладанием гипо- над гиперметилированными областями (Рисунок 36).



**Рисунок 36. Оценка метилирования областей с различным состоянием хроматина.** Распределение гипо- и гиперметилированных CpG в пределах определенных эпигеномных признаков. Область деления генома ChromHMM (\* p-значение <0,05, \*\* p-значение <0,01, \*\*\* p-значение <0,001, \*\*\*\* p-значение <0,0001, ns - не значимо, t Стьюдента - контрольная работа).

Только один тип последовательности чаще был гиперметилирован. Ими оказались участки связывания CTCF. CTCF детектируется обычно на регуляторных последовательностях, включая инсуляторы. Преобладание CpG со сниженным уровнем метилирования было найдено в регионах, участвующих в удлинении транскрипции, теле гена, областях терминации транскрипции (Elon, ElonW, Pol2, H4K20me1), энхансерах и их окружении (Enh, EnhW, TSSF). Интересно, что среди гипометилированных областей в нокаутных по гену *Kaiso* клетках наблюдали области, лишённые гистоновых модификаций с или без транскрипционной активностью (Рисунок 37). Для промоторных

областей было детектировано как CpG гипо-, так и гиперметилированные в *Kaiso* дефицитных 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. Были обнаружены как гипер-, так и гипометилированные участки связывания транскрипционных факторов (Рисунок 37).

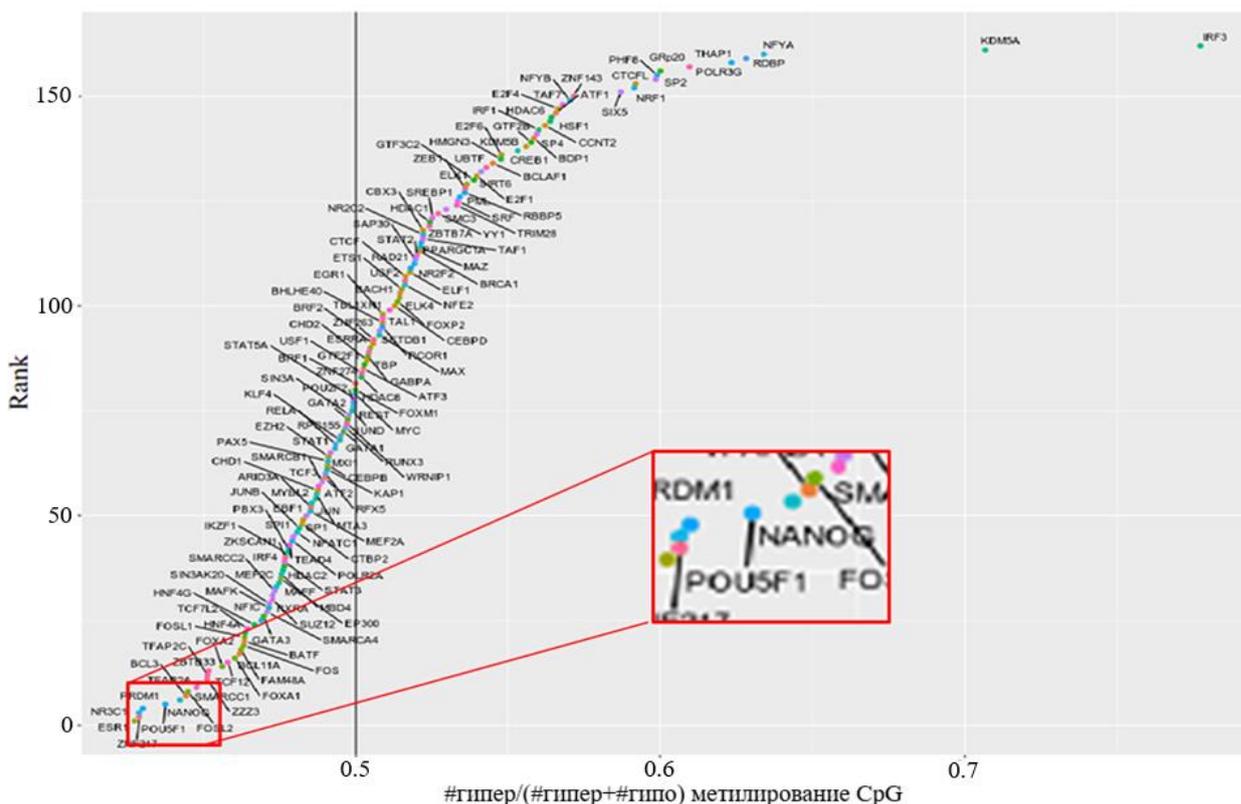


Рисунок 37. Для указанных факторов транскрипции оценили долю гипо- и гиперметилированных сайтов среди всех CpG со значительно измененным метилированием.

Наибольшее увеличение метилирования при удалении *Kaiso* наблюдалось для участков связывания IRF3 и гистондеметиلاзы KDM5a. Метилирование препятствует связыванию IRF3 с ДНК, данных для KDM5a нет [263]. Фактор IRF3 принимает участие в контроле интерферон индуцируемых сигнальных путей, способствует воспалению в жировой ткани и резистентности к инсулину [264]. KDM5a является регулятором экспрессии генов в преадипоцитах. Ранее на мышинной модельной системе 3Т3, было показано, что *Kaiso* является адипогенным репрессором [15]. 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, который также был детектирован в ChromHMM (Рисунок 36, 37).

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 Саки-1 Kaiso важен для метилирования его 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.

Возможно, изменение метилирования участков связывания различных транскрипционных факторов связано не только с изменением экспрессии *Kaiso*, но и с их дифференциальной экспрессией. Был построен график зависимости изменения уровня экспрессии транскрипционных факторов от изменения метилирования их участков связывания (Рисунок 38).

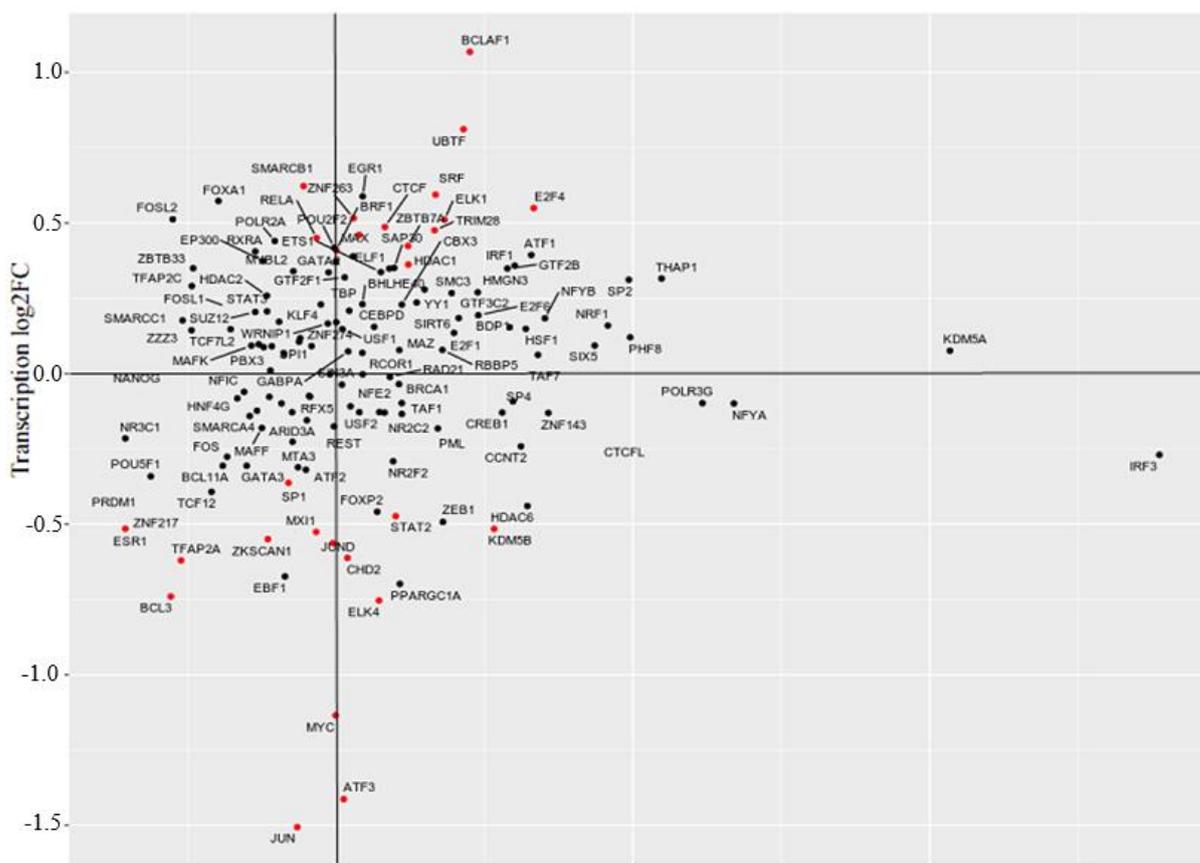


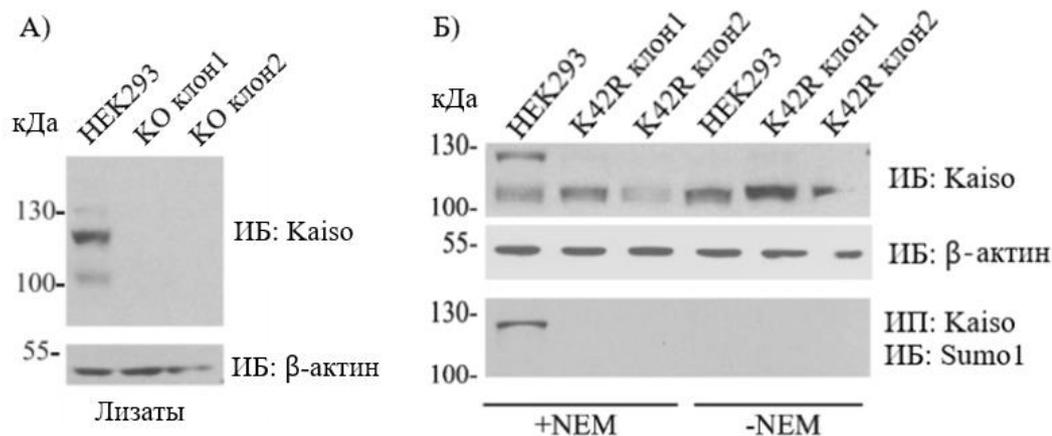
Рисунок 38. Изменение уровня метилирования ДНК в сайтах связывания факторов транскрипции.

