

На правах рукописи

Павлова Юлия Ивановна

**G-квадруплексы суперэнхансеров и приграничных
участков хроматиновых доменов как регуляторы
транскрипции**

1.5.3 – Молекулярная биология

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

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель

Варижук Анна Михайловна, доктор химических наук, заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

Официальные оппоненты:

Шидловский Юлий Валерьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии ИБГ РАН

Завьялова Елена Геннадиевна, доктор химических наук, доцент кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится « » _____ 2025 г.
на заседании диссертационного совета 68.1.015.01 на базе ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России по адресу: 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а

С диссертацией можно ознакомиться по адресу: 119435, Москва, Малая Пироговская, д. 1а в отделе аспирантуры ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (к.131) и на сайте www.gcrsm.ru

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Михальчик Е. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Участие G-квадруплексов (G4) в контроле транскрипции протоонкогенов общепризнанно, и разработка противоопухолевых средств на основе G4-лигандов ведется несколько десятилетий с умеренным успехом. Два лиганда проходят клинические испытания в настоящее время. При этом в качестве мишеней рассматриваются исключительно промоторные G4, привлекающие активирующие транскрипционные факторы. Такой подход правомерен, но ограничен. По мере совершенствования методов картирования G4 становится очевидно, что помимо промоторов они обогащены в других цис-регуляторных элементах генома. Большая часть из них совпадает с границами хроматиновых петель (горячими точками хромосомных контактов) в активных транскрипционных доменах.

Хромосомные контакты в активном хроматине соответствуют взаимодействиям энхансер-промотор. Они включают ближние и дальние взаимодействия – следствие экструзии ДНК через когезин, ограниченной конвергентными сайтами позиционирования CCCTC-связывающего белка-инсулятора (CTCF). Среди энхансеров выделяются наиболее протяженные, богатые сайтами связывания транскрипционных факторов и маркированные бромодоменсодержащим белком BRD4. Они получили название суперэнхансеров (SE) и имеют две отличительные особенности. Первая – механизм аккумуляции транскрипционных факторов, основанный на эффекте разделения фаз «жидкость-жидкость» при участии BRD4.

Вторая особенность SE – способность контактировать одновременно с несколькими промоторами, что обуславливает их доминирующий вклад в активацию транскрипции. Границы областей, в пределах которых возможны контакты энхансер-промотор, маркированы кластерами CTCF.

На момент начала диссертационного исследования были опубликованы данные по обогащению G4 в сайтах позиционирования CTCF, содержащих или не содержащих консенсусный CCCTC-богатый мотив связывания (Hou et al. *Epigenetics* 2019). Поскольку помимо наличия этого мотива вероятность привлечения CTCF зависит от локальной нуклеосомной плотности и CpG-метилирования, наблюдаемую колокализацию CTCF с G4 объясняли ингибиторным действием G4 на работу ДНК-метилтрансферазы и нуклеосомную сборку. Впоследствии гипотеза о роли метилирования не подтвердилась, а влияние G4 на нуклеосомную укладку требовало экспериментальной проверки.

В то же время появились прямые свидетельства роли G4 в привлечении CTCF и перераспределения областей контактов энхансер-промотор вокруг сайта инсерции G4, хотя механизмы оставались неясны (Roy et al. *Elife* 2024). Их прояснение было необходимо для дальнейшего развития перспективного направления 3D-геномики – контроля транскрипции за счет ремоделирования хроматина путем таргетирования неклассических вторичных структур ДНК. В частности, актуальными задачами были проверка непосредственного связывания G4-CTCF и влияния на него G4-лигандов, а также

прояснение альтернативных механизмов участия G4 в ремоделировании хроматина, связанных с нуклеосомной плотностью.

Также на момент начала диссертационного исследования в рамках магистерской работы диссертантом были получены данные по колокализации геномных G4 с BRD4, что указывало на их вероятную повышенную представленность и роль в активных SE. Колокализация G4 с BRD4 в областях с низкой нуклеосомной плотностью представлялась парадоксальной, поскольку консенсусный механизм позиционирования данного белка на хроматине предполагает узнавание им ацетилированных фрагментов гистонов. Учитывая значимость SE для активации транскрипции, установление функции SE G4 и влияния на них G4-лигандов представлялось существенным для прогнозирования эффектов этих лигандов.

Цель и задачи исследования. Целью работы было прояснение механизмов участия непромоторных G4 в регуляции транскрипции. Для достижения основной цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Сравнить сродство CTCF к геномным G4 и консенсусному мотиву связывания в рамках проверки гипотезы прямого участия G4 в формировании CTCF-зависимых хроматиновых петель и демаркации транскрипционных доменов.
2. Охарактеризовать влияние G4-лигандов на позиционирование CTCF в геноме в рамках уточнения механизмов действия этих лигандов.
3. Оценить влияние G4 во фланкирующем участке сайта позиционирования нуклеосомы на сборку и устойчивость

гистонового октамера в рамках прояснения ассоциации G4 с декомпактизацией хроматина.

4. Оценить представленность G4 в SE; сравнить сродство BRD4 к G4 и консенсусному сайту связывания в ацетилированных гистонах, а также разделение фаз в этих смесях для прояснения механизма удержания BRD4 в свободных от нуклеосом участках SE.
5. Охарактеризовать влияние G4-лигандов на связывание BRD4 с G4 и разделение фаз в растворах этих смесей, а также на экспрессию генов под контролем G4-богатых SE для уточнения механизмов действия лигандов.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость. Диссертационное исследование было направлено на углубление представлений о G4-опосредованной регуляции транскрипции с учетом предполагаемой роли G4 в декомпактизации хроматина, SE-зависимой активации транскрипции и демаркации транскрипционно активных хроматиновых доменов. Решение данной научной проблемы создает задел для совершенствования стратегий управления транскрипцией с помощью G4-лигандов в рамках противоопухолевой терапии, что определяет практическую значимость диссертационной работы. Новизна определяется тем, что в данной работе было уточнено влияние G4 на локальную нуклеосомную плотность; впервые показано взаимодействие G4 с маркером границ транскрипционных доменов (CTCF) и маркером SE (BRD4), а также охарактеризовано влияние G4-лигандов на эти взаимодействия.

