

УДК 577.218

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОМАТИЧЕСКОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ПРИ НОКАУТЕ ГЕНА *Kaiso*

© 2019 Д.С. Каплун¹, Р.Э. Фок², В.С. Коростина³,
Е.Б. Прохорчук¹, С.В. Женило^{1*}

¹ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: zhenilo@biengi.ac.ru

² Институт медицинских исследований Израиль–Канада,
Медицинская школа Еврейского университета,
91120 Иерусалим, Израиль

³ ООО «Эбботт Лэбораториз», медицинский отдел,
125171 Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.11.2018

После доработки 27.11.2018

Принята к публикации 27.11.2018

Репрограммирование соматических клеток – процесс, связанный с преодолением установленного эпигенетического барьера. Ключевыми событиями в этом процессе являются изменения ландшафта метилирования ДНК и модификаций гистонов. Исследование факторов, влияющих на эпигенетическую пластичность, позволяет не только раскрыть принципы, лежащие в основе репрограммирования, но и найти возможные способы влияния на этот процесс. Транскрипционный фактор *Kaiso* является одним из белков-интерпретаторов метилированной ДНК. Связываясь с метилированной ДНК, *Kaiso* привлекает корепрессионные комплексы, влияющие на структуру хроматина. В данной работе было показано, что нокаут гена *Kaiso* способствует более эффективному соматическому репрограммированию, влияя как на пролиферацию клеток, так и на метилирование ДНК. Предполагаемой причиной увеличения эффективности соматического репрограммирования при нокауте гена *Kaiso* является снижение уровня метилирования в промоторной области *Oct4* в эмбриональных фибробластах мыши до начала репрограммирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Kaiso*, репрограммирование, метилирование ДНК, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

DOI: 10.1134/S0320972519030102

В 2006 г. японским ученым Shinya Yamanaka и его коллегами была открыта технология получения плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток с помощью экспрессии экзогенных транскрипционных факторов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* [1]. Во время репрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) происходят глобальные изменения в эпигенетических профилях, влияющих на структуру хроматина и приводящих к перезапуску экспрессии генов: подавляется транскрипция соматических генов, и активируются гены плюрипотентности. Несмотря на достигнутый прогресс в исследовании механизмов репрограммирования, до сих

Принятые сокращения: ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши, AP – щелочная фосфатаза, МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole), WT – диккий тип, KO – нокаут гена *Kaiso*.

* Адресат для корреспонденции.

пор остаются без ответа многие фундаментальные вопросы: каков молекулярный механизм репрограммирования, какие факторы вовлечены в этот процесс, почему не все клетки подвергаются репрограммированию. Ответы на эти вопросы не только позволят раскрыть молекулярный механизм репрограммирования клеток, но и будут способствовать безопасному применению данной технологии в терапии.

Одним из ключевых этапов репрограммирования соматических клеток является установление профиля метилирования ДНК, характерного для недифференцированного состояния [2]. Метилирование ДНК – важная эпигенетическая модификация в геноме высших эукариот. У позвоночных животных метилированию ДНК подвергается 60–80% CpG-динуклеотидов. Одним из механизмов регуляции транскрипции генов является привлечение к метилированной ДНК крупных белковых комплексов [3]. Метил-ДНК-связывающие белки взаимодействуют с метилированными участками ДНК либо с по-

мошьо метил-ДНК-связывающих доменов MBD (MBD-семейство белков: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3), либо с помощью домена «цинковые пальцы» (Kaiso-подобное семейство белков: Kaiso/ZBTB33, ZBTB4, ZBTB38). Такие белки выступают в качестве транскрипционных факторов самостоятельно или привлекают к регуляторным элементам генома различные гистоновые деацетилазы и корепрессорные белковые комплексы. Метил-ДНК-связывающие белки не только «читают» и «интерпретируют» эпигенетические сигналы, но и обеспечивают связь между метилированием ДНК и модификациями гистонов. Именно поэтому большое внимание уделяется роли метил-ДНК-связывающих белков в процессе репрограммирования соматических клеток.

Одним из неисследованных в этой области факторов является Kaiso, который относится к ВТВ/POZ-семейству метил-ДНК-связывающих белков. Он связывает метилированные CpG-динуклеотиды за счет C-концевого домена «цинковые пальцы» C2H2-типа. На N-конце белка Kaiso находится домен ВТВ/POZ, обладающий способностью к привлечению крупных репрессивных комплексов к метилированной ДНК, например, корепрессора NCoR в комплексе с гистоновой деацетилазой [4]. Помимо репрессивной активности, Kaiso может выступать и в роли активатора, что опосредуется его посттрансляционными модификациями [5]. В отсутствие Kaiso нарушается эмбриогенез у земноводных и рыб, однако нокаут гена *Kaiso* у мышей не приводит к ярко выраженным изменениям в фенотипе, и мыши развиваются здоровыми и фертильными [6]. Исследования в различных патогенетических модельных системах показали, что Kaiso вовлечен в развитие хронического воспаления и рака кишечника [6, 7].