Среди транскрипционных факторов, увеличивших транскрипцию в *Kaiso* дефицитных клетках, участки связывания которых были гиперметилованы, наблюдался спектр транскрипционных репрессоров (*HDAC1*, *ZBTB7A*, *MAX*, *E2F4*, *SRF*, *ELK1*, *ZNF263*, *TRIM28*). С другой стороны снижение экспрессии репрессоров *ESR1*, *TFAP2A*, *BCL3* была сопряжена со снижением метилирования их мишеней. Данные репрессивные факторы транскрипции привлекают различные корепрессионные комплексы с ДНК-метилтрансферазами, влияя на профиль метилирования ДНК. Таким образом, наличие изменение профиля метилирования ДНК при удалении *Kaiso* может быть связано с изменением транскрипции вышеуказанных факторов.

### **5.3 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, была получена модельная система клеток HEK293 с помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9, в которой *Kaiso* либо не экспрессировался, либо нарабатывалась мутантная форма K42R *Kaiso*, которая выступает в роли сильного репрессора.

Экспрессию *Kaiso* останавливали с помощью сдвига рамки считывания в области 42 лизина (Рисунок 21). Точечную замену K42R получали с той же гидовой РНК, что и для сдвига рамки. В последовательность донорной одноцепочечной ДНК вводили мутацию, соответствующую замене лизина на аргинин (K42R) и вносили мутацию в РАМ последовательность, 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 приводит к потере более тяжелой, сумоилированной формы белка (Рисунок 39).



**Рисунок 39. 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.

Было отобрано два клонa с измененной подвижностью белка, для которых секвенирование по Сэнгеру подтвердило наличие мутации по 42 лизину. Отсутствие сумоилирования в полученных клонaх 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 (Риснок 39).

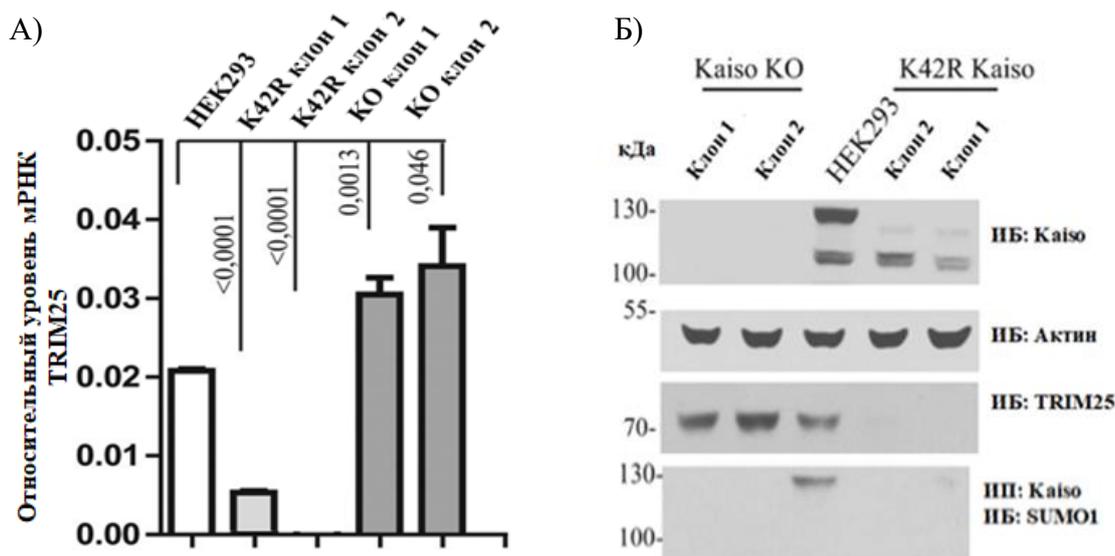
### 5.3.1 Kaiso регулирует экспрессию TRIM25

Задача данной части работы заключалась в нахождении потенциальных генов мишеней Kaiso, экспрессия которых прекращается или значительно снижается в присутствии мутантной формы белка K42R 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. GO анализ генов, снизивших транскрипцию в линии мутантных клеток K42R, идентифицировал факторы, связанные с воспалительным ответом, транспортом ионов и регуляцией артериального давления. GO анализ генов, увеличивших транскрипцию, выявил факторы, связанные с фолдингом белка, процессингом РНК и организацией митохондрий. Среди генов, экспрессия которых перестала детектироваться в линии мутантных клеток K42R, были найдены: *TRIM25*, *FXD5*, *S100A11*, *INA*, некодирующая РНК *LOC10050663* и др. (Таблица 6).

**Таблица 6. Список генов экспрессия, которых перестала детектироваться в линии мутантных клеток K42R.**

1	HEK293	Kaiso KO	foldChange	padj	GeneName	K42R	HEK293	foldChange	padj
2	316,8313	780,4706	2,463363651	2,66E-37	FXYD5	0,337997	261,5117	773,7110274	2,30E-134
3	329,568	469,4767	1,4245215	6,45E-06	TRIM25	3,967584	271,8982	68,52991695	2,48E-123
4	250,3582	630,4905	2,51835336	3,39E-34	S100A11	0,337997	206,8342	611,9414996	1,10E-74
5	103,8847	140,5072	1,352529857	0,023739	SLC16A14	0,988886	85,74251	86,70618017	9,22E-43
6	82,92625	140,3579	1,692562888	5,66E-05	LOC100506639	2,961962	68,46295	23,11405432	2,24E-28
7	49,641	134,1595	2,702594328	5,43E-13	INA	0,986538	40,90912	41,46735464	4,11E-19
8	60,30334	122,9452	2,038778619	4,95E-07	SV2A	4,976216	49,86208	10,02008078	3,02E-16
9	61,24216	91,63924	1,496342574	0,012883	MGARP	6,619001	50,59842	7,644419411	1,82E-14
10	56,40194	112,9724	2,002988436	1,30E-06	GDAP111	6,006279	46,48672	7,739686604	2,34E-13
11	23,38105	47,14927	2,016559101	0,002201	HBQ1	0	19,30513	Inf	7,85E-11
12	54,13683	87,08338	1,608579142	0,004186	GALC	9,915949	44,71204	4,509102899	3,76E-09
13	15,93197	37,90986	2,379483754	0,00094	HIST1H2AE	0	13,17723	Inf	1,61E-07
14	26,7181	48,43097	1,812665254	0,009208	PAX7	1,970066	22,0791	11,20728951	2,14E-07
15	31,96332	73,26152	2,292049338	5,55E-06	BMP2	4,597041	26,36357	5,734899983	1,02E-06
16	24,53923	56,22534	2,291242988	8,16E-05	LOC150935	3,956206	20,2668	5,122787794	4,84E-05
17	28,50193	75,43691	2,646729982	1,71E-07	TSPAN11	5,968112	23,52529	3,941830586	9,33E-05
18	15,3057	34,72401	2,268698027	0,00249	LOC100132356	2,665143	12,62545	4,737249059	0,002688
19	12,35118	52,58405	4,257409263	2,51E-09	BNC1	1,975424	10,21406	5,170564498	0,005951
20	19,66214	36,36451	1,849468845	0,016138	PRPH	4,970858	16,18771	3,256522248	0,006014
21	18,44832	37,05811	2,008752402	0,007639	LHX8	5,311202	15,25335	2,871919637	0,014057
22	22,51038	43,03	1,911562323	0,00567	FAM182B	7,605539	18,54502	2,438356497	0,027704
23	7,855984	17,08421	2,174675453	0,049939	NEBL-AS1	1,01399	6,454345	6,365294761	0,028399
24	8,989151	21,20349	2,35878627	0,016184	SLC2A10	1,659521	7,408955	4,464513683	0,040536
25	12,77682	33,08924	2,589786232	0,000958	LINC01512	3,624229	10,56986	2,916444811	0,04852

TRIM25 вовлечен в пролиферацию многих типов раковых клеток [260]. Этот фактор является E3-убиквитин лигазой, которая участвует в различных клеточных процессах, включая регуляцию врожденного иммунного ответа против вирусов [265].



**Рисунок 40. Kaiso регулирует экспрессию TRIM25.** А - Анализ qPCR-RT экспрессии TRIM 25 в HEK293 клонях K42R и нокаутных по Kaiso с помощью Taqman пробы. Б - Вестерн-блот анализ изменение количества белка TRIM25 в полученных клеточных линиях.

Снижение экспрессии *TRIM25* в обоих клонах K42R было подтверждено с помощью ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализом (Рисунок 40).

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* (Рисунок 40).

Удаление *Kaiso* привело к усилению экспрессии *TRIM25* по сравнению с экспрессией в клеточной линии дикого типа HEK293 (Рисунок 40).

### 5.3.2 Взаимодействие *Kaiso* с промотором *TRIM25*

Важно было понять влияет ли *Kaiso* напрямую или же 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. В нокаутных клетках сигнал не детектировался (Рисунок 41).

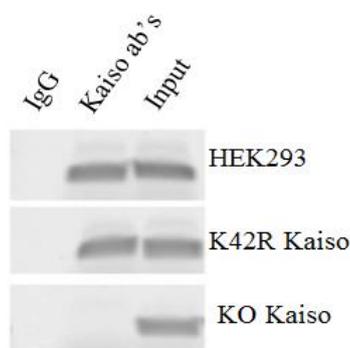
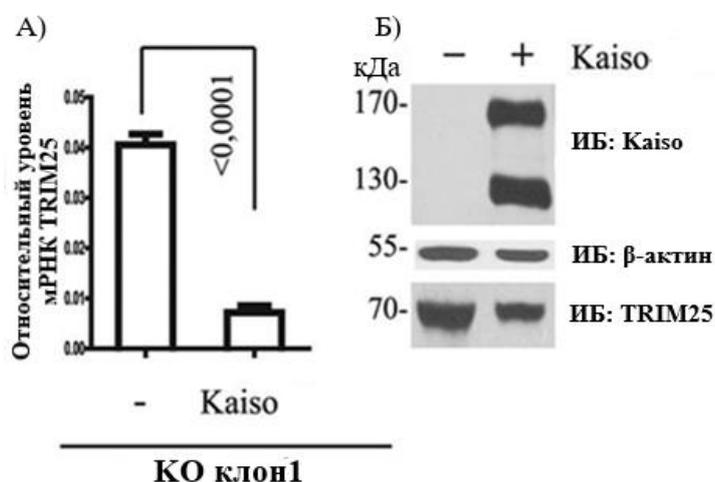


Рисунок 41. Десумоилированная форма и дикий тип белка *Kaiso* взаимодействуют с промоторной областью *TRIM25* в клеточной линии HEK293.