Методология и методы исследования. В работе были использованы методы спектроскопии кругового дихроизма, флуориметрии, микромасштабного термофореза, электрофореза, поверхностного плазмонного резонанса, ЯМР-спектроскопии, атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии, иммунопреципитации хроматина и секвенирования, анализа выживаемости клеток, ПЦР, молекулярного моделирования, биоинформатического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

- G4 имеют высокое сродство к CTCF, и обработка клеток G4-лигандами PDS и PhenDC3 повышает частоту связывания CTCF с G4.
- G4 затрудняют сборку нуклеосом и дестабилизируют примыкающие к ним нуклеосомы, в том числе с ацетилированными гистонами.
- G4 в свободных от нуклеосом участках SE удерживают BRD4 и могут способствовать образованию конденсатов по механизму разделения фаз «жидкость-жидкость» *in vitro*.
- G4-лиганды PDS и SOP1812 ингибируют образование конденсатов G4-BRD4 *in vitro* и подавляют экспрессию генов под контролем G4-богатых SE.

Вклад автора. Автором лично или при непосредственном участии выполнено большинство экспериментов, включая получение данных методом спектроскопии кругового дихроизма, флуориметрии, микромасштабного термофореза, электрофореза, флуоресцентной микроскопии, иммунопреципитации хроматина, анализа выживаемости клеток, ПЦР, биоинформатического анализа.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных периодических изданиях. Основные положения диссертационной работы были представлены на следующих российских и международных конференциях: The International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 26-28 August 2021, Virtual forum; INTERACTION WINS, (Innovative ThERapeutiC Targets In nOn-canonical Nucleic acids structures Winter InterNational School 2021), 23-26 November 2021, Virtual winter school; Итоговая научно-практическая конференция, посвященная присвоению ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» имени академика РАН Ю. М. Лопухина, 21-22 декабря 2021 г, Москва; Научная конференция молодых ученых ФГБУ ФНКЦ ФБМА России, 20-21 апреля 2022 г, Москва; III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. 3-7 октября 2022 г, Сочи; III межвузовская студенческая конференция. Студенческий биохимический форум – 2023. 12–13 марта 2023 г, Москва; 65-я Всероссийская научная конференция МФТИ в честь 115-летия Л. Д. Ландау, 3–8 апреля 2023 г, Москва; Биокатализ – 2023. 13-ая Международная научная конференция. 25-29 июня 2023 г, Суздаль; Научная конференция молодых учёных ФБГУ ФНКЦ ФХМ им. М.Ю. Лопухина ФБМА России, 21-22 мая 2024 г, Москва.

Связь работы с государственными программами. В работе активно использовались методы анализа биоконденсатов, разработанные при непосредственном участии автора в рамках ГЗ Шаперон 17.002.24.800.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, полученных результатов и их обсуждения, описания материалов и методов исследования, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 261 источник. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 25 рисунков, 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. G4 как участники демаркации транскрипционных (суб)доменов за счет привлечения CTCF

В рамках работы над первой задачей были выполнены эксперименты по оценке аффинности CTCF к консенсусному дуплексному сайту связывания и геномным G4, подтвержденным данными иммунопреципитации хроматина и секвенирования (ChIP-seq) с квадруплекс-специфичным антителом BG4. Последовательности дуплекса и G4 были выбраны из приграничных участков топологически ассоциированных доменов (ТАД) хроматина и субдоменов. На Рисунке 1А для примера показаны приграничные участки, перекрывающиеся с генами *STAT3* (граница выражена слабо) и *MYC* (четко выраженная граница). В первом участке мажорный пик CTCF содержит консенсусный дуплексный мотив связывания и картированный методом G4-секвенирования потенциальный квадруплексный сайт (G4-seq+), но не содержит квадруплексных сайтов, подтвержденных методом ChIP-seq (BG4-). Во участке (BG4+) присутствует

подтвержденный G4 и отсутствует консенсусный дуплексный сайт связывания CTCF.

G4 и дуплексы получали в виде коротких олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН), вторичные структуры подтверждали методом спектроскопии кругового дихроизма (КД), сродство к CTCF оценивали методом микромасштабного термофореза (microscale thermophoresis, MST). Результаты приведены на Рисунке 1Б. Полученные константы диссоциации комплексов BRD4 с G4 и консенсусным дуплексом находились в наномолярном диапазоне концентраций. Используемые в качестве отрицательных контролей ОДН, образующие альтернативные неклассические вторичные структуры, не формировали комплексов с CTCF. Высокая аффинность CTCF к G4 говорит в пользу гипотезы прямого участия G4 в привлечении данного белка-инсулятора к границам хроматиновых петель и ТАДов.

Для определения вероятного способа связывания CTCF с G4 ведущим научным сотрудником Первого МГМУ им. И.М. Сеченова В.Б. Цветковым был выполнен молекулярный докинг с последующей проверкой устойчивости комплексов симуляцией молекулярной динамики (Рисунок 1В). Согласно данным моделирования, CTCF связывает G4 по бороздке, оставляя внешнюю тетраду открытой для взаимодействия с G4-лигандами. Можно ожидать, что взаимодействующие с внешней гуаниновой тетрадой лиганды (PDS, PhenDC3 и др.) не вытеснят CTCF из комплекса с G4, а, напротив, повысят его устойчивость за счет стабилизации G4.

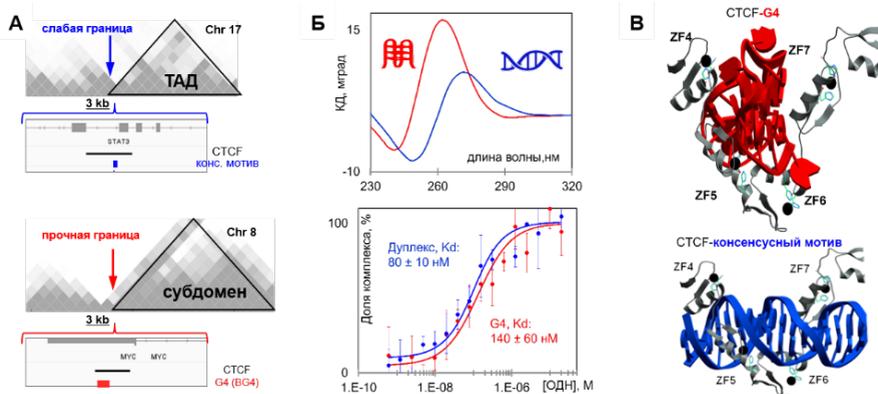


Рисунок 1 – Проверка сродства CTCF к G4 и консенсусному мотиву связывания из приграничных участков хроматиновых (суб)доменов.