Целью данной работы являлось исследование роли Kaiso в репрограммировании соматических клеток. Основная гипотеза, которая легла в основу работы, заключалась в нашем предположении, что в отсутствие Kaiso клетка проще идет по пути программирования, поскольку ослабляется механизм поддержания неактивного состояния генов/хроматина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Линии мышей. В работе использовали мышей дикого типа линии C57BL/6 и мышей линии C57BL/6 с нокаутом гена *Kaiso* (предоставлены виварием Института цитологии и генетики СО РАН); трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6, несущих доксициклин-индуцибельную кассету с факторами Яманаки (Sox2, c-Myc, Klf4, Oct4),

и трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6 с нокаутом гена *Kaiso* (предоставлены д.б.н. Томилиным А.С., Институт цитологии РАН).

Клеточные линии. Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) были получены из эмбрионов мышей на 13-й день развития, согласно протоколу Nefzger et al. [8]. МЭФ и клетки эмбриональной почки человека линии HEK293T (System Bioscience, LV900A-1) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, «Hyclone», США) и 1× пенициллина/стрептомицина. ИПСК культивировали в среде KnockOut DMEM с добавлением 5% FBS, квалифицированной для работы со стволовыми клетками, 10% SR (Serum Replacement; «Gibco», США), 1% MEM NEAA (100×, non-essential amino acids, «ThermoFisher», США), 1× пенициллина/стрептомицина, 1000 ед/мл LIF (leukemia inhibitory factor, «ThermoFisher», США), 50 мМ β-меркаптоэтанола и глутамакса.

Генотипирование эмбрионов мышей. ДНК выделяли из МЭФ фенол-хлороформовым методом, осаждали этанолом, растворяли в воде и использовали для генотипирования методом ПЦР по генам *Kaiso*, *Col* и наличию 4F2A-касеты. Последовательности праймеров представлены в таблице. Амплификацию проводили на приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США) при следующих условиях: 95 °С – 3 мин; 30 циклов: 95 °С – 30 с, 59 °С – 30 с; далее 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией ПЦР-продуктов в УФ-свете.

Получение лентивируса и трансдукция МЭФ. Лентивирус получали с помощью кальций-фосфатной трансфекции (Profection Mensal Transfection System; «Promega», США) клеток HEK293T вектором pHAGE-STEMCCA [9], который содержит доксициклин-индуцируемую кассету, позволяющую эквивалентно экспрессировать факторы Яманаки (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) при добавлении в среду доксициклина. Вирус осаждали 40%-ным ПЭГ, ресуспендировали в среде OptiMEM («ThermoFisher», США) и хранили при –70 °С. При трансдукции МЭФ лентивирусом в среду добавляли полибрен до концентрации 8 мкг/мл. Начиная со следующего дня, клетки культивировали в среде для ИПСК с добавлением доксициклина до конечной концентрации 2 мкг/мл. Эффективность трансдукции МЭФ определяли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания на Oct4 на следующий день после добавления доксициклина.

Получение ИПСК. МЭФ получали из эмбрионов на стадии E13 в соответствии с протоколом Nefzger et al. [8]. МЭФ из мышей дикого типа

Последовательности праймеров, использованных в работе

Мишень	Название праймера	Последовательность праймера (5'–3')
<i>Kaiso</i>	KaisoLS3For KaisoRev KaisoBTBRev	CAGCGCATCGCCTTCTATCG AGAAGGCTGATCTCCATTGGA AGGCTGAAAGGATGTTCTATG
<i>Col/4F2A</i>	Col frtA For Col frtB Rev Col 4F2A Rev	GCACAGCATTGCGGACATGC CCCTCCATGTGTGACCAAGG TTGCTCAGCGGTGCTGTCCA
<i>Nanog</i>	Nanog For Nanog Rev	ATTTATAGGGTTGGTGGGGCG TTTTGGGTGTGAGTATAGTTAT
<i>Oct4</i>	Oct4 For Oct4 Rev	TGGATATGGGTTGAAATATTGGG TCCTCTACCCCTACCTTAAAT