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*.

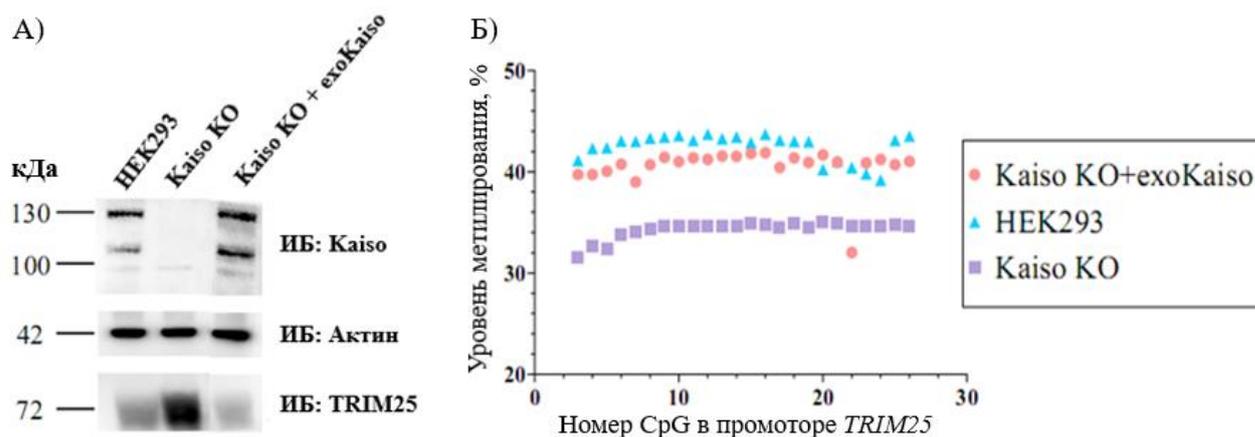
### 5.3.3 Обратимый эффект воздействия Kaiso на регуляцию промотора гена *TRIM25*

Далее было исследовано, будет ли изменение транскрипции, наблюдаемое при удалении *Kaiso* или экспрессии его мутантной формы обратимым. Для этого 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 (Рисунок 42). То есть транскрипция *TRIM25* обратно коррелирует с транскрипцией *Kaiso* в клетках HEK293 (Рисунок 42).



**Рисунок 42.** Влияние восстановления уровня *Kaiso* на экспрессию *TRIM25*. А - Экзогенное восстановление экспрессии Kaiso-GFP. 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 (Рисунок 43). Восстановление экспрессии *Kaiso* привело к снижению количества *TRIM25*, аналогично экспрессии Kaiso-GFP и восстановлению уровня метилирования (Рисунок 43).

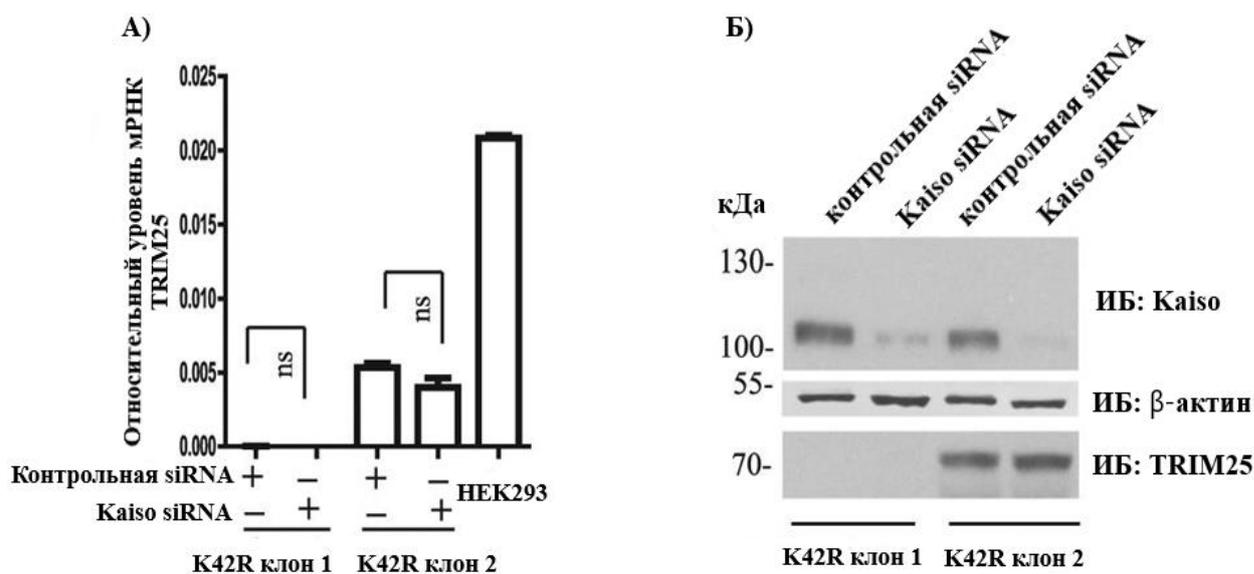


**Рисунок 43. Kaiso регулирует метилирование промотора *TRIM25*.** А - Вестерн-блот-анализ клеточных лизатов из клеток HEK293, Kaiso KO и мутантных клеток K42R на экспрессию *TRIM25*. Б - Анализ метилирования промотора *TRIM25* NGS секвенированием.

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

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

Далее исследовали, может ли восстанавливаться уровень экспрессии *TRIM25* в K42R мутантных клетках при снижении уровня белка Kaiso. Для этого в K42R мутантные клетки вводили siRNA, специфичную для Kaiso, или контрольную siRNA. Несмотря на подавление экспрессии Kaiso в клетках, *TRIM25* либо по-прежнему не экспрессировался (в первом клоне), либо уровень его экспрессии оставался на неизменном низком уровне (во втором клоне) (Рисунок 44). Таким образом, экспрессия мутантной формы белка Kaiso K42R приводит к практически полному подавлению транскрипции *TRIM25*.

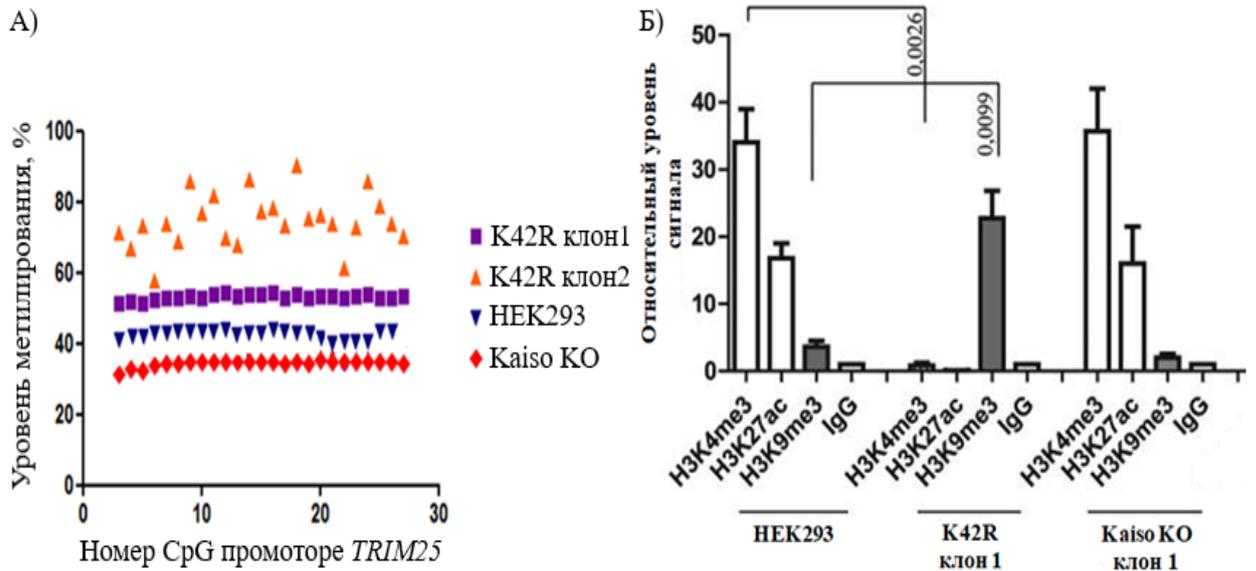


**Рисунок 44.** Влияние дефицита Kaiso на экспрессию TRIM25 в клеточной линии K42R. А - Анализ qPCR-RT экспрессии TRIM 25 в HEK293 клонах K42R при добавлении siRNA. Б - Вестерн-блот анализ изменение количества белка TRIM25 в полученных клеточных линиях.

Вероятно, мутация K42R в Kaiso установила такое неблагоприятное состояние хроматина на промоторе *TRIM25*, что даже когда уровень K42R Kaiso был значительно снижен с помощью siRNA, промотор оставался в неактивном состоянии из-за эпигенетических факторов. Бисульфитный анализ показал, что в этих клетках наблюдается увеличение метилирования промоторной области *TRIM25* по сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 45). 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 [266]. В эухроматине H3K9me3 был найден на регуляторных элементах генов плюрипотентных факторов [267]. Возможно влияние Kaiso на репрограммирование МЭФ связано не только с изменением метилирования, но и с изменениями модификаций гистонов.

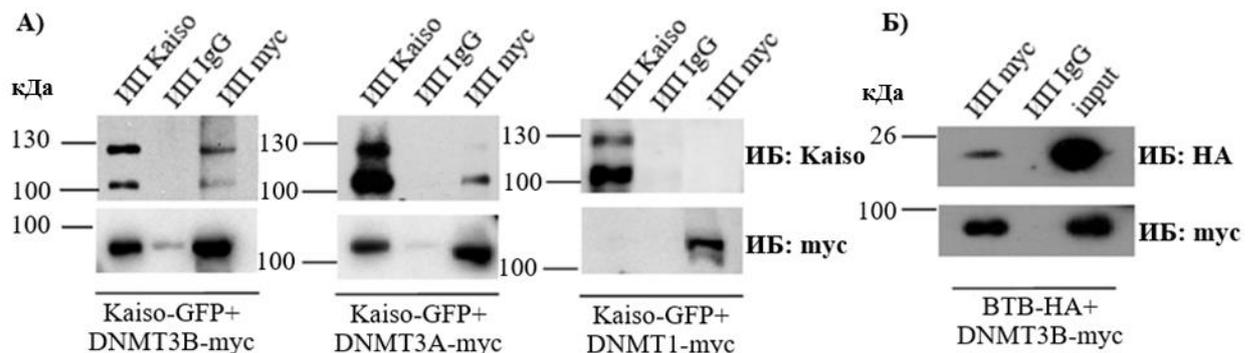
Таким образом, K42R форма белка Kaiso может регулировать экспрессию *TRIM25*, увеличивая метилирование его промотора и приводя к появлению гистоновой модификации H3K9me3.