(А) Примеры доменов в хромосомах 17 (координаты: 40,300,000-40,700,000, сборка генома: hg19) и 8 (координаты: 128,600,000-129,000,000, сборка генома: hg19) с приграничными кластерами CTCF в областях генов *STAT3* (chr17:40,473,500-40,476,500) с консенсусным мотивом связывания (синий) и G4-мотивами без подтвержденных G4 (верхняя панель) и *MYC* (chr8:128,746,836-128,749,835) без консенсусного дуплексного мотива, но с подтвержденным G4 (BG4) в клетках линии K-562. Последовательность консенсусного дуплекса из *STAT3*: CCACCAGGGGGCAGT. Последовательность подтвержденного G4 из *MYC*: TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG. (Б) Спектры КД G4-ОДН и консенсусного дуплекса (верхняя панель, условия: 1 мкМ растворы в псевдофизиологическом буфере) и кривые связывания с CTCF, полученные методом MST (нижняя панель). (В) Результаты молекулярного моделирования комплексов CTCF с G4 и консенсусным дуплексом (получено В.Б. Цветковым).

Для проверки этой гипотезы, в рамках работы над второй задачей, была проведена иммунопреципитация хроматина (ChIP) клеток K-562 с антителами к CTCF после 48-часовой инкубацией с лигандами PDS или PhenDC3, с последующим секвенированием или количественной ПЦР (кПЦР). По данным ChIP-seq (Рисунок 2А), после обработки PDS существенно возрастала частота колокализации CTCF с потенциальными G4, картированными методом G4-seq. Однако, при

этом практически не менялась частота колокализации с G4, подтвержденными методом ChIP-seq с антителами BG4. Вероятно, чувствительность таких G4 к лиганду не проявляется ввиду их изначальной стабильности. Аналогично, по данным ChIP с кПЦР (Рисунок 2Б), обработка лигандом не влияла на количество CTCF в локусах без G4 или на стабильных G4 (BG4+, пример – G4 из гена *MYC*, а на нестабильных G4 (BG4-, пример – G4 из гена *STAT3*) количество CTCF значительно возрастало после обработки обоими G4-стабилизирующими лигандами (Рисунок 2В).

Из полученных результатов следует, что G4-лиганды способны повышать локальную плотность белка-инсулятора, т.е. укреплять границы ТАДов и хроматиновых петель, на которых содержатся G4-мотив с потенциалом к стабилизации. Этот результат согласуется с недавно опубликованными данными других групп (Wulfridge et al. Mol. Cell 2023), включая свидетельства появления границы хроматиновой петли после инсерции G4 (Roy et al. Elife 2024).

Примечательно, что G4 в сайтах позиционирования CTCF часто соседствуют с искаженными дуплексными мотивами связывания. В этой связи нельзя исключать вклад дополнительных, альтернативных механизмов, при которых G4 играют вспомогательную роль в привлечении CTCF, облегчая узнавание им консенсусной дуплексной последовательности, например, за счет локального снижения нуклеосомной плотности. На момент начала работы над диссертацией был известен взаимоисключающий характер G4 и гистоновых октамеров: непосредственно в нуклеосомной ДНК устойчивые G4 отсутствуют, а стабилизация неустойчивых препятствует сборке

нуклеосомы. Однако, эффекты G4 в линкерной (межнуклеосомной) ДНК оставались открытым вопросом. Они были проанализированы в рамках задачи 3 во второй части работы и представляют интерес в свете гипотезы «G4 освобождают ДНК-фланки для узнавания сиквенс-специфичными белковыми факторами».

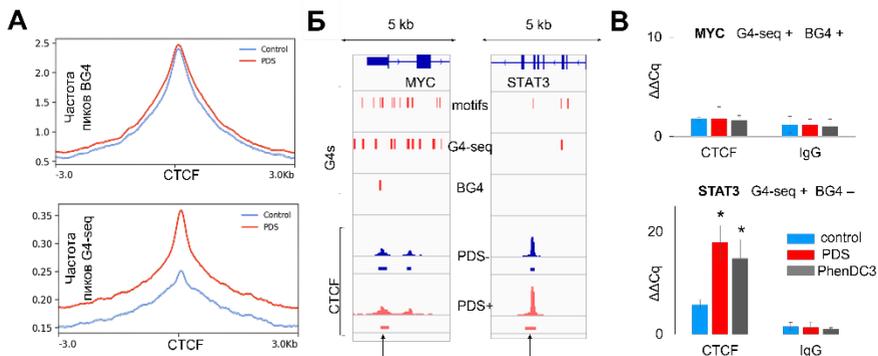


Рисунок 2 – Анализ влияния G4-лигандов на частоту связывания CTCF в сайтах с потенциальными (G4-seq+) и подтвержденными (BG4+) G4 в клетках линии K-562. **(А)** Результаты ChIP-seq с антителом к CTCF, полученные на клетках, обработанных и не обработанных G4-лигандом (PDS), и интерпретация данных ChIP-seq. **(Б)** Области генов *MYC* и *STAT3*, пики G4-seq, G4 ChIP-seq (BG4); пики CTCF в клетках, обработанных и необработанных PDS. Черные стрелки обозначают сайты, в которых частота позиционирования CTCF была дополнительно проверена методом ChIP с кПЦР. **(В)** Результаты ChIP с кПЦР. Гистограммы иллюстрируют обогащение CTCF на G4 в *MYC* и *STAT3*, нормализованное на уровень CTCF в контрольном участке без G4 (в области гена *USP24*), в необработанных клетках K-562 (синий), и клетках, обработанных PDS (красный) или PhenDC3 (серый).

2. G4 как фактор поддержания низкой нуклеосомной плотности

Для исследования влияния G4 на сборку гистонового октамера *in vitro* были собраны две моонуклеосомные модели. Обе включали консенсусный сайт позиционирования гистонового октамера и фланкирующий его дуплекс – модель линкерной ДНК (Рисунок 3А). В первой конструкции фланкирующий дуплекс включал G4-мотив, во второй он был без G4 (отрицательный контроль). Формирование G4 в составе дуплекса, фланкирующего сайт позиционирования нуклеосомы, подтверждали оптическими методами (КД-спектроскопия и флуориметрия с G4-специфичным зондом ThT).