линии C57BL/6 и мышей линии C57BL/6 с нокаутом гена *Kaiso* трансдуцировали лентивирусом, содержащим доксициклин-индуцируемую кассету с факторами Яманак. Репрограммирование индуцировали добавлением доксициклина к трансдуцированным МЭФ или МЭФ, полученным из трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6 и трансгенных мышей линии 4F2A/C57BL/6 с нокаутом гена *Kaiso*. Эффективность формирования ИПСК оценивали по наличию колоний, окрашенных на щелочную фосфатазу (AP; «Merck», США) на 14-й день репрограммирования. Количество окрашенных колоний нормировали на эффективность трансдукции. Эффективность трансдукции определяли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания на Oct4 на 1-й день после добавления доксициклина к клеткам. Было сделано не менее трех биологических повторов.

Иммунофлуоресцентное окрашивание. Клетки культивировали на покровном стекле, промывали 1× PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде. Далее клетки промывали 3 раза PBS/глицином, инкубировали в течение 5 мин в 0,2%-ном Tween-20/PBS и еще раз промывали PBS/глицином 3 раза. Блокировку проводили в 0,3%-ном молоке/PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки инкубировали в блокирующем буфере с первичными антителами к Oct4 (ab19857; «Abcam», США), Sox2 (ab97959; «Abcam», США) и SSEA1 (ab16285; «Abcam», США) в течение ночи при 4 °C. После отмывки от первичных антител проводили связывание с флуоресцентно-меченными вторичными антителами Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit в течение 1 ч в блокирующем буфере. После отмывки от вторичных антител клетки окрашивали DAPI («ThermoFisher», США). Анализ иммунофлуоресценции проводили на микроскопе Eclipse Ti-S («Nikon», Япония).

Пролиферативный анализ клеток. МЭФ высевали в 96-луночные планшеты (1000–7000 клеток на лунку) и инкубировали в течение ночи. Пролиферативную активность клеток оценивали с помощью МТТ-анализа. МТТ (Thiazolyl Blue Tetra-zolium Bromide, 98%; «Sigma-Aldrich», США) вносили в каждую лунку (конечная концентрация 0,5 мг/мл) с последующей 3-часовой инкубацией. Затем среду отбирали и добавляли 50 мкл ДМСО. Оптическую плотность полученного МТТ-формазана, растворенного в ДМСО, измеряли при длине волны 540 нм на приборе iMark™ Microplate Absorbance Reader («Bio-Rad», США).

Таргетный бисульфитный анализ. ДНК выделяли из МЭФ фенол-хлороформовым методом, осаждали этанолом и растворяли в воде. Бисульфитную конвертацию проводили с помощью набора EZ DNA Methylation Kit («Zymo Research», США) согласно инструкции изготовителя. Конвертированную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР на приборе T100 Thermal Cycler («Bio-Rad», США). Последовательности праймеров приведены в таблице. Условия ПЦР: 95 °C – 3 мин; 35 циклов: 95 °C – 30 с, 59 °C – 1 мин и 72 °C – 1 мин; далее 72 °C – 10 мин. Продукты ПЦР очищали с помощью QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», США), а затем клонировали в вектор pTZ57R/T («Thermo Scientific», США) с помощью набора Ins TAclone PCR Cloning Kit («Thermo Scientific», США). Клоны анализировали секвенированием по Сэнгеру с праймера M13 на приборе 3730 DNA analyzer («Applied Biosystems», США).

Статистическая обработка результатов. Полученные в работе значения представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок. Анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA (GraphPad).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нокаут гена *Kaiso* повышает эффективность репрограммирования соматических клеток. Основной вопрос, который нас интересовал, состоял в том, влияет ли отсутствие белка *Kaiso* на определение судьбы клетки при репрограммировании. Мы использовали модельную систему получения ИПСК из эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ). МЭФ, полученные из мышей дикого типа и мышей, нокаутных по гену

Kaiso, трансдуцировали доксициклин-индуцируемой кассетой, содержащей факторы Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc). Окрашивание репрограммированных клеток на щелочную фосфатазу на 14-й день после добавления доксициклина выявило 2-кратное увеличение количества AP-положительных колоний в клетках, нокаутных по гену *Kaiso*, по сравнению с клетками дикого типа (рис. 1, а). Увеличение эффективности репрограммирования клеток с нокаутом гена *Kaiso*, полученных путем заражения лентивиру-