**Рисунок 45. Анализ метилирования промотора *TRIM25* и гистоновых модификаций.** А - Анализ метилирования промотора *TRIM25* NGS секвенированием. Б - ChIP анализ хроматиновых меток (H3K4me3, H3K27ac, H3K9me3) на промоторе *TRIM25* в клетках с различным статусом Kaiso (дикий тип - HEK293, Kaiso KO клон1, несумоилированный Kaiso - K42R клон1, восстановление Kaiso в Kaiso KO).

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

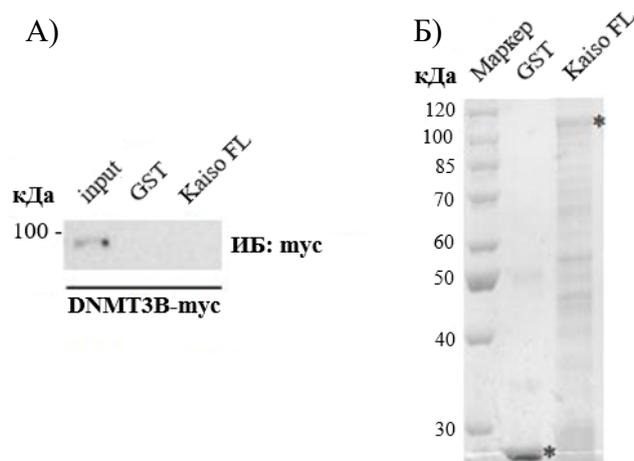
Поскольку Kaiso может влиять на уровень метилирования ДНК, причем удаление *Kaiso* снижает метилирование, а ре-экспрессия приводит к восстановлению профиля метилирования ДНК, то можно предположить, что Kaiso может взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами. Для проверки данной гипотезы, была проведена ко-трансфекция Kaiso-GFP и DNMT1, DNMT3A или DNMT3B с тагом мус на С-конце в клетки HEK293. Иммунопреципитация с антителами на мус продемонстрировала, что Kaiso образует комплекс с DNMT3A и DNMT3B, но не с DNMT1 (Рисунок 46).



**Рисунок. 46. Вестерн-блот ко-иммунопреципитации DNMTs с Kaiso.** А - Kaiso-GFP котрансфицированного с DNMT1-мус, DNMT3A-мус или DNMT3B-мус; Б - BTV-HA 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 ВТВ/POZ домена и на С-конце содержит три цинковых пальца С2Н2 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-мус с дальнейшей иммунопреципитацией белков с мус антителами показала, что ВТВ/POZ домена Kaiso достаточно для образования комплекса с *de novo* ДНК-метилтрансферазой DNMT3B (Рисунок 46).

Затем исследовали, может ли Kaiso взаимодействовать напрямую с *de novo* ДНК-метилтрансферазами, или они формируют многокомпонентный комплекс друг с другом. Копреципитацию проводили на глутатион-сефарозе, с которой связывали химерный белок Kaiso-GST, наработанный в *E.coli*. В качестве отрицательного контроля использовали сефарозу с GST. Сефарозу инкубировали с лизатами из клеток HEK29, трансфицированных DNMT3B-мус. Вестерн-блот преципитатов показал, что DNMT3B и Kaiso не могут взаимодействовать непосредственно друг с другом (Рисунок 47).



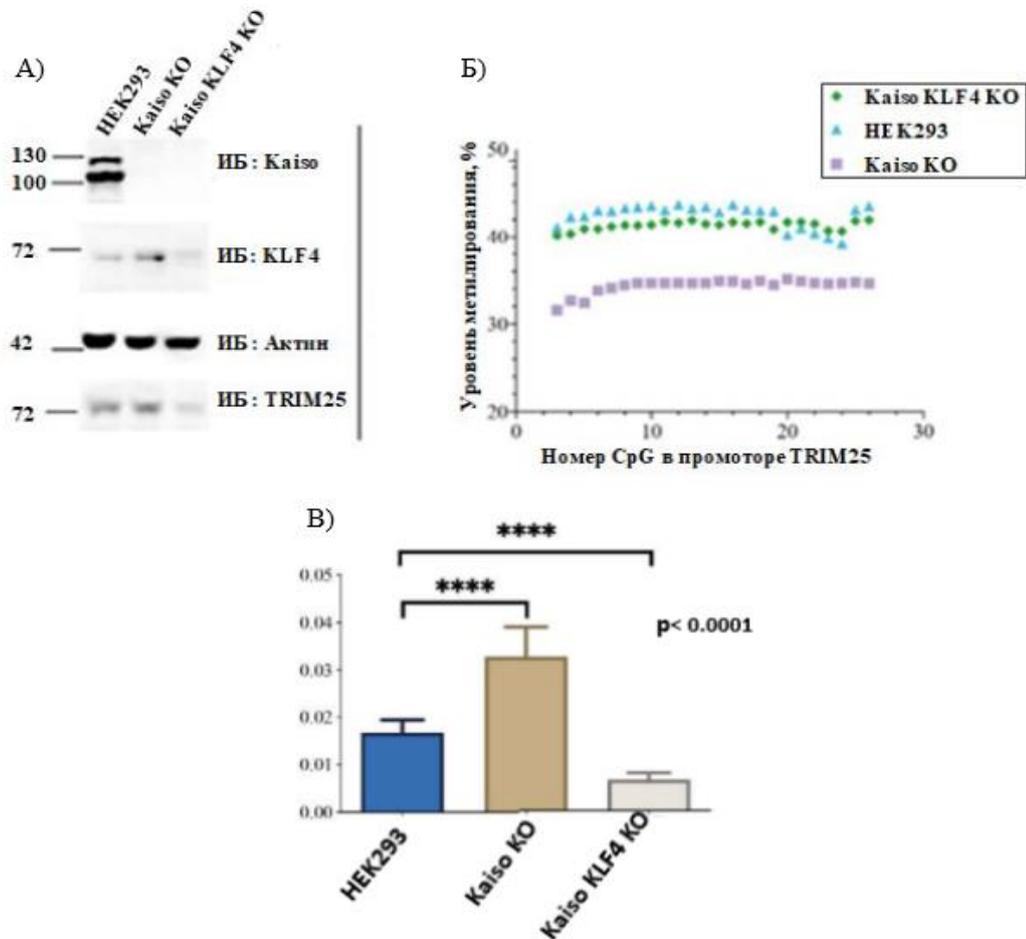
**Рисунок 47. Вестерн-блот анализ прямого взаимодействия Kaiso с DNMT3B.** Kaiso не взаимодействует с DNMT3B напрямую. В качестве отрицательного контроля использовали сефарозу с GST.

Следовательно, Kaiso и DNMT3B могут существовать в одном комплексе, но не взаимодействуют напрямую.

### 5.3.6 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 отсутствие Kaiso. Чтобы ответить на этот вопрос, в клетках HEK293 с помощью CRISPR/Cas9 редактирования была сдвинута рамка считывания в *KLF4* и в *Kaiso* (Рисунок 48).



**Рисунок 48. 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 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.

## 6) ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе автором было расширено понимание вклада белка Kaiso в регуляцию экспрессии генов, а также то, что посттрансляционная модификация влияет на его сродство к таргетным участкам генома. Показано, что промотор *TRIM25* является мишенью белка Kaiso. В ходе работы было установлено, что Kaiso влияет на экспрессию *TRIM25* за счет регуляции уровня метилирования промоторной области. В частности, показано, что процесс изменения метилирования промоторной области имеет обратимый характер.

В результате проведенной работы установлено, что нокаут гена *Kaiso* приводит к снижению уровня метилирования промотора одного из факторов плюрипотентности, а именно *Oct4*. Автором показано, что нокаут по гену *Kaiso* приводит к более быстрому и эффективному репрограммированию клеток. Также установлено, что скорость образования ЩФ-позитивных колоний связана с увеличением пролиферативной активности нокаутных клеток. Нельзя также исключать, что нокаут *Kaiso* может косвенно влиять на эффективность репрограммирования за счет конкуренции за сайты связывания ДНК с KLF4. В ходе работы показано, что Kaiso может взаимодействовать *de novo* ДНК-метилтрансферазами, а именно с DNMT3A DNMT3B. Эти данные позволяют сделать вывод, что изменения метилирования ДНК непосредственно связано с возможностью Kaiso привлекать *de novo* ДНК-метилтрансферазы.