Сборка нуклеосомы на контрольной ДНК-конструкции и конструкции с G4 проводилась с использованием рекомбинантных гистонов методом последовательных разбавлений. Корректность сборки подтверждали с помощью неденатурирующего электрофореза в 6% полиакриламидном геле. Электрофоретическая подвижность ДНК-матрицы с корректно собранным гистоновым октамером соответствует подвижности ДНК-фрагмента длиной 700 п.о. (Рисунок 3Б). Было показано, что выход нуклеосомы на G4-содержащей ДНК ниже, чем на ДНК без G4 (Рисунок 3Б, справа).

Аналогично был получен ацетилованный вариант гистонового октамера (с заменой гистона H3 на ацетилованный вариант H3K18ac) для изучения влияния G4 на ацетилованную нуклеосому. Доля корректно собранной нуклеосомы на G4-содержащей матрице была меньше и в этом случае. Кроме того, было установлено, что нуклеосома с G4 в линкерной ДНК диссоциирует на третьи сутки, в то время как

гистоновый октамер на контрольной конструкции остается частично собранным (Рисунок 3Б, средняя панель).

Сборку нуклеосом дополнительно подтверждали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Корректно собранные нуклеосомы были визуализированы как сферические объекты диаметром около 4 нм с выступающей «линкерной» ДНК (Рисунок 3В). Доля таких объектов, собранных на контрольной матрице, была значительно выше, чем на G4-содержащей, что согласуется с данными электрофореза и подтверждает способность G4 затруднять сборку нуклеосом.

Таким образом, было доказано исключение нуклеосом с фланирующих G4 сайтов. При наличии искаженных мотивов связывания CTCF вблизи G4 освобождение от нуклеосом может упростить позиционирование CTCF, что дополняет данные первой части исследования. С другой стороны, способность G4 исключать ацетилированные нуклеосомы, привлекающие BRD4 и характерные для суперэнхансеров (SE), подталкивает нас к выяснению последствий исключения этих нуклеосом для транскрипции, зависящей от SE. Этому была посвящена третья часть исследования.

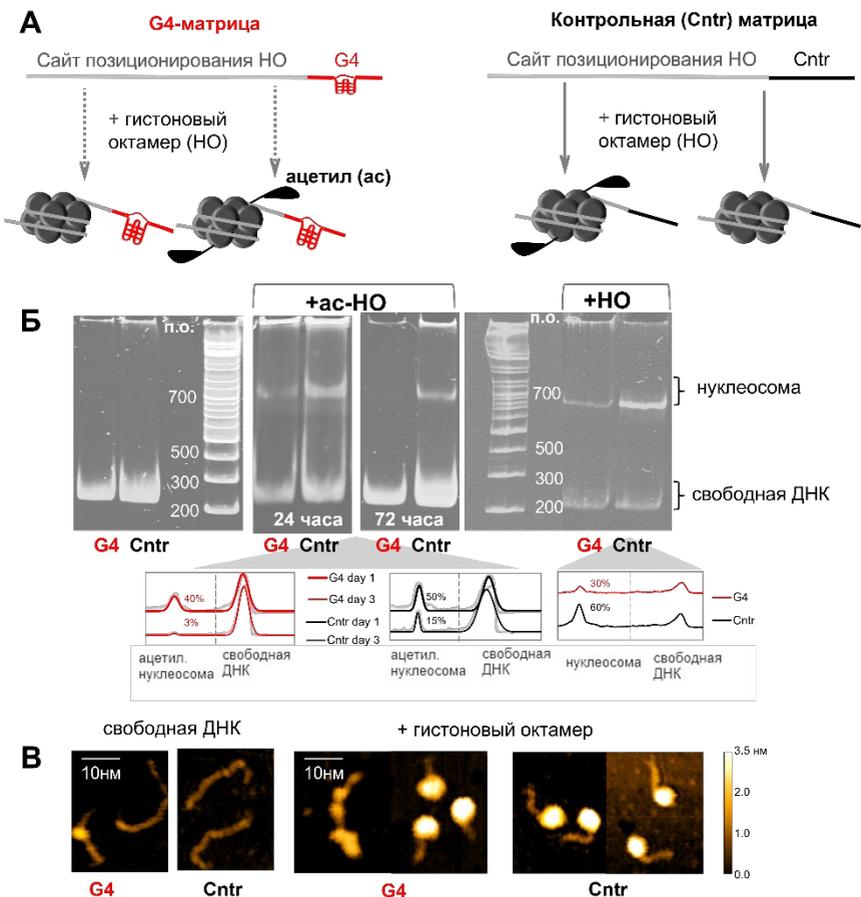


Рисунок 3 – Сборка мононуклеосомной конструкции с G4/без G4 в линкерной ДНК. (А) Общая схема конструкций. (Б) Электрофоретический анализ относительной эффективности сборки ацетилированного и неацетилированного гистоновых октамеров (ас-НО, НО) на ДНК-конструкции с G4 и контрольной ДНК без G4. (В) АСМ-изображения нуклеосом на G4-содержащей и контрольной ДНК. АСМ-изображения получены Н. А. Бариновым в лаборатории Д. В. Клинова.

3. G4 суперэнхансеров как регуляторы транскрипции в областях с низкой нуклеосомной плотностью

В рамках работы над четвертой задачей для проверки обогащения G4 в SE из открытых баз данных были получены координаты SE двух клеточных линий, а также координаты потенциальных G4, картированных методом G4-seq, и G4 с подтвержденным фолдингом, картированных методом ChIP-seq с антителами BG4. С целью проведения пермутационного теста для каждого набора G4 было сгенерировано 20 наборов контрольных (случайных) интервалов той же длины, отобранных по всему геному. Далее частота попадания G4 в SE сравнивалась с частотой попадания контрольных интервалов. В итоге было показано, что SE значимо обогащены G4, и степень обогащения возрастает при переходе от сайтов G4-seq к подтвержденным G4-сайтам (Рисунок 4).

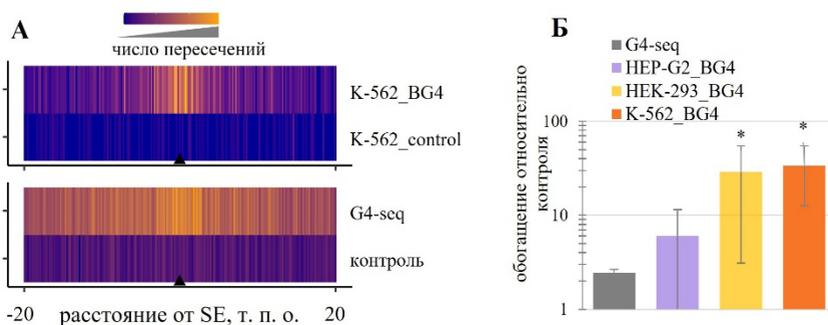


Рисунок 4 – Полногеномный анализ G4 в SE. (А) Распределение G4-сайтов относительно SE на примере клеточной линии K-562. Каждый набор G4 сравнивали с контрольным набором случайно выбранных сайтов того же размера и средней длины. (Б) Обобщение результатов пермутационного теста для трех клеточных линий. * - значимое отличие от G4-seq ($p < 0.01$).