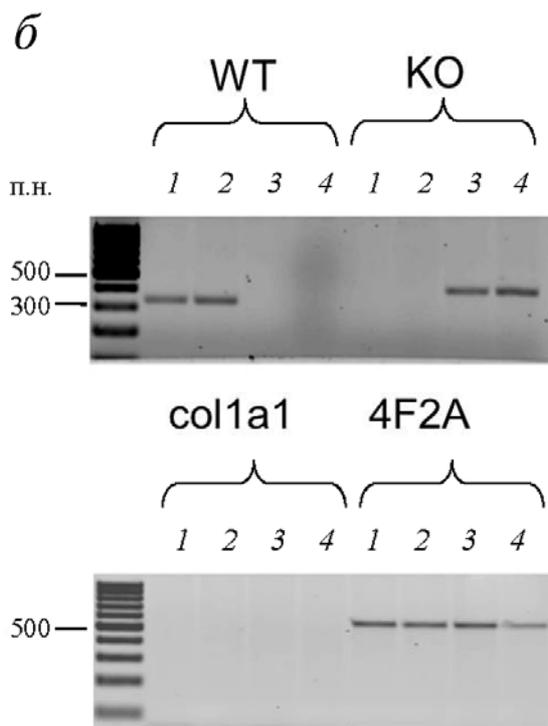
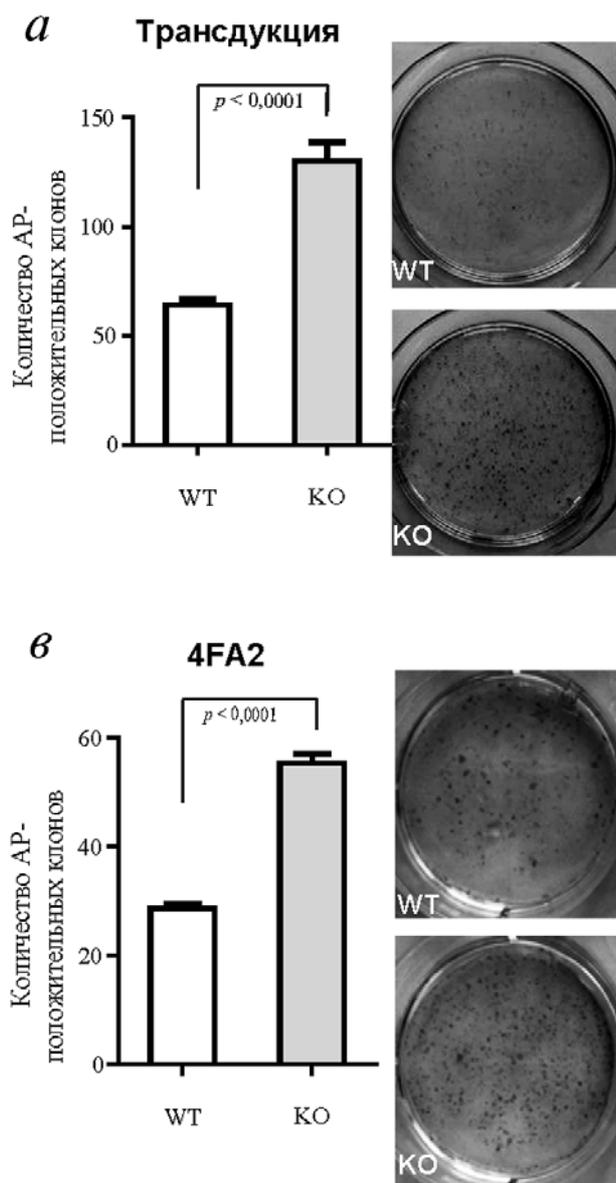


Рис. 1. Нокаут гена *Kaiso* приводит к увеличению эффективности репрограммирования МЭФ. Колонии ИПСК окрашены на щелочную фосфатазу (AP) на 14-й день репрограммирования клеток, зараженных лентивирусом (а), и клеток на основе модельной системы 4F2A (б); приведены данные обсчета колоний в четырех повторах и фотографии чашек Петри с клетками, окрашенными на AP (а, б); б – результаты генотипирования по наличию доксициклин-индуцибельной кассеты и гена *Kaiso* у эмбрионов линии мышей 4F2A дикого типа (1, 2) и мышей, нокаутных по гену *Kaiso* (3, 4); col1a1 – locus, в который вставлена 4F2A-кассета

сом, было подтверждено в экспериментах на генетической модели мышей со встроенной в геном доксициклин-индуцибельной кассетой (4F2A) с четырьмя факторами Яманаки (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) (рис. 1, б). Статус плюрипотентности полученных клонов был подтвержден иммунофлуоресцентным окрашиванием на маркеры *Oct4*, *Nanog*, *SSEA1* и *SOX2* (рис. 2). Таким образом, было доказано, что белок *Kaiso* участвует в молекулярной сети во время репрограммирования, что приводит к повышению эффективности этого процесса.