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

## ВЫВОДЫ

### 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 Saki-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 литературы*

1. Zhang J, Yang C, Wu C, Cui W, Wang L. DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers* . 2020;12. doi:10.3390/cancers12082123
2. Jang H, Serra C. Nutrition, epigenetics, and diseases. *Clin Nutr Res*. 2014;3: 1–8.
3. Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis*. 2018;5: 1–8.
4. Lekka E, Hall J. Noncoding RNAs in disease. *FEBS Lett*. 2018;592: 2884–2900.
5. Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep*. 2017;37: 3–9.
6. Alhamwe BA, Khalaila R, Wolf J, von Bülow V, Harb H, Alhamdan F, et al. Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018. doi:10.1186/s13223-018-0259-4
7. Sadri-Vakili G, Cha J-HJ. Mechanisms of disease: Histone modifications in Huntington’s disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2: 330–338.
8. Boland MJ, Nazor KL, Loring JF. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. *Circ Res*. 2014;115: 311–324.
9. Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, et al. Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science*. 2017;356. doi:10.1126/science.aaj2239
10. Tullius T, Parker S. Faculty Opinions recommendation of DNA-binding specificities of human transcription factors. *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*. 2013. doi:10.3410/f.717972362.793472797
11. Prokhortchouk A. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes & Development*. 2001. pp. 1613–1618. doi:10.1101/gad.198501
12. Filion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez P-A. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol*. 2006;26: 169–181.
13. Daniel JM, Spring CM, Crawford HC, Reynolds AB, Baig A. The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2002;30: 2911–2919.
14. Koh D-I, Han D, Ryu H, Choi W-I, Jeon B-N, Kim M-K, et al. KAISO, a critical regulator of p53-mediated transcription of CDKN1A and apoptotic genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014. pp. 15078–15083. doi:10.1073/pnas.1318780111

15. Raghav SK, Waszak SM, Krier I, Gubelmann C, Isakova A, Mikkelsen TS, et al. Integrative Genomics Identifies the Corepressor SMRT as a Gatekeeper of Adipogenesis through the Transcription Factors C/EBP $\beta$  and KAISO. *Molecular Cell*. 2012. pp. 335–350. doi:10.1016/j.molcel.2012.03.017
16. Yoon H-G, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell*. 2003;12: 723–734.
17. Bohne F, Langer D, Martiné U, Eider CS, Cencic R, Begemann M, et al. Kaiso mediates human ICR1 methylation maintenance and H19 transcriptional fine regulation. *Clinical Epigenetics*. 2016. doi:10.1186/s13148-016-0215-4
18. Liu Y, Olanrewaju YO, Zheng Y, Hashimoto H, Blumenthal RM, Zhang X, et al. Structural basis for Klf4 recognition of methylated DNA. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: 4859–4867.
19. Sardina JL, Collombet S, Tian TV, Gómez A, Di Stefano B, Berenguer C, et al. Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate. *Cell Stem Cell*. 2018;23: 727–741.e9.
20. Lee MR, Prasain N, Chae H-D, Kim Y-J, Mantel C, Yoder MC, et al. Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*. 2013;31: 666–681.
21. Zhang W, Feng G, Wang L, Teng F, Wang L, Li W, et al. MeCP2 deficiency promotes cell reprogramming by stimulating IGF1/AKT/mTOR signaling and activating ribosomal protein-mediated cell cycle gene translation. *J Mol Cell Biol*. 2018;10: 515–526.
22. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Health Perspect*. 2006;114: A160–7.
23. Sidhu KS. Editorial - Present Status and Future Trends in Adult and Embryonic Stem Cell Research. *The Open Stem Cell Journal*. 2011. pp. 1–3. doi:10.2174/1876893801103010001
24. Dekker J, Mirny L. The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell*. 2016;164: 1110–1121.
25. Hansen AS, Cattoglio C, Darzacq X, Tjian R. Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus*. 2018;9: 20–32.
26. Schoenfelder S, Fraser P. Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. *Nat Rev Genet*. 2019;20: 437–455.
27. Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM, Schubert I. Histone H4

acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *Plant Cell*. 2000;12: 2087–2100.

28. Shevelyov YY, Ulianov SV. The Nuclear Lamina as an Organizer of Chromosome Architecture. *Cells*. 2019;8. doi:10.3390/cells8020136
29. Allshire RC, Madhani HD. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19: 229–244.
30. Herz H-M, Mohan M, Garruss AS, Liang K, Takahashi Y-H, Mickey K, et al. Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the *Drosophila* homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes Dev*. 2012;26: 2604–2620.
31. Butler JS, Dent SYR. The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis. *Blood*. 2013;121: 3076–3084.
32. Xu J, Kidder BL. H4K20me3 co-localizes with activating histone modifications at transcriptionally dynamic regions in embryonic stem cells. *BMC Genomics*. 2018;19: 514.
33. Hałasa M, Wawruszak A, Przybyszewska A, Jaruga A, Guz M, Kałafut J, et al. H3K18Ac as a Marker of Cancer Progression and Potential Target of Anti-Cancer Therapy. *Cells*. 2019;8. doi:10.3390/cells8050485
34. Bodai L, Zsindely N, Gáspár R, Kristó I, Komonyi O, Boros IM. Ecdysone induced gene expression is associated with acetylation of histone H3 lysine 23 in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2012;7: e40565.
35. Williams SK, Truong D, Tyler JK. Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 9000–9005.
36. Kaimori J-Y, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, et al. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep*. 2016;6: 24318.
37. Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, et al. Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1: 500–508.
38. Kim JK, Lim Y, Lee JO, Lee Y-S, Won NH, Kim H, et al. PRMT4 is involved in insulin secretion via the methylation of histone H3 in pancreatic  $\beta$  cells. *J Mol Endocrinol*. 2015;54: 315–324.
39. Granot G, Sikron-Persi N, Li Y, Grafi G. Phosphorylated H3S10 occurs in distinct regions of the nucleolus in differentiated leaf cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1789: 220–224.

40. Culerrier R, Carraz M, Mann C, Djabali M. MSK1 triggers the expression of the INK4AB/ARF locus in oncogene-induced senescence. *Mol Biol Cell*. 2016;27: 2726–2734.
41. Govin J, Schug J, Krishnamoorthy T, Dorsey J, Khochbin S, Berger SL. Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. 2010;38: 4599–4606.
42. Singh R, Bassett E, Chakravarti A, Parthun MR. Replication-dependent histone isoforms: a new source of complexity in chromatin structure and function. *Nucleic Acids Res*. 2018;46: 8665–8678.
43. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21: 381–395.
44. Zhang W, Garcia N, Feng Y, Zhao H, Messing J. Genome-wide histone acetylation correlates with active transcription in maize. *Genomics*. 2015. pp. 214–220. doi:10.1016/j.ygeno.2015.05.005
45. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development*. 1998. pp. 599–606. doi:10.1101/gad.12.5.599
46. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. pp. 435–459. doi:10.1128/mnbr.64.2.435-459.2000
47. Javaid N, Choi S. Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes*. 2017. p. 196. doi:10.3390/genes8080196
48. Mersfelder EL, Parthun MR. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Research*. 2006. pp. 2653–2662. doi:10.1093/nar/gkl338
49. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13: 343–357.
50. Bodai L, Zsindely N. Histone methylation in Huntington’s disease: are bivalent promoters the critical targets? *Neural Regeneration Research*. 2018. p. 1191. doi:10.4103/1673-5374.235029
51. Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017. pp. e324–e324. doi:10.1038/emm.2017.11
52. Woodfine K, Huddleston JE, Murrell A. Quantitative analysis of DNA methylation at all human imprinted regions reveals preservation of epigenetic stability in adult somatic tissue. *Epigenetics Chromatin*. 2011;4: 1.

53. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes & Cancer*. 2011. pp. 607–617. doi:10.1177/1947601910393957
54. Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, Perlman E, Flam F, Frieman MB, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res*. 2002;12: 543–554.
55. Jeziorska DM, Murray RJS, De Gobbi M, Gaentzsch R, Garrick D, Ayyub H, et al. DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114: E7526–E7535.
56. Raddatz G, Guzzardo PM, Olova N, Fantappiè MR, Ramp M, Schaefer M, et al. Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 8627–8631.
57. Laisné M, Gupta N, Kirsh O, Pradhan S, Defossez P-A. Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals. *Genes*. 2018;9. doi:10.3390/genes9120617
58. Ooi SKT, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007;448: 714–717.
59. Ravichandran M, Jurkowska RZ, Jurkowski TP. Target specificity of mammalian DNA methylation and demethylation machinery. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2018. pp. 1419–1435. doi:10.1039/c7ob02574b
60. Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ. Structure-Based Mechanistic Insights into DNMT1-Mediated Maintenance DNA Methylation. *Science*. 2012. pp. 709–712. doi:10.1126/science.1214453
61. Mailand N, Gibbs-Seymour I, Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA–protein interactions for genome stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. pp. 269–282. doi:10.1038/nrm3562
62. Frauer C, Rottach A, Meilinger D, Bultmann S, Fellingner K, Hasenöder S, et al. Different Binding Properties and Function of CXXC Zinc Finger Domains in Dnmt1 and Tet1. *PLoS ONE*. 2011. p. e16627. doi:10.1371/journal.pone.0016627
63. Lee GE, Kim JH, Taylor M, Muller MT. DNA Methyltransferase 1-associated Protein (DMP1) Is a Co-repressor That Stimulates DNA Methylation Globally and Locally at Sites of Double Strand Break Repair. *Journal of Biological Chemistry*. 2010. pp. 37630–37640. doi:10.1074/jbc.m110.148536
64. Berkyurek AC, Suetake I, Arita K, Takeshita K, Nakagawa A, Shirakawa M, et al. The DNA Methyltransferase Dnmt1 Directly Interacts with the SET and RING Finger-

associated (SRA) Domain of the Multifunctional Protein Uhrf1 to Facilitate Accession of the Catalytic Center to Hemi-methylated DNA. *Journal of Biological Chemistry*. 2014. pp. 379–386. doi:10.1074/jbc.m113.523209

65. Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*. 1997;277: 1996–2000.
66. Schermelleh L, Haemmer A, Spada F, Rösing N, Meilinger D, Rothbauer U, et al. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2007;35: 4301–4312.
67. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature Genetics*. 2000. pp. 338–342. doi:10.1038/77124
68. Svedružić ŽM. Dnmt1 structure and function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;101: 221–254.
69. Li E, Zhang Y. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014. pp. a019133–a019133. doi:10.1101/cshperspect.a019133
70. Ruscio AD, Di Ruscio A, Ebralidze AK, Benoukraf T, Amabile G, Goff LA, et al. DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation. *Nature*. 2013. pp. 371–376. doi:10.1038/nature12598
71. Kent B, Magnani E, Walsh MJ, Sadler KC. UHRF1 regulation of Dnmt1 is required for pre-gastrula zebrafish development. *Developmental Biology*. 2016. pp. 99–113. doi:10.1016/j.ydbio.2016.01.036
72. Nowialis P, Lopusna K, Opavska J, Haney SL, Abraham A, Sheng P, et al. Catalytically inactive Dnmt3b rescues mouse embryonic development by accessory and repressive functions. *Nat Commun*. 2019;10: 4374.
73. Jin B, Robertson KD. DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754: 3–29.
74. Meng HX, Hackett JA, Nestor C, Dunican DS, Madej M, Reddington JP, et al. Apoptosis and DNA Methylation. *Cancers*. 2011. pp. 1798–1820. doi:10.3390/cancers3021798
75. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*. 1999. pp. 247–257. doi:10.1016/s0092-8674(00)81656-6
76. Jeltsch A, Jurkowska RZ. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: 8556–8575.
77. Zhang Y, Jurkowska R, Soeroes S, Rajavelu A, Dhayalan A, Bock I, et al.

Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Research*. 2010. pp. 4246–4253.

doi:10.1093/nar/gkq147

78. Sun Z, Zhang Y, Jia J, Fang Y, Tang Y, Wu H, et al. H3K36me3, message from chromatin to DNA damage repair. *Cell & Bioscience*. 2020. doi:10.1186/s13578-020-0374-z

79. Jeltsch A, Broche J, Bashtrykov P. Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. *Genes*. 2019;10. doi:10.3390/genes10050388

80. Manzo M, Wirz J, Ambrosi C, Villaseñor R, Roschitzki B, Baubec T. Isoform-specific localization of DNMT3A regulates DNA methylation fidelity at bivalent CpG islands. *The EMBO Journal*. 2017. pp. 3421–3434. doi:10.15252/embj.201797038

81. Watanabe D, Suetake I, Tada T, Tajima S. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech Dev*. 2002;118: 187–190.

82. Dodge JE, Okano M, Dick F, Tsujimoto N, Chen T, Wang S, et al. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem*. 2005;280: 17986–17991.

83. Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*. 2018. pp. 81–92. doi:10.1038/nrg.2017.80

84. Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Dnmt2 is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA methyltransferase in eukaryotes. *Russian Journal of Genetics*. 2016. pp. 237–248. doi:10.1134/s1022795416030029

85. Lyko F. RNA Methylation and Its Role in the Hematopoietic System. *Blood*. 2017;130: SCI–52.

86. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*. 2006. pp. 395–398. doi:10.1126/science.1120976

87. Ghanbarian H, Wagner N, Polo B, Baudouy D, Kiani J, Michiels J-F, et al. Dnmt2/Trdmt1 as Mediator of RNA Polymerase II Transcriptional Activity in Cardiac Growth. *PLoS One*. 2016;11: e0156953.

88. Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. Mechanism of Stimulation of Catalytic Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *Journal of Biological Chemistry*. 2005. pp. 13341–13348. doi:10.1074/jbc.m413412200

89. Veland N, Lu Y, Hardikar S, Gaddis S, Zeng Y, Liu B, et al. DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells.

Nucleic Acids Res. 2019;47: 152–167.

90. Jain D, Meydan C, Lange J, Bouuaert CC, Mason CE, Anderson KV, et al. rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. doi:10.1101/121822

91. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Hérault Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*. 2016. pp. 909–912. doi:10.1126/science.aah5143

92. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA Demethylation Dynamics. *Cell*. 2011. pp. 866–872. doi:10.1016/j.cell.2011.08.042

93. Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes & Development*. 2016. pp. 733–750. doi:10.1101/gad.276568.115

94. Pantier R, Tatar T, Colby D, Chambers I. Endogenous epitope-tagging of Tet1, Tet2 and Tet3 identifies TET2 as a naïve pluripotency marker. *Life Science Alliance*. 2019. p. e201900516. doi:10.26508/lsa.201900516

95. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu Y-C, Markoulaki S, Cheng AW, et al. Tet1 Is Dispensable for Maintaining Pluripotency and Its Loss Is Compatible with Embryonic and Postnatal Development. *Cell Stem Cell*. 2011. pp. 166–175. doi:10.1016/j.stem.2011.07.010

96. Lio C-W, Zhang J, González-Avalos E, Hogan PG, Chang X, Rao A. Tet2 and Tet3 cooperate with B-lineage transcription factors to regulate DNA modification and chromatin accessibility. *eLife*. 2016. doi:10.7554/elife.18290

97. Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, Aifantis I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell*. 2011;9: 193–204.

98. Zhao H, Chen T. Tet family of 5-methylcytosine dioxygenases in mammalian development. *Journal of Human Genetics*. 2013. pp. 421–427. doi:10.1038/jhg.2013.63

99. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7: 51–63.

100. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung H-K, Beyer TA, Datti A, et al. Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2010. pp. 64–77. doi:10.1016/j.stem.2010.04.015

101. Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, et al. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet*. 2013;45: 34–42.

102. Planello AC, Ji J, Sharma V, Singhanian R, Mbabaali F, Müller F, et al. Aberrant DNA methylation reprogramming during induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors. *Cell Regen.* 2014;3: 4.
103. Zhou HY, Katsman Y, Dhaliwal NK, Davidson S, Macpherson NN, Sakthidevi M, et al. A Sox2 distal enhancer cluster regulates embryonic stem cell differentiation potential. *Genes Dev.* 2014;28: 2699–2711.
104. Papp B, Plath K. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell.* 2013;152: 1324–1343.
105. Schmidt R, Plath K. The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol.* 2012;13: 251.
106. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature.* 2008;454: 49–55.
107. Koche RP, Smith ZD, Adli M, Gu H, Ku M, Gnirke A, et al. Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell.* 2011;8: 96–105.
108. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 2007;1: 55–70.
109. Sridharan R, Tchieu J, Mason MJ, Yachechko R, Kuoy E, Horvath S, et al. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell.* 2009;136: 364–377.
110. Mattout A, Biran A, Meshorer E. Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells. *J Mol Cell Biol.* 2011;3: 341–350.
111. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 21931–21936.
112. Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* 2011;470: 279–283.
113. Doi A, Park I-H, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009;41: 1350–1353.
114. Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, et

al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol.* 2009;27: 353–360.

115. Sharifi-Zarchi A, Gerovska D, Adachi K, Totonchi M, Pezeshk H, Taft RJ, et al. DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics.* 2017;18: 964.

116. Kishikawa S, Murata T, Kimura H, Shiota K, Yokoyama KK. Regulation of transcription of the *Dnmt1* gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *Eur J Biochem.* 2002;269: 2961–2970.

117. Kong X, Peng B, Yang Y, Zhang P, Qin B, Han D, et al. p53 Represses transcription of RING finger LIM domain-binding protein RLIM through Sp1. *PLoS One.* 2013;8: e62832.

118. Niehrs C. Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation.* 2009;77: 1–11.

119. Lin R-K, Wu C-Y, Chang J-W, Juan L-J, Hsu H-S, Chen C-Y, et al. Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res.* 2010;70: 5807–5817.

120. Sun F, Chen Q, Yang S, Pan Q, Ma J, Wan Y, et al. Remodeling of chromatin structure within the promoter is important for *bmp-2*-induced *fgfr3* expression. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: 3897–3911.

121. Kumar P, Tripathi S, Pandey KN. Histone deacetylase inhibitors modulate the transcriptional regulation of guanylyl cyclase/natriuretic peptide receptor- $\alpha$  gene: interactive roles of modified histones, histone acetyltransferase, p300, AND Sp1. *J Biol Chem.* 2014;289: 6991–7002.

122. Sun Z, Yu S, Chen S, Liu H, Chen Z. SP1 regulates KLF4 via SP1 binding motif governed by DNA methylation during odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Cell Biochem.* 2019;120: 14688–14699.

123. Qi Q, Cheng L, Tang X, He Y, Li Y, Yee T, et al. Dynamic CTCF binding directly mediates interactions among cis-regulatory elements essential for hematopoiesis. *Blood.* 2021;137: 1327–1339.

124. Fujiki K, Shinoda A, Kano F, Sato R, Shirahige K, Murata M. PPAR $\gamma$ -induced PARylation promotes local DNA demethylation by production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Commun.* 2013;4: 2262.

125. Sardina JL, Collombet S, Tian TV, Gómez A, Di Stefano B, Berenguer C, et al. Transcription Factors Drive Tet2-Mediated Enhancer Demethylation to Reprogram Cell Fate.

Cell Stem Cell. 2018;23: 905–906.

126. Hervouet E, Vallette FM, Cartron P-F. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*. 2009;4: 487–499.

127. Statham AL, Robinson MD, Song JZ, Coolen MW, Stirzaker C, Clark SJ. Bisulfite sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res*. 2012;22: 1120–1127.

128. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F, et al. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res*. 2012;22: 1128–1138.

129. Verschure PJ, van der Kraan I, de Leeuw W, van der Vlag J, Carpenter AE, Belmont AS, et al. *In vivo* HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Mol Cell Biol*. 2005;25: 4552–4564.

130. Sarraf SA, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell*. 2004;15: 595–605.

131. Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J*. 2001;20: 2536–2544.

132. Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ 3rd. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*. 2002;16: 919–932.

133. Agata Y, Matsuda E, Shimizu A. Two novel Krüppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J Biol Chem*. 1999;274: 16412–16422.

134. O’Geen H, Squazzo SL, Iyengar S, Blahnik K, Rinn JL, Chang HY, et al. Genome-wide analysis of KAP1 binding suggests autoregulation of KRAB-ZNFs. *PLoS Genet*. 2007;3: e89.

135. Frieze S, O’Geen H, Blahnik KR, Jin VX, Farnham PJ. ZNF274 recruits the histone methyltransferase SETDB1 to the 3’ ends of ZNF genes. *PLoS One*. 2010;5: e15082.

136. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006;439: 871–874.

137. Pasini D, Cloos PAC, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski J-P, Johansen JV, et al. JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells.

Nature. 2010;464: 306–310.

138. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011;469: 343–349.
139. McGarvey KM, Greene E, Fahrner JA, Jenuwein T, Baylin SB. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. Cancer Res. 2007;67: 5097–5102.
140. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. Mol Cell Biol. 1998;18: 6538–6547.
141. Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, et al. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. Nature. 2008;455: 822–825.
142. Qian C, Li S, Jakoncic J, Zeng L, Walsh MJ, Zhou M-M. Structure and hemimethylated CpG binding of the SRA domain from human UHRF1. J Biol Chem. 2008;283: 34490–34494.
143. Baubec T, Ivánek R, Lienert F, Schübeler D. Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. Cell. 2013;153: 480–492.
144. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. Nat Genet. 1999;23: 58–61.
145. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature. 1998;393: 386–389.
146. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. Curr Opin Genet Dev. 2005;15: 490–495.
147. Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, et al. Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. Genome Res. 2012;22: 1798–1812.
148. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, et al. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. Mol Cell. 2010;38: 576–589.
149. Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. Nat Genet. 2003;33: 66–69.
150. Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by mCpmCpG methylation. Gene. 1997;195: 67–71.