Далее все SE клеточной линии K-562 были ранжированы по частоте пиков G4, и SE из верхнего квартиля были отнесены к G4-богатым. Затем на основании доступных данных DNase-seq и BRD4-ChIP-seq был выполнен сравнительный анализ частоты BRD4-пиков и нуклеосомной плотности в G4-богатых SE и SE без G4. Было показано, что G4-богатые SE имеют больше областей низкой нуклеосомной плотности (Рисунок 5А), что согласуется с *in vitro* экспериментами второй части данной работы. При этом количество BRD4 на двух группах SE оказалось сравнимым (Рисунок 5Б), что указывает на сохранение BRD4 в G4-богатых участках в отсутствие ацетилированных нуклеосом и может объясняться взаимодействиями BRD4 с G4.

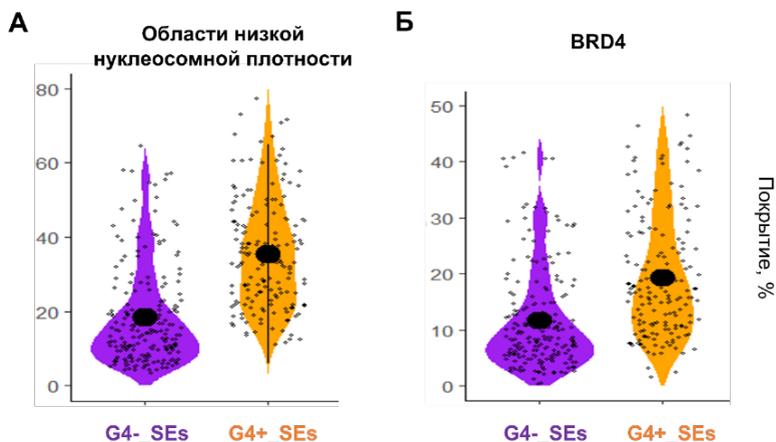


Рисунок 5 – Сравнительный анализ SE без G4 и G4-богатых SE в K-562. Показана относительная частота (покрытие) областей низкой нуклеосомной плотности (А), и сайтов, занятых BRD4 (Б).

Способность G4 привлекать BRD4 проверялась несколькими независимыми методами. Для примера на Рисунке 6А показаны

кинетические кривые, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). В качестве положительного контроля использовался ацетилированный пептид – фрагмент гистона H3K18ac. Связывание BRD4 с G4, обогащенным в SE ($K_d=5\pm 2\text{ мкМ}$), оказалось сравнимо со связыванием с ацетилированным пептидом ($K_d=3\pm 2\text{ мкМ}$).

Для определения способа связывания BRD4 с G4 и ацетилированным пептидом – фрагментом H3K18ac – Цветковым В.Б. было выполнено молекулярное моделирование (Рисунок 6Б). Было показано, что сайт связывания G4 смещен относительно консенсусного сайта связывания ацетилированного пептида, ацетилированных гистонов и их конкурентов – известных противоопухолевых ингибиторов BRD4. Из этого следует, что такие ингибиторы BRD4 не должны влиять на взаимодействие BRD4-G4. Кроме того, было показано, что связывание BRD4 с G4 происходит по внешней гуаниновой тетраде. Та же тетрада отвечает за взаимодействие с G4-лигандами, поэтому для G4-лигандов ожидалось ингибирование взаимодействия BRD4-G4. Экспериментальная проверка эффектов G4-лигандов и ингибитора BRD4 проводилась при работе над пятой задачей и будет рассмотрена ниже.

В рамках четвертой задачи также рассматривалось влияние лигандов на фазовые переходы BRD4. Считается, что при SE-опосредованной транскрипции высокая локальная концентрация транскрипционных факторов поддерживается за счет образования конденсатов по механизму разделения фаз «жидкость в жидкости» (Hnisz et al. Cell 2017). BRD4, имеющий на C-конце протяженный

конформационно неупорядоченный участок (маркер скаффолдов конденсатов), играет в этом процессе ключевую роль.

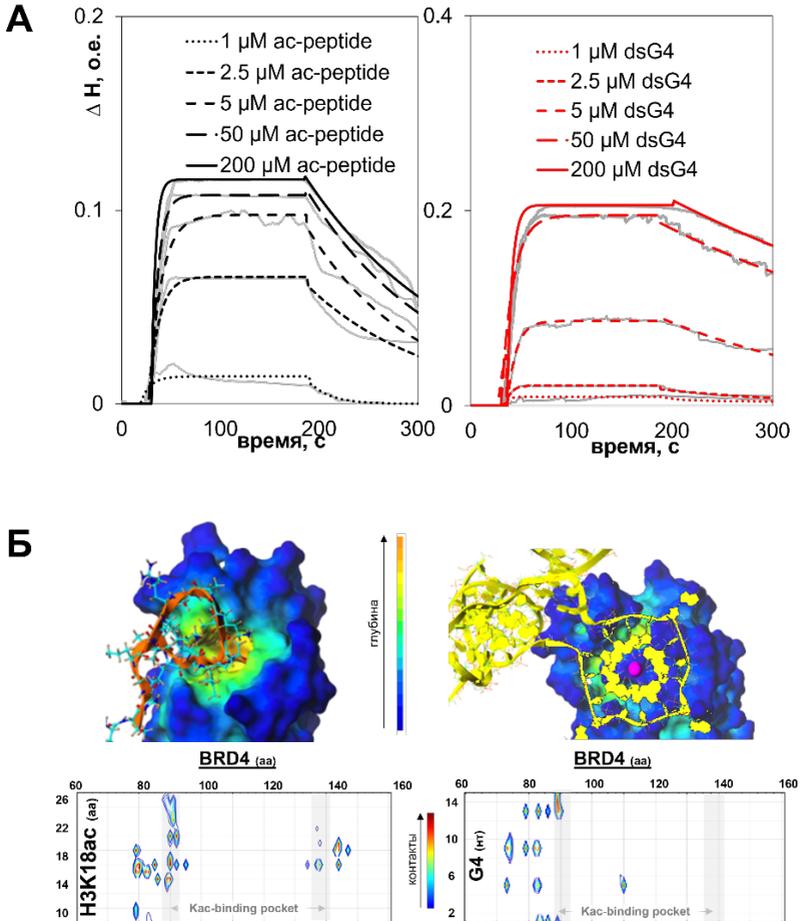


Рисунок 6 – Анализ связывания BRD4 с G4, обогащенным в SE. (А) Анализ взаимодействия BRD4 с G4 и ацелированным пептидом – фрагментом H3K18ac – на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR). (Б) Оценка способа связывания BRD4 с G4 и с ацелированным пептидом методами молекулярного моделирования (получено В.Б. Цветковым).