Влияние *Kaiso* на раннюю стадию репрограммирования у МЭФ. В ходе экспериментов было выявлено, что нокаут гена *Kaiso* способствует не только увеличению количества образовавшихся ИПСК-подобных колоний, но и уменьшению времени, необходимого для их формирования, по сравнению с ИПСК дикого типа.

Было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на 3-й и 8-й дни репрограммирования. Уже на 3-й день репрограммирования детектировалось большее количество *Oct4*-положительных клеток в пределах одной коло-

нии в нокаутных клетках по сравнению с клетками дикого типа (рис. 3, а). Мы предположили, что одной из причин более активного формирования клонов может выступать измененная пролиферативная активность клеток с делецией гена *Kaiso*. При помощи МТТ-анализа было выявлено, что нокаут гена *Kaiso* приводит к значительному увеличению пролиферативной активности МЭФ (рис. 3, б).

***Kaiso* может оказывать влияние на метилирование промотора фактора плюрипотентности *Oct4*.** Учитывая, что изменения в метилировании ДНК являются скоростью-лимитирующим процессом при репрограммировании [10], мы предположили, что клетки с нокаутом гена *Kaiso* могут иметь модифицированный ландшафт метилирования ДНК в фибробластах, способствующий более эффективному репрограммированию. Для доказательства данного утверждения был проведен таргетный бисульфитный анализ статуса метилирования промоторов генов *Oct4* и *Nanog* в МЭФ дикого типа и в клетках, нокаутных по гену *Kaiso*. Промоторы генов *Oct4* и *Nanog* активно деметилируются при репрограм-