151. Quenneville S, Verde G, Corsinotti A, Kapopoulou A, Jakobsson J, Offner S, et al. In Embryonic Stem Cells, ZFP57/KAP1 Recognize a Methylated Hexanucleotide to Affect Chromatin and DNA Methylation of Imprinting Control Regions. *Molecular Cell*. 2011. pp. 361–372. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.032
152. Filion GJP, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez P-A. A Family of Human Zinc Finger Proteins That Bind Methylated DNA and Repress Transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 2006. pp. 169–181. doi:10.1128/mcb.26.1.169-181.2006
153. Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*. 1991;65: 395–407.
154. Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85: 2066–2070.
155. Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 6481–6486.
156. Mann, Chatterjee, Zhao, He. CG methylated microarrays identify a novel methylated sequence bound by the CEBPB| ATF4 heterodimer that is active *in vivo*. *Genome*. Available: <https://genome.cshlp.org/content/23/6/988.short>
157. Rishi V, Bhattacharya P, Chatterjee R, Rozenberg J, Zhao J, Glass K, et al. CpG methylation of half-CRE sequences creates C/EBP $\alpha$  binding sites that activate some tissue-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107: 20311–20316.
158. Iguchi-Arigo SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev*. 1989;3: 612–619.
159. Marchal C, Defossez P-A, Miotto B. Context-dependent CpG methylation directs cell-specific binding of transcription factor ZBTB38. *Epigenetics*. 2022; 1–22.
160. Blattler A, Yao L, Wang Y, Ye Z, Jin VX, Farnham PJ. ZBTB33 binds unmethylated regions of the genome associated with actively expressed genes. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6: 13.
161. Choy JS, Wei S, Lee JY, Tan S, Chu S, Lee T-H. DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. *J Am Chem Soc*. 2010;132: 1782–1783.
162. John S, Sabo PJ, Thurman RE, Sung M-H, Biddie SC, Johnson TA, et al. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet*. 2011;43: 264–268.
163. Inoue A, Shen L, Dai Q, He C, Zhang Y. Generation and replication-dependent

dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development. *Cell Research*. 2011. pp. 1670–1676. doi:10.1038/cr.2011.189

164. Hudson NO, Buck-Koehntop BA. Zinc Finger Readers of Methylated DNA. *Molecules*. 2018. p. 2555. doi:10.3390/molecules23102555
165. Defossez P-A, Stancheva I. Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;101: 377–398.
166. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res*. 1993;21: 4886–4892.
167. Clemens AW, Wu DY, Moore JR, Christian DL, Zhao G, Gabel HW. MeCP2 Represses Enhancers through Chromosome Topology-Associated DNA Methylation. *Mol Cell*. 2020;77: 279–293.e8.
168. Kyle SM, Vashi N, Justice MJ. Rett syndrome: a neurological disorder with metabolic components. *Open Biology*. 2018. p. 170216. doi:10.1098/rsob.170216
169. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9: 64–71.
170. Auclair G, Guibert S, Bender A, Weber M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. *Genome Biol*. 2014;15: 545.
171. Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*. 2001;27: 322–326.
172. Kim JJ, Savas JN, Miller MT, Hu X, Carromeu C, Lavallée-Adam M, et al. Proteomic analyses reveal misregulation of LIN28 expression and delayed timing of glial differentiation in human iPS cells with MECP2 loss-of-function. *PLoS One*. 2019;14: e0212553.
173. Melton C, Judson RL, Blaloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2010;463: 621–626.
174. Worringer KA, Rand TA, Hayashi Y, Sami S, Takahashi K, Tanabe K, et al. The *let-7/LIN-41* pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell Stem Cell*. 2014;14: 40–52.
175. Li L, Chen B-F, Chan W-Y. An epigenetic regulator: methyl-CpG-binding domain protein 1 (MBD1). *Int J Mol Sci*. 2015;16: 5125–5140.
176. Mahmood N, Rabbani SA. DNA Methylation Readers and Cancer: Mechanistic and Therapeutic Applications. *Front Oncol*. 2019;9: 489.
177. Wood KH, Johnson BS, Welsh SA, Lee JY, Cui Y, Krizman E, et al. Tagging

methyl-CpG-binding domain proteins reveals different spatiotemporal expression and supports distinct functions. *Epigenomics*. 2016;8: 455–473.

178. Stirzaker C, Song JZ, Ng W, Du Q, Armstrong NJ, Locke WJ, et al. Methyl-CpG-binding protein MBD2 plays a key role in maintenance and spread of DNA methylation at CpG islands and shores in cancer. *Oncogene*. 2017;36: 1328–1338.

179. Ramírez J, Dege C, Kutateladze TG, Hagman J. MBD2 and Multiple Domains of CHD4 Are Required for Transcriptional Repression by Mi-2/NuRD Complexes. *Molecular and Cellular Biology*. 2012. pp. 5078–5088. doi:10.1128/mcb.00819-12

180. Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A. Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development. *Genes Dev*. 2001;15: 710–723.

181. Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008. pp. 1509–1522. doi:10.1007/s00018-008-7324-y

182. Du Q, Luu P-L, Stirzaker C, Clark SJ. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*. 2015;7: 1051–1073.

183. Wood KH, Zhou Z. Emerging Molecular and Biological Functions of MBD2, a Reader of DNA Methylation. *Front Genet*. 2016;7: 93.

184. Jaffer S, Goh P, Abbasian M, Nathwani AC. Mbd3 Promotes Reprogramming of Primary Human Fibroblasts. *Int J Stem Cells*. 2018;11: 235–241.

185. Roloff TC, Hilger Ropers H, Nuber UA. Comparative study of methyl-CpG-binding domain proteins. *BMC Genomics*. 2003. doi:10.1186/1471-2164-4-1

186. Hashimoto H, Zhang X, Cheng X. Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40: 8276–8284.

187. Sjolund AB, Senejani AG, Sweasy JB. MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutat Res*. 2013;743-744: 12–25.

188. Bellacosa A, Drohat AC. Role of base excision repair in maintaining the genetic and epigenetic integrity of CpG sites. *DNA Repair* . 2015;32: 33–42.

189. Millar CB, Guy J, Sansom OJ, Selfridge J, MacDougall E, Hendrich B, et al. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science*. 2002;297: 403–405.

190. Liao W, Li M, Wu H, Jia S, Zhang N, Dai Y, et al. Down-regulation of MBD4 contributes to hypomethylation and overexpression of CD70 in CD4+ T cells in systemic lupus

erythematosus. *Clin Epigenetics*. 2017;9: 104.

191. Kim K-Y, Tanaka Y, Su J, Cakir B, Xiang Y, Patterson B, et al. Uhrf1 regulates active transcriptional marks at bivalent domains in pluripotent stem cells through Setd1a. *Nat Commun*. 2018;9: 2583.

192. Rajakumara E, Wang Z, Ma H, Hu L, Chen H, Lin Y, et al. PHD finger recognition of unmodified histone H3R2 links UHRF1 to regulation of euchromatic gene expression. *Mol Cell*. 2011;43: 275–284.

193. Sidhu H, Capalash N. UHRF1: The key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics. *Tumour Biol*. 2017;39: 1010428317692205.

194. Hahm JY, Park JW, Kang J-Y, Park J, Kim C-H, Kim J-Y, et al. Acetylation of UHRF1 Regulates Hemi-methylated DNA Binding and Maintenance of Genome-wide DNA Methylation. *Cell Rep*. 2020;32: 107958.

195. Liu Y, Zhang B, Meng X, Korn MJ, Parent JM, Lu L-Y, et al. UHRF2 regulates local 5-methylcytosine and suppresses spontaneous seizures. *Epigenetics*. 2017;12: 551–560.

196. Muto M, Kanari Y, Kubo E, Takabe T, Kurihara T, Fujimori A, et al. Targeted disruption of Np95 gene renders murine embryonic stem cells hypersensitive to DNA damaging agents and DNA replication blocks. *J Biol Chem*. 2002;277: 34549–34555.

197. Tittle RK, Sze R, Ng A, Nuckels RJ, Swartz ME, Anderson RM, et al. Uhrf1 and Dnmt1 are required for development and maintenance of the zebrafish lens. *Dev Biol*. 2011;350: 50–63.

198. Sharif J, Muto M, Takebayashi S-I, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 2007;450: 908–912.

199. Ramesh V, Bayam E, Cernilogar FM, Bonapace IM, Schulze M, Riemenschneider MJ, et al. Loss of Uhrf1 in neural stem cells leads to activation of retroviral elements and delayed neurodegeneration. *Genes Dev*. 2016;30: 2199–2212.

200. Mori T, Ikeda DD, Yamaguchi Y, Unoki M, NIRF Project. NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape. *FEBS Lett*. 2012;586: 1570–1583.

201. Patnaik D, Estève P-O, Pradhan S. Targeting the SET and RING-associated (SRA) domain of ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1 (UHRF1) for anti-cancer drug development. *Oncotarget*. 2018;9: 26243–26258.

202. Peng R, Huang X, Zhang C, Yang X, Xu Y, Bai D. Overexpression of UHRF2 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its clinical significance. *OncoTargets and Therapy*. 2017.

pp. 5863–5872. doi:10.2147/ott.s149361

203. Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32: 1103–1121.

204. Geiman DE. Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Research.* 2000. pp. 1106–1113.  
doi:10.1093/nar/28.5.1106

205. Yet SF, McA’Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, et al. Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem.* 1998;273: 1026–1031.

206. Camacho-Vanegas O, Till J, Miranda-Lorenzo I, Ozturk B, Camacho SC, Martignetti JA. Shaking the family tree: identification of novel and biologically active alternatively spliced isoforms across the KLF family of transcription factors. *FASEB J.* 2013;27: 432–436.

207. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis.* 2006;27: 23–31.

208. Wei D, Wang L, Kanai M, Jia Z, Le X, Li Q, et al. KLF4 $\alpha$  up-regulation promotes cell cycle progression and reduces survival time of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2010;139: 2135–2145.

209. Kim MO, Kim S-H, Cho Y-Y, Nadas J, Jeong C-H, Yao K, et al. ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19: 283–290.

210. Evans PM, Zhang W, Chen X, Yang J, Bhakat KK, Liu C. Kruppel-like factor 4 is acetylated by p300 and regulates gene transcription via modulation of histone acetylation. *J Biol Chem.* 2007;282: 33994–34002.

211. Du JX, McConnell BB, Yang VW. A small ubiquitin-related modifier-interacting motif functions as the transcriptional activation domain of Krüppel-like factor 4. *J Biol Chem.* 2010;285: 28298–28308.

212. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126: 663–676.

213. Tahmasebi S, Ghorbani M, Savage P, Yan K, Gocevski G, Xiao L, et al. Sumoylation of Krüppel-like factor 4 inhibits pluripotency induction but promotes adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2013;288: 12791–12804.