Согласно классическим представлениям, процесс требует контактов BRD4 с ацетилированными нуклеосомами. В данной работе требовалось проверить, происходит ли аналогичное образование конденсатов BRD4 в присутствии G4, т.е фактически смоделировать разделение фаз при G4-богатых SE.

Влияние G4 и ацетилированного хроматина на разделение фаз было проанализировано *in tube* с использованием меченого BRD4 методом флуоресцентной микроскопии (Рисунок 7). В качестве метрики эффективности разделения фаз была выбрана объемная доля конденсатов. Показано, что G4, как и корректно собранный гистоновый октамер увеличивают общий объем конденсатов BRD4 в растворе, в то время как дуплексы, не содержащие G4, и отдельные гистоны не вызывают разделения фаз в растворе BRD4 (Рисунок 7 А,Б).

Конденсаты были дополнительно охарактеризованы методом восстановления флуоресценции после обесцвечивания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Результаты экспериментов (Рисунок 7В) дополнительно показывают, что анализируемые конденсаты представляют собой «жидкость в жидкости», т.е. не являются твердыми агрегатами.

В рамках работы над пятой задачей исследовались эффекты G4-лигандов и ингибитора BRD4 на комплексообразование и разделение фаз BRD4 с G4. Согласно результатам SPR-анализа, известный ингибитор BRD4 JQ1 не влияет на связывание BRD4 с G4, в то время как G4-лиганд пиридогистин (PDS) ингибирует связывание (Рисунок 8А), что согласуется с данными молекулярного моделирования (Рисунок 6Б).

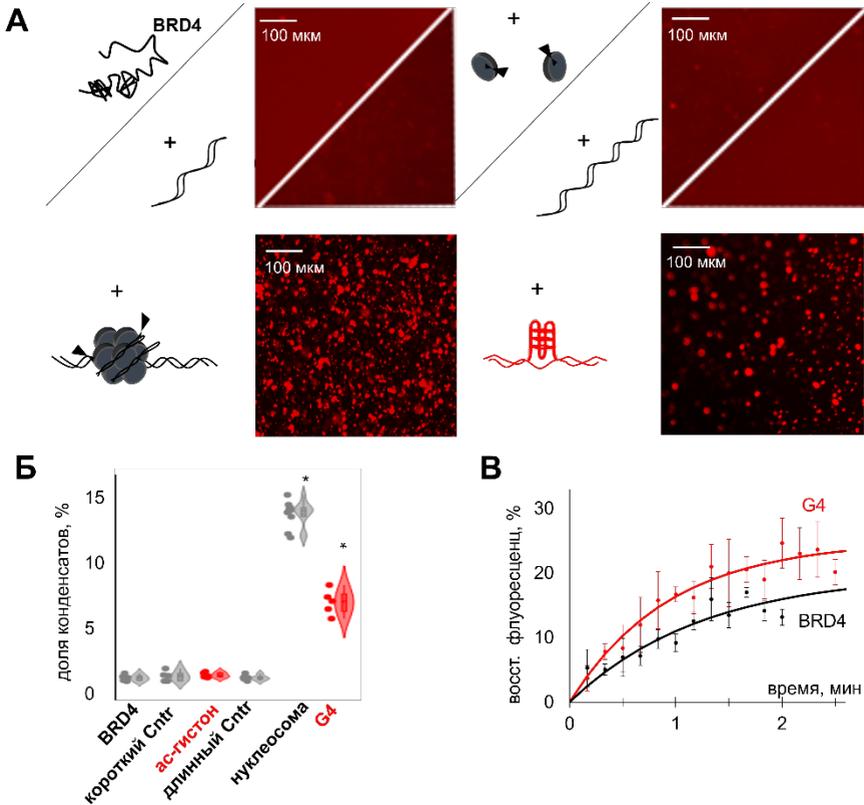


Рисунок 7 – Влияние G4 на разделение фаз «жидкость-жидкость» в растворах BRD4. **(А)** Изображения с флуоресцентного микроскопа: 4 мкМ раствора BRD4 (из них 15% мечены красной флуоресцентной меткой) в буфере для сборки нуклеосомы с 20% PEG-400. Верхняя панель: чистый белок; 1 экв. линкерной ДНК контрольной нуклеосомы длиной 55 п.о.; 150 нМ ацетилированных гистонов; 150 нМ полноразмерной контрольной ДНК-матрицы для сборки нуклеосомы. Нижняя панель: 150 нМ контрольной нуклеосомы; 1 экв. G4. **(Б)** Оценка объемной доли конденсатов в каждом образце. * Значительное увеличение по сравнению с чистым BRD4 ($p < 0,0001$), однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Даннетта. **(В)** Подтверждение соответствия конденсатов плотной жидкой фазе методом FRAP в конденсатах BRD4-G4: кинетические кривые восстановления флуоресценции.

Анализ конденсатов BRD4 с G4 в присутствии G4-лигандов, ингибитора BRD4 JQ1 и универсального ингибитора разделения фаз 1,6-гександиола представлен на Рисунке 8Б,В. В присутствии гександиола (отрицательный контроль, NC) разделение фаз BRD4 было практически полностью подавлено. Однако, ввиду высокой цитотоксичности, данный неспецифичный модулятор конденсатов не имеет перспектив применения в терапии.