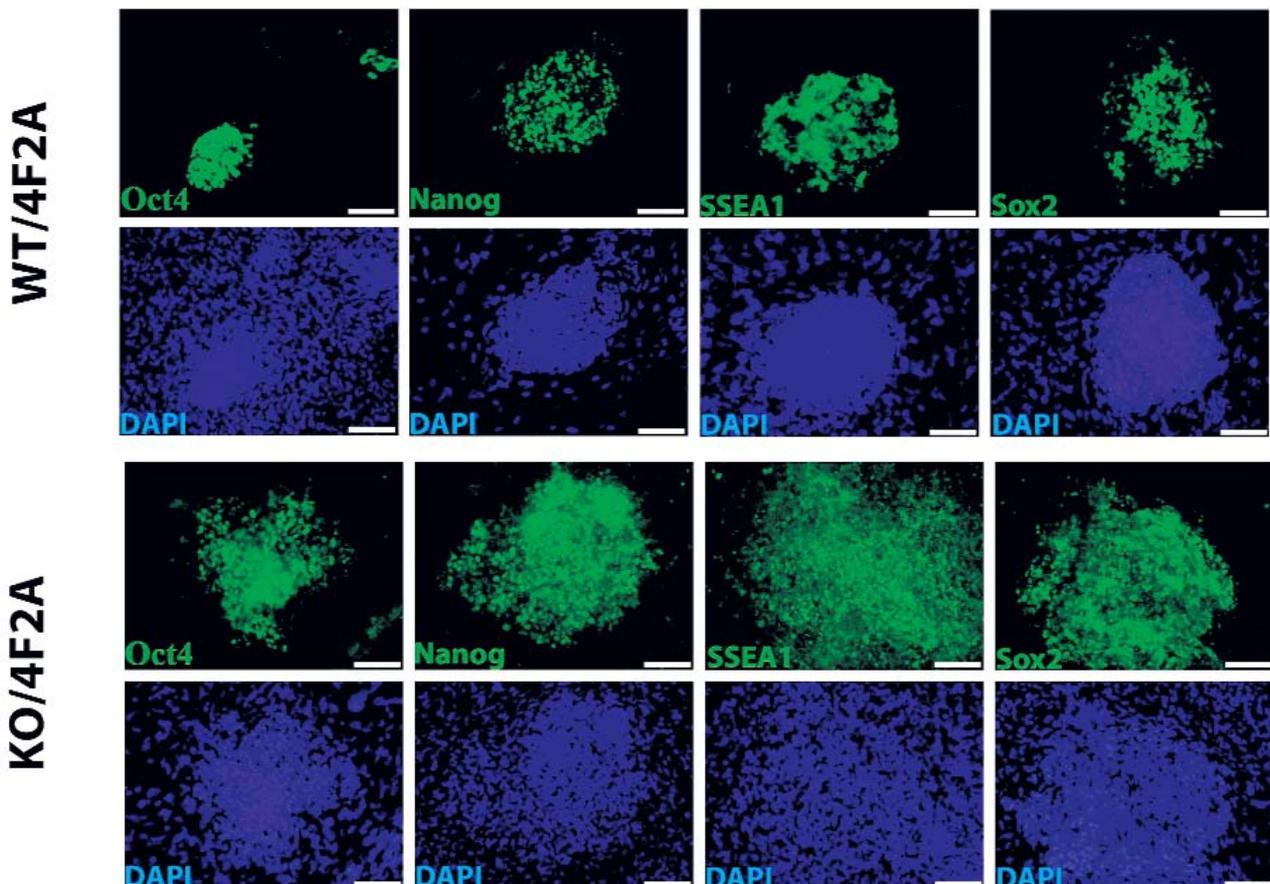


Рис. 2. Колонии ИПСК экспрессируют основные факторы плюрипотентности. Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры *Oct4*, *Sox2*, *SSEA1* и *Nanog*. Ядра окрашены DAPI.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

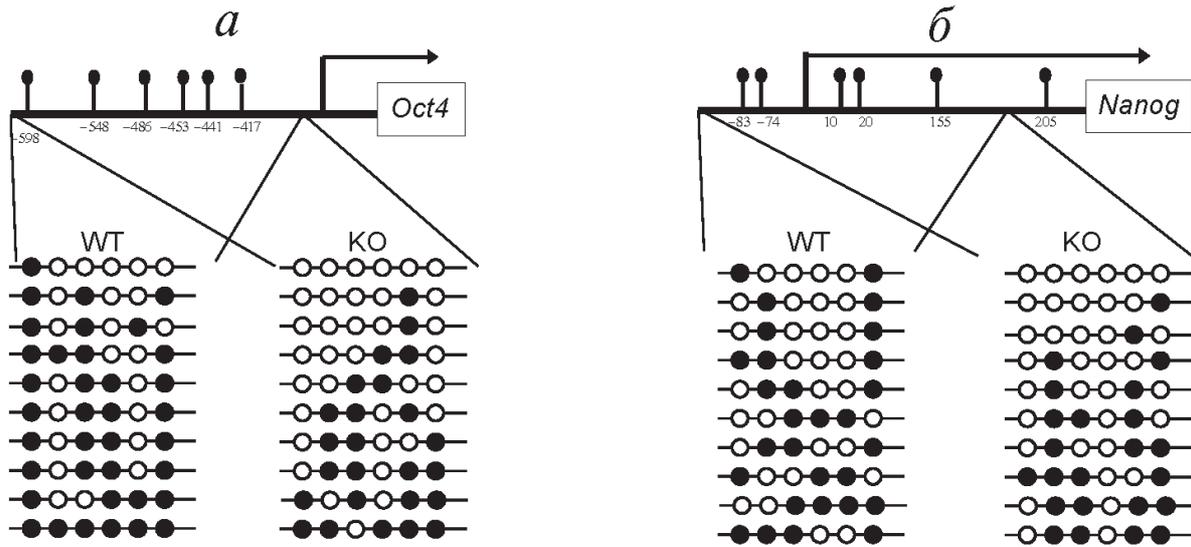


Рис. 4. Метилирование промоторного участка гена *Oct4* в МЭФ снижается при нокауте гена *Kaiso*. Схематическое представление бисульфитного анализа промоторной области *Oct4* (а) и *Nanog* (б). Черные кружки обозначают метилированный цитозин в составе CpG-динуклеотида, незакрашенные кружки – неметилированный цитозин

ками дикого типа, в то время как метилирование промотора гена *Nanog* статистически значимо не изменялось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При репрограммировании клеток происходит подавление транскрипции тканеспецифических генов и реактивация генов плюрипотентности. Репрограммирование сопряжено с изменениями эпигенетических модификаций: структуры хроматина и метилирования ДНК. Ключевая роль эпигенетических модификаций в процессе репрограммирования подтверждается экспериментами по обработке клеток как ингибиторами гистондеацетилаз (вальпроевой кислотой и бутиратом), так и ингибитором ДНК-метилтрансфераз 5-аза-2'-цитидином [11]. Применение этих ингибиторов во время соматического репрограммирования приводит к более эффективному переходу клеток из дифференцированного состояния в ИПСК. В данной работе было показано, что метил-ДНК-связывающий белок *Kaiso* влияет на эффективность репрограммирования МЭФ. Нокаут гена *Kaiso* привел к ускоренному и более эффективному репрограммированию. Аналогичная картина наблюдалась при нокауте гена, кодирующего другой метил-ДНК-связывающий белок *MeCP2*. Отсутствие *MeCP2* приводило к повышению пролиферативной активности клеток за счет увеличения экспрессии рибосомальных генов [12].