214. Zheng B, Bernier M, Zhang X-H, Suzuki T, Nie C-Q, Li YH, et al. miR-200c-

SUMOylated KLF4 feedback loop acts as a switch in transcriptional programs that control VSMC proliferation. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;82: 201–212.

215. Lim K-H, Kim S-R, Ramakrishna S, Baek K-H. Critical lysine residues of Klf4 required for protein stabilization and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443: 1206–1210.

216. Cho YG, Song JH, Kim CJ, Nam SW, Yoo NJ, Lee JY, et al. Genetic and epigenetic analysis of the KLF4 gene in gastric cancer. *APMIS.* 2007;115: 802–808.

217. Nakahara Y, Northcott PA, Li M, Kongkham PN, Smith C, Yan H, et al. Genetic and epigenetic inactivation of Kruppel-like factor 4 in medulloblastoma. *Neoplasia.* 2010;12: 20–27.

218. Yang W-T, Zheng P-S. Promoter hypermethylation of KLF4 inactivates its tumor suppressor function in cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 2014;9: e88827.

219. Lindeman LC, Winata CL, Aanes H, Mathavan S, Alestrom P, Collas P. Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol.* 2010;54: 803–813.

220. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* 2005;7: 1074–1082.

221. Yang Y, Goldstein BG, Chao H-H, Katz JP. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2005;4: 1216–1221.

222. Ghaleb AM, Katz JP, Kaestner KH, Du JX, Yang VW. Krüppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage. *Oncogene.* 2007;26: 2365–2373.

223. Liu C, DeRoo EP, Stecyk C, Wolsey M, Szuchnicki M, Hagos EG. Impaired autophagy in mouse embryonic fibroblasts null for Krüppel-like Factor 4 promotes DNA damage and increases apoptosis upon serum starvation. *Mol Cancer.* 2015;14: 101.

224. Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, Azegami T, Oguchi H, Sakamaki Y, et al. KLF4-dependent epigenetic remodeling modulates podocyte phenotypes and attenuates proteinuria. *J Clin Invest.* 2014;124: 2523–2537.

225. Curtis B. KLF2/KLF4 Double Knock-out Mouse Embryos Show Cranial Bleeding with Endothelial Disruption of the Primary Head Vein. Virginia Commonwealth University. 2010. doi:10.25772/8NFE-WE42

226. Roussel-Gervais A, Naciri I, Kirsh O, Kasprzyk L. Loss of the methyl-CpG–

binding protein ZBTB4 alters mitotic checkpoint, increases aneuploidy, and promotes tumorigenesis. *Cancer Res.* 2017. Available:

<https://cancerres.aacrjournals.org/content/77/1/62.short>

227. Brandt B, Rashidiani S, Bán Á, Rauch TA. DNA Methylation-Governed Gene Expression in Autoimmune Arthritis. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi:10.3390/ijms20225646
228. Miotto B, Chibi M, Xie P, Koundrioukoff S, Moolman-Smook H, Pugh D, et al. The RBBP6/ZBTB38/MCM10 axis regulates DNA replication and common fragile site stability. *Cell Rep.* 2014;7: 575–587.
229. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 2013;38: 23–38.
230. Ocskó T, Tóth DM, Hoffmann G, Tubak V, Glant TT, Rauch TA. Transcription factor Zbtb38 downregulates the expression of anti-inflammatory IL1r2 in mouse model of rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2018;1861: 1040–1047.
231. Nishio M, Matsuura T, Hibi S, Ohta S, Oka C, Sasai N, et al. Heterozygous loss of Zbtb38 leads to early embryonic lethality via the suppression of Nanog and Sox2 expression. *Cell Prolif.* 2022;55: e13215.
232. Pozner A, Terroatea TW, Buck-Koehntop BA. Cell-specific Kaiso (ZBTB33) Regulation of Cell Cycle through Cyclin D1 and Cyclin E1. *J Biol Chem.* 2016;291: 24538–24550.
233. Short SP, Barrett CW, Stengel KR, Revetta FL, Choksi YA, Coburn LA, et al. Kaiso is required for MTG16-dependent effects on colitis-associated carcinoma. *Oncogene.* 2019. pp. 5091–5106. doi:10.1038/s41388-019-0777-7
234. Zhenilo SV, Musharova OS, Pokhorchuk EB. Transcription factor Kaiso does not interact with hydroxymethylated DNA within CTGCNA sequence context. *Mol Biol .* 2013;47: 522–525.
235. Zhigalova NA, Sokolov AS, Prokhortchouk EB, Zhenilo SV. S100A3 is a novel target gene of Kaiso in mouse skin. *Mol Biol.* 2015;49: 322–325.
236. Hodges AJ, Hudson NO, Buck-Koehntop BA. Cys2His2 Zinc Finger Methyl-CpG Binding Proteins: Getting a Handle on Methylated DNA. *Journal of Molecular Biology.* 2020. pp. 1640–1660. doi:10.1016/j.jmb.2019.09.012
237. Lin QXX, Rebbani K, Jha S, Benoukraf T. ZBTB33 (Kaiso) methylated binding sites are associated with primed heterochromatin. *bioRxiv.* 2019. p. 585653. doi:10.1101/585653
238. Shumskaya VS, Zhigalova NA, Prokhorchouk AV, Prokhorchouk EB. Distribution of Kaiso protein in mouse tissues. *Histochem Cell Biol.* 2015;143: 29–43.

239. Sasai N, Nakao M, Defossez P-A. Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 2010;38: 5015–5022.
240. Donaldson NS, Nordgaard CL, Pierre CC, Kelly KF, Robinson SC, Swystun L, et al. Kaiso regulates Znf131-mediated transcriptional activation. *Exp Cell Res.* 2010;316: 1692–1705.
241. Robinson SC, Klobucar K, Pierre CC, Ansari A, Zhenilo S, Prokhortchouk E, et al. Kaiso differentially regulates components of the Notch signaling pathway in intestinal cells. *Cell Commun Signal.* 2017;15: 24.
242. Kaplun DS, Fok RE, Korostina VS, Prokhortchouk EB, Zhenilo SV. Kaiso Gene Knockout Promotes Somatic Cell Reprogramming. *Biochemistry* . 2019;84: 283–290.
243. Barrett CW, Smith JJ, Lu LC, Markham N, Stengel KR, Short SP, et al. Kaiso directs the transcriptional corepressor MTG16 to the Kaiso binding site in target promoters. *PLoS One.* 2012;7: e51205.
244. Kelly KF, Spring CM, Otchere AA, Daniel JM. NLS-dependent nuclear localization of p120ctn is necessary to relieve Kaiso-mediated transcriptional repression. *J Cell Sci.* 2004;117: 2675–2686.
245. Zhigalova NA, Zhenilo SV, Aithozhina DS, Prokhortchouk EB. Bifunctional role of the zinc finger domains of the methyl-DNA-binding protein Kaiso. *Mol Biol.* 2010;44: 233–244.
246. Korostina VS, Kulikov AV. Behavioral phenotyping of mice with the Kaiso knockout gene. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2016;6: 405–409.
247. Liang Y-C, Lee C-C, Yao Y-L, Lai C-C, Schmitz ML, Yang W-M. SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci Rep.* 2016;6: 26509.
248. Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368: 20110328.
249. Nefzger CM, Alaei S, Knaupp AS, Holmes ML, Polo JM. Cell Surface Marker Mediated Purification of iPS Cell Intermediates from a Reprogrammable Mouse Model. *Journal of Visualized Experiments.* 2014. doi:10.3791/51728
250. Wreczycka K, Godschan A, Yusuf D, Grüning B, Assenov Y, Akalin A. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *J Biotechnol.* 2017;261: 105–115.
251. Andrews S, Hersch J. Lexical precision in skilled readers: Individual differences in masked neighbor priming. *J Exp Psychol Gen.* 2010;139: 299–318.
252. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 2008;9: R137.

253. Krueger F, Andrews SR. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*. 2011;27: 1571–1572.
254. Song Q, Decato B, Hong EE, Zhou M, Fang F, Qu J, et al. A reference methylome database and analysis pipeline to facilitate integrative and comparative epigenomics. *PLoS One*. 2013;8: e81148.
255. Dixon G, Pan H, Yang D, Rosen BP, Jashari T, Verma N, et al. QSER1 protects DNA methylation valleys from de novo methylation. *Science*. 2021;372. doi:10.1126/science.abd0875
256. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011;17: 10–12.
257. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29: 15–21.
258. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2014;31: 166–169.
259. Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Müller F, Simmer F, Gu H, et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol*. 2010;28: 1106–1114.
260. Wang Z, Tong D, Han C, Zhao Z, Wang X, Jiang T, et al. Blockade of miR-3614 maturation by IGF2BP3 increases TRIM25 expression and promotes breast cancer cell proliferation. *EBioMedicine*. 2019;41: 357–369.
261. Artemov AV, Zhenilo S, Kaplun D, Starshin A, Sokolov A, Mazur AM, et al. An IDH-independent mechanism of DNA hypermethylation upon VHL inactivation in cancer. *bioRxiv*. 2020. p. 2020.12.09.418616. doi:10.1101/2020.12.09.418616
262. Ernst J, Kellis M. ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Methods*. 2012;9: 215–216.
263. Gao Z-J, Li W-P, Mao X-T, Huang T, Wang H-L, Li Y-N, et al. Single-nucleotide methylation specifically represses type I interferon in antiviral innate immunity. *J Exp Med*. 2021;218. doi:10.1084/jem.20201798
264. Kumari M, Wang X, Lantier L, Lyubetskaya A, Eguchi J, Kang S, et al. IRF3 promotes adipose inflammation and insulin resistance and represses browning. *J Clin Invest*. 2016;126: 2839–2854.
265. Martín-Vicente M, Medrano LM, Resino S, García-Sastre A, Martínez I. TRIM25 in the Regulation of the Antiviral Innate Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.01187

266. Nicetto D, Zaret KS. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Curr Opin Genet Dev.* 2019;55: 1–10.

267. Golebiewska A, Atkinson SP, Lako M, Armstrong L. Epigenetic landscaping during hESC differentiation to neural cells. *Stem Cells.* 2009;27: 1298–1308.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Выражаю глубокую благодарность кандидату физико-математических наук Женило Светлане Валерьевне, доктору биологических наук, Прохорчуку Егору Борисовичу и кандидату биологических наук Мазуру Александру Михайловичу за помощь, оказанную при работе над диссертацией, а также коллективу лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных Института Биоинженерии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» за рабочую атмосферу и научный дискурс.