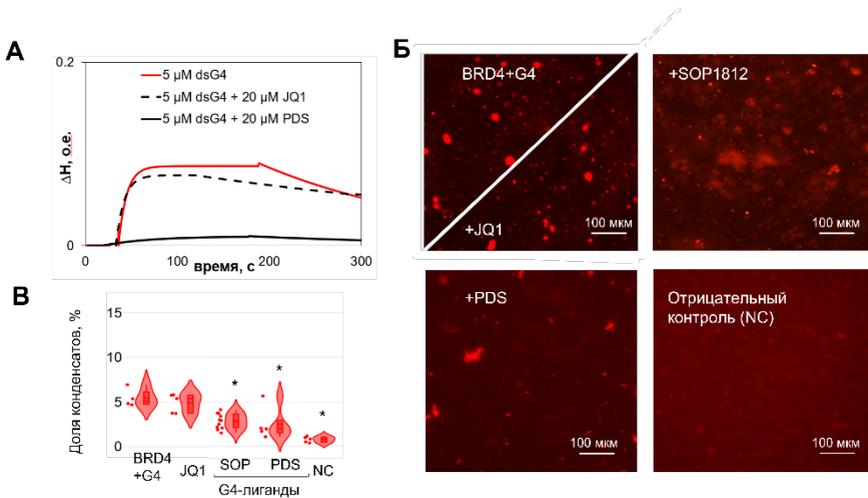


Рисунок 8 – Влияние G4-лигандов и ингибитора BRD4 на связывание и разделение фаз BRD4 с G4. **(А)** Анализ влияния PDS и JQ1 на связывание BRD4 с G4 методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). **(Б)** Анализ влияния G4-лиганда PDS (20 мкМ) и ингибитора BRD4 JQ1 (5 мкМ) на разделение фаз BRD4 с G4 методом флуоресцентной микроскопии. NC – универсальный ингибитор разделения фаз 1,6-гександиол (10%). **(В)** Обобщение результатов, полученных методом флуоресцентной микроскопии (изменение доли конденсатов в смеси BRD4-G4 в присутствии лигандов). *Значительное увеличение по сравнению с чистым BRD4 ($p < 0,0001$, однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Даннетта).

Из специфичных модуляторов заметный ингибиторный эффект проявили G4-лиганды PDS и SOP1812, в то время как JQ1 на долю

конденсатов BRD4 с G4 значимо не повлиял. Этот результат предполагает высокую чувствительность G4-богатых участков SE к PDS/SOP1812 и низкую – к JQ1 (обратная ситуация предполагается для классических гиперацетилированных участков SE). Таким образом, действие известного ингибитора, препятствующего связыванию BRD4 с ацетилированными гистонами и эффективного в качестве модулятора SE-зависимой транскрипции в классической модели конденсатов, может быть дополнено действием G4-лиганда, ингибирующего альтернативный механизм в G4-богатых SE.

Также в рамках работы над пятой задачей, для проверки влияния лигандов на SE-зависимую экспрессию было отобрано три группы генов: гены под контролем онкоспецифичных SE, гены под контролем консервативных SE (общих для раковой и условно нормальной клеточных линий) и гены, не имеющие контактов с SE в пределах ТАД (Рисунок 9А). В качестве G4-лигандов были протестированы PDS и SOP1812. Действие лигандов на отобранные гены оценивали методом ПЦР с обратной транскрипцией. Было показано, что действие PDS на гены под контролем SE коррелирует с содержанием слабых G4 в SE (Рисунок 9Б). Эти данные подтверждают вклад SE G4 в регуляцию транскрипции.

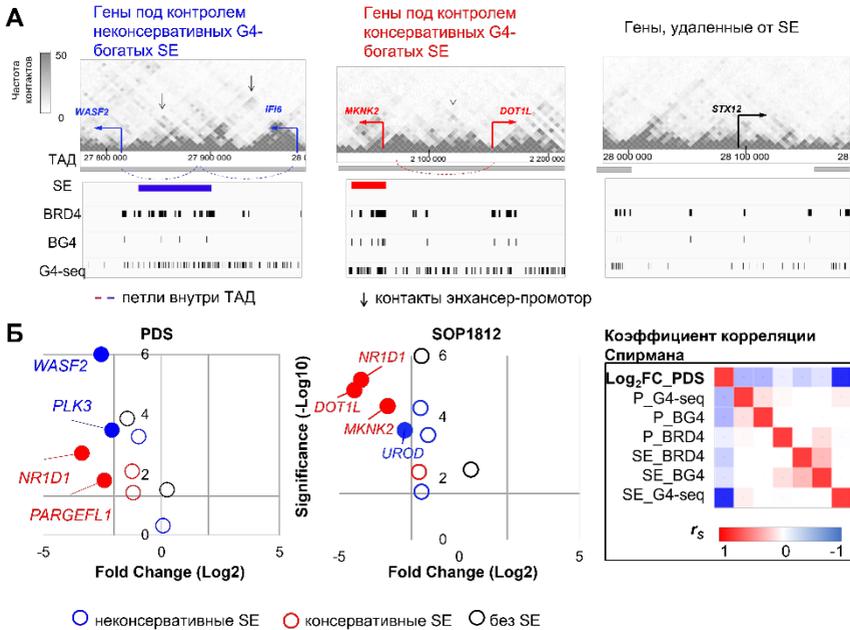


Рисунок 9 – Влияние G4-лигандов на экспрессию генов под контролем G4-богатых SE. (А) Примеры генов под контролем неконсервативных (синий) или консервативных (красный) G4-богатых SE, а также контрольных генов без SE (черный). (Б) Регуляция выбранных генов G4-лигандом PDS (левая панель) или SOP1812 (центральная панель) в K-562. Порог $\text{Log}_2\text{FC} = 2$, порог $p\text{-value} = 0.05$. В правой панели показана корреляция (коэффициент Спирмана) между регуляцией генов с помощью PDS ($\text{Log}_2\text{FC_PDS}$) и выбранными характеристиками SE/промотора (P).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прояснение вклада непромоторных G4 в регуляцию транскрипции создает задел для корректировки стратегий применения G4-лигандов. В частности, в данной работе были раскрыты особенности G4-богатых суперэнхансеров, которые считаются перспективной мишенью эпигенетических противоопухолевых препаратов. Полученные результаты говорят о том, что такие суперэнхансеры нечувствительны к ингибиторам BRD4, но чувствительны к G4-лигандам. Из этого следует целесообразность тестирования комбинаций ингибиторов BRD4 с G4-лигандами с целью подавления аномальной активации транскрипции в онкоклетках. Также в работе было предложено объяснение побочных эффектов G4-лигандов, связанных с укреплением инсуляторов. Было показано, что привлечению CTCF способствует стабилизация G4 в его сайтах связывания. Результаты подкреплены данными коллег по моделированию влияния лигандов на взаимодействия G4-CTCF и G4-BRD4: они указывают на конкуренцию между лигандом и BRD4 за G4 и отсутствием конкуренции между лигандом и CTCF. Таким образом, основное действие лигандов на непромоторные G4 – это укрепление инсуляторов и нарушение работы суперэнхансеров. Эти эффекты стоит учитывать при прогнозировании действия лигандов, которые проходят клинические испытания.