Неизвестно, вызвано ли влияние *Kaiso* на процессы репрограммирования изменением в экспрессии рибосомальных генов, но у клеток, нокаутных по гену *Kaiso*, пролиферативная активность была выше, чем у клеток дикого типа. Необходимо также отметить, что *Kaiso* может связываться с теми же метилированными последовательностями ДНК, что и один из факторов Яманаки *Klf4* [13, 14]. Фактор *Klf4*, связываясь с метилированной ДНК, может привлекать диоксигеназу TET2, что приводит к деметилированию ДНК [15]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, *Klf4* и *Kaiso* не просто взаимодействуют с одними и теми же последовательностями, но и образуют структурно идентичный комплекс «цинковые пальцы–ДНК» [14]. Это позволяет предположить, что *Kaiso* и *Klf4* могут конкурировать за связывание с метилированной ДНК. В отсутствие *Kaiso* *Klf4* проще связаться с регуляторными элементами генов-мишеней. Данный факт может объяснить более эффективное репрограммирование клеток, нокаутных по гену *Kaiso*. Ранее было показано, что *Kaiso* может влиять на модификации гистонов за счет посттрансляционных модификаций [5]. Остался открытым вопрос, способен ли *Kaiso* оказывать воздействие на метилирование ДНК. Ранее при исследовании регуляторных элементов генов-мишеней *Kaiso*, не связанных с поддержанием плюрипотентности, не удавалось детектировать изменение уровня их метилирования [16]. В данной работе впервые удалось показать снижение уровня метилирования участка в