ВЫВОДЫ

1. Сродство CTCF к геномным G4 сопоставимо со сродством к консенсусному мотиву связывания, что объясняет участие G4 в формировании CTCF-зависимых хроматиновых петель и демаркации транскрипционных доменов.
2. Обработка клеток G4-стабилизирующими лигандами увеличивает частоту позиционирования CTCF на G4, что подтверждает вклад G4 в CTCF-зависимые перестройки хроматина.
3. G4 препятствуют сборке нуклеосомы, что проясняет дополнительные механизмы участия G4 в активации транскрипции за счет освобождения ДНК для связывания с транскрипционными факторами.
4. G4 значимо перепредставлены в суперэнхансерах (SE); G4-богатые SE обеднены консенсусными сайтами связывания BRD4 (асНО), но сродство G4 к BRD4 сопоставимо с таковым для асНО, что обеспечивает удержание BRD4 в SE и сборку биоконденсатов, необходимую для множественных контактов с промоторами.
5. G4-лиганды препятствуют взаимодействию BRD4-G4 и ингибируют образование конденсатов, что частично объясняет повышенный отклик генов под контролем G4-богатых SE на G4-лиганды.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей:

1. Tikhonova P., Pavlova Iu., Isaakova E., Tsvetkov V., Bogomazova A., Vedekhina T., Luzhin A., Sultanov R., Severov V., Klimina K., Kantidze O., Pozmogova G., Lagarkova M. and Varizhuk A. DNA G-quadruplexes contribute to CTCF recruitment // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, № 13. P. 7090. DOI: 10.3390/ijms22137090
2. Pavlova Iu., Barinov N., Severov V., Iudin M., Vedekhina T., Larin A., Babenko V., Aralov A., Gnuchikh E., Sardushkin M., Klinov D., Tsvetkov V., Varizhuk A. Modeling G4s in chromatin context confirms partial nucleosome exclusion and reveals nucleosome-disrupting effects of the least selective G4 ligands // *Biochimie*. 2023. Vol. 204. P. 8–21. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.08.016
3. Pavlova Iu., Iudin M., Surdina A., Severov V., Varizhuk A. G-Quadruplexes in Nuclear Biomolecular Condensates // *Genes (Basel)*. 2023. Vol. 14, № 5. P. 1076. DOI: 10.3390/genes14051076
4. Pavlova Iu., Ivanova O., Iudin M., Surdina A., Barinov N., Bogomiakova M., Oreshkov S., Shenkarev Z., Severov V., Klinov D., Shender V., Bogomazova A., Lagarkova M., Varizhuk A., Tsvetkov V. G-quadruplexes as potential traps for superenhancer marker BRD4: ligand-sensitive binding and co-separation *in vitro* // *Nucleic Acids Res*. 2025. Vol. 53, № 14. P. gkaf726. DOI: 10.1093/nar/gkaf726

Список тезисов конференций:

1. Pavlova Iu., Barinov N., Severov V., Vedekhina T., Varizhuk A. The minimal in vitro model of G4 DNA in a chromatin context // IS3NA, (The International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids) Virtual Symposium Full Program Book. – Baltimore, 2021.– P. 133.
2. Pavlova Iu., Barinov N., Severov V., Vedekhina T., Tsvetkov V., Varizhuk A. A minimal in vitro model of G4s in chromatin context reveals nucleosome-disrupting effects of G4 ligands // INTERACTION WINS-2021, (Innovative ThERApEutiC Targets In nOn-canonical Nucleic acids structures Winter InterNational School 2021) Book of Abstracts – Pavia, 2021. – P. 62.
3. Павлова Ю.И., Баринов Н.А., Цветков В.Б., Северов В.В, Юдин М.С., Ведехина Т.С., Варижук А.М., Клинов Д.В. *In vitro* модель G4 в составе хроматина // Сборник тезисов итоговой научно-практической конференции, посвященной присвоению ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» имени академика РАН Ю. М. Лопухина. – Москва, 2021. – С. 34.
4. Юдин М.С., Павлова Ю.И., Новиков Р.А., Варижук А.М. Детекция квадруплексов (G4) в модели нуклеосомной ДНК // Сборник тезисов научной конференции молодых ученых ФГБУ ФНКЦ ФБМА России. – Москва, 2022. – С. 22.
5. Павлова Ю.И., Богомазова А.Н., Тихонова П.О., Цветков В.Б., Ведехина Т.С., Климина К.М., Исаакова Е.А., Лагарькова М.А., Позмогова Г.Е., Варижук А.М. Влияние геномных G4 на укладку хроматина. // III объединенный научный форум

физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. Научные труды. – Сочи, 2022. – Т. 2. С. 7.

6. Юдин М.С., Варижук А.М., Павлова Ю.И., Клинов Д.В. Моделирование G-квадруплексов в хроматиновом контексте // Материалы конференции. III межвузовская студенческая конференция. Студенческий биохимический форум – 2023. – Москва, 2023. – Т. 1. С. 81.
7. Юдин М.С., Варижук А.М., Павлова Ю.И., Клинов Д.В., Цветков В.Б. Роль G-квадруплексов в формировании транскрипционных хабов с ВЕТ-белками // Труды 65-й Всероссийской научной конференции МФТИ в честь 115-летия Л. Д. Ландау. Биологическая и медицинская физика. – Москва, 2023. – С. 262-263.
8. Павлова Ю.И., Юдин М.С., Варижук А.М. G-квадруплексы – “катализаторы” фазовых переходов транскрипционных факторов // Тезисы докладов 13-ой международной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения. (Биокатализ – 2023)» – Москва: ООО «АДМИРАЛ ПРИНТ», 2023. – С. 51.
9. Павлова Ю.И., Иванова О.М., Юдин М.С., Сурдина А.В., Баринов Н.А., Клинов Д.В., Варижук А.М. Особенности организации и возможность таргетирования G4-богатых суперэнхансеров // Научная конференция молодых учёных ФБГУ ФНКЦ ФХМ им. М.Ю. Лопухина ФБМА России. Сборник тезисов. – Москва, 2024. – С. 42.