промоторной области гена плюрипотентности *Oct4* при нокауте гена *Kaiso*. Результаты данной работы подчеркивают актуальность исследования уровня метилирования ДНК в полногеномном масштабе при нокауте гена *Kaiso* и проведения корреляционного анализа с участками связывания Klf4. Мы предполагаем, что отсутствие белка Kaiso влияет на характер метилирования генома таким образом, что количество CpG-динуклеотидов, состояние которых необходимо изменить для преодоления эпигенетического барьера, уменьшается.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания № 01201371085 ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н. Томилину А.Н. за предоставление 4F2A-животных с доксициклин-индуцируемой кассетой с факторами Яманаки и вектора рHAGE-STEMССА и д.б.н. Лагарьковой М.А. за предоставление векторов для вирусной инфекции клеток, а также консультации и помощь в налаживании работы с ИПСК.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663–676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
2. Lee, D.S., Shin, J.Y., Tonge, P.D., Puri, M.C., Lee, S., Park, H., Lee, W.C., Hussein, S.M., Bleazard, T., Yun, J.Y., Kim, J., Li, M., Cloonan, N., Wood, D., Clancy, J.L., Mosbergen, R., Yi, J.H., Yang, K.S., Kim, H., Rhee, H., Wells, C.A., Preiss, T., Grimmond, S.M., Rogers, I.M., Nagy, A., and Seo, J.S. (2014) An epigenomic roadmap to induced pluripotency reveals DNA methylation as a reprogramming modulator, *Nat. Commun.*, **5**, 5619, doi: 10.1038/ncomms6619.
3. Defossez, P.A., and Stancheva, I. (2011) Biological functions of methyl-CpG-binding proteins, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **101**, 377–398, doi: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00012-3.
4. Yoon, H.G., Chan, D.W., Reynolds, A.B., Qin, J., and Wong, J. (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso, *Mol. Cell*, **12**, 723–734, doi: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.008.
5. Zhenilo, S., Deyev, I., Litvinova, E., Zhigalova, N., Kaplun, D., Sokolov, A., Mazur, A., and Prokhortchouk, E. (2018) DeSUMOylation switches Kaiso from activator to repressor upon hyperosmotic stress, *Cell Death Differ.*, **25**, 1938–1951, doi: 10.1038/s41418-018-0078-7.
6. Prokhortchouk, A., Sansom, O., Selfridge, J., Caballero, I.M., Salozhin, S., Aithozhina, D., Cerchiatti, L., Meng, F.G., Augenlicht, L.H., Mariadason, J.M., Hendrich, B., Melnick, A., Prokhortchouk, E., Clarke, A., and Bird, A. (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 199–208, doi: 10.1128/MCB.26.1.199-208.2006.
7. Pierre, C.C., Longo, J., Mavor, M., Milosavljevic, S.B., Chaudhary, R., Gilbreath, E., Yates, C., and Daniel, J.M. (2015) Kaiso overexpression promotes intestinal inflammation and potentiates intestinal tumorigenesis in *Apc^{Min/+}* mice, *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 1846–1855, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.06.011.
8. Nefzger, C.M., Alaei, S., Knaupp, A.S., Holmes, M.L., and Polo, J.M. (2014) Cell surface marker mediated purification of iPS cell intermediates from a reprogrammable mouse model, *J. Vis. Exp.*, **6**, e51728, doi: 10.3791/51728.
9. Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette, *Stem Cells*, **27**, 543–559, doi: 10.1634/stemcells.2008-1075.
10. Papp, B., and Plath, K. (2013) Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency, *Cell*, **152**, 1324–1343, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.043.
11. Kretsovali, A., Hadjimichael, C., and Charmpilas, N. (2012) Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming, *Stem Cells Int.*, **2012**, 184154, doi: 10.1155/2012/184154.
12. Zhang, W., Feng, G., Wang, L., Teng, F., Wang, L., Li, W., Zhang, Y., and Zhou, Q. (2018) MeCP2 deficiency promotes cell reprogramming by stimulating IGF1/AKT/mTOR signaling and activating ribosomal protein-mediated cell cycle gene translation, *J. Mol. Cell Biol.*, **10**, 515–526, doi: 10.1093/jmcb/mjy018.
13. Spruijt, C.G., Gnerlich, F., Smits, A.H., Pfaffeneder, T., Jansen, P.W., Bauer, C., Munzel, M., Wagner, M., Muller, M., Khan, F., Eberl, H.C., Mensinga, A., Brinkman, A.B., Lephikov, K., Muller, U., Walter, J., Boelens, R., van Ingen, H., Leonhardt, H., Carell, T., and Vermeulen, M. (2013) Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives, *Cell*, **152**, 1146–1159, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.004.
14. Liu, Y., Olanrewaju, Y.O., Zheng, Y., Hashimoto, H., Blumenthal, R.M., Zhang, X., and Cheng, X. (2014) Structural basis for Klf4 recognition of methylated DNA, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4859–4867, doi: 10.1093/nar/gku134.
15. Sardina, J.L., Collombet, S., Tian, T.V., Gomez, A., Di Stefano, B., Berenguer, C., Brumbaugh, J., Stadhouders, R., Segura-Morales, C., Gut, M., Gut, I.G., Heath, S., Aranda, S., Di Croce, L., Hochedlinger, K., Thieffry, D., and Graf, T. (2018) Transcription factors drive Tet2-mediated enhancer demethylation to reprogram cell fate, *Cell Stem Cell*, **23**, P727–741.E9, doi: 10.1016/j.stem.2018.08.016.
16. Жигалова Н.А., Соколов А.С., Прохорчук Е.Б., Женило С.В. (2015) S100A3 – новый ген-мишень белка Kaiso в коже млекопитающих, *Мол. биология*, **49**, 362–365, doi: 10.1134/S002689331502017X.

INCREASED EFFICIENCY OF SOMATIC REPROGRAMMING IN *Kaiso* KNOCKOUT CELLS

D. S. Kaplun¹, R. E. Fok², V. S. Korostina³,
E. B. Prokhortchouk¹, and S. V. Zhenilo^{1*}

¹ *Federal Research Centre Fundamentals of Biotechnology,
Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia;
E-mail: zhenilo@biengi.ac.ru*

² *Department of Developmental Biology and Cancer Research,
Institute of Medical Research Israel–Canada, Jewish Medical
School University, 91120 Jerusalem, Israel*

³ *Abbott Laboratories LLC, 125171 Moscow, Russia*

Received November 9, 2018

Revised November 27, 2018

Accepted November 27, 2018

Cell somatic reprogramming is accompanied by overcoming an established epigenetic barrier. Key events in this process – changes in the landscape of DNA methylation and histone marks. Study of factors affecting epigenetic plasticity enables us to reveal the principles underlying the reprogramming and to find opportunities to influence this process. Transcription factor *Kaiso* is a protein-interpreter of methylated DNA. *Kaiso*, bound to methylated DNA, attracts corepressors that affect chromatin structure. In this work, it was shown that *Kaiso* gene knockout contributes to more efficient somatic reprogramming, affecting both cell proliferation and DNA methylation. Assumed reason for the increased efficiency of somatic reprogramming in *Kaiso* knockout cells is a decline in the methylation level in the promoter region of *Oct4* in mouse embryonic fibroblasts before the beginning of reprogramming.

Keywords: *Kaiso*, reprogramming, DNA methylation, induced pluripotent stem cells