

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Павловой Юлии Ивановны
«G-квадруплексы суперэнхансеров и приграничных участков хроматиновых
доменов как регуляторы транскрипции»**

**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.3 – молекулярная биология**

Диссертационная работа Ю.И. Павловой посвящена прояснению роли гуаниновых квадруплексов (G4) в регуляторных участках генома человека. Данные неклассические вторичные структуры нуклеиновых кислот уже давно являются объектами исследования в молекулярной биологии, что определяет соответствие работы заявленной специальности. На сегодняшний день общепризнано влияние промоторных G4 на экспрессию генов, разработаны десятки высокоспецифичных к G4 низкомолекулярных соединений для подавления (реже – активации) G4-зависимой транскрипции. Ввиду повышенной представленности G4 в промоторах онкогенов, часть соединений такого рода, далее называемых лигандами, имеет перспективы применения в качестве противоопухолевых агентов. Однако, клинические испытания были начаты лишь для нескольких лигандов, и механизмы их действия изучены недостаточно. Доказанные механизмы включают вытеснение транскрипционных факторов с G4-богатых промоторов, создание механического препятствия для РНК-полимеразы II за счет стабилизации G4 и придания им устойчивости к хеликазной активности и прочее. Они не полностью объясняют наблюдаемые эффекты лигандов. Одна из причин тому – фокус исследований на промоторах без учета вклада G4 иных цис-регуляторных элементов, включая энхансеры и инсуляторы. В работе Павловой Ю.И. рассмотрены G4 из протяженных энхансеров (суперэнхансеров, SE), а также инсуляторов или их кластеров – граничных участков топологических ассоциированных доменов хроматина (ТАДов), которые определяют области контактов энхансер-промотор. Границы ТАДов маркированы скоплениями CCCT-связывающего фактора (CTCF), а SE – скоплениями бромодомен-содержащего белка BRD4. В работе Павловой Ю.И. показана принципиальная возможность комплексообразования G4 с BRD4 и CTCF, объяснена различная чувствительность комплексов к лигандам, и частично рассмотрены эффекты таких взаимодействий на уровне транскрипции.

Актуальность темы и новизна исследования

Работа Павловой Ю.И. была направлена на получение полной картины G4-зависимой регуляции транскрипции, что актуально для совершенствования стратегий корректировки транскрипционного профиля с помощью G4-лигандов. В рамках данной масштабной научной проблемы решались задачи прояснения механизмов участия G4 в разграничении ТАДов и формировании хроматиновых петель, включая CTCF-зависимые петли и BRD4-зависимые контакты энхансер-промотор. Учет G4-богатых границ ТАДов и SE наряду с G4-богатыми промоторами – шаг к выявлению полного спектра мишеней G4-лигандов и корректному прогнозированию их эффектов.

Новизна работы в части, касающейся границ ТАДов, наименее очевидна на данный момент ввиду быстрого развития направления. С момента публикации результатов по этой части способность G4 привлекать белок-инсулятор CTCF была подтверждена несколькими научными коллективами независимыми методами. Это лишь доказывает справедливость выводов, сделанных Юлией Ивановной. Стоит подчеркнуть, что чувствительность профиля CTCF к G4-лигандам была установлена ею впервые. При интерпретации результатов Юлия Ивановна опиралась на выводы коллег по механизму комплексообразования G4-CTCF, который допускает стабилизирующее действие лигандов на G4 без разрушения комплексов. Это объясняет описанное в литературе усиление демаркации ТАДов под действием G4-лигандов. В диссертации описан пример противоположного эффекта лигандов, а именно – снижения экспрессии SE-зависимых генов под действием G4-лигандов, что было показано Юлией Ивановной на ограниченной выборке генов. Автор предполагает, что это связано с разрушением комплексов G4 с маркером SE – BRD4 – за счет конкуренции лиганда с белком и ослаблением BRD4-зависимых контактов G4-богатых SE с промоторами. Полученные результаты по G4-богатым SE отличаются несомненной новизной: наличие G4-богатых SE и особенности удержания в них BRD4 были показаны впервые, как и принципиальное отличие G4-богатых SE от прочих SE (первые чувствительны к G4-лигандам, вторые – к синтетическим аналогам ацетилированных гистонов).

Теоретическая и практическая значимость результатов

Часть представленных результатов, а именно – выявление двух типов SE с различными механизмами удержания BRD4 и чувствительностью к терапевтическим агентам, имеет очевидную практическую значимость. Из этого результата следует целесообразность комбинирования конкурентов ацетилированных гистонов, вытесняющих BRD4 из классических SE, с G4-лигандами, вытесняющими BRD4 с G4-богатых SE, для эффективного подавления aberrантной транскрипции. Это может дать новый импульс

разработке противоопухолевых агентов, нацеленных на SE – одному из современных направлений эпигенетической терапии. Направление остается многообещающим, несмотря на высокую токсичность доступных прототипов препаратов при использовании их в формате монотерапии.

Фундаментальная значимость диссертационного исследования определяется тем, что в нем разрешается один из парадоксов организации SE. Ранее предполагалось, что BRD4 удерживается в SE исключительно за счет сродства к ацетилированным фрагментам гистонов. При этом для G4-богатых SE характерна низкая нуклеосомная плотность. Парадокс заключался в том, что на свободных от нуклеосом участках отмечалась высокая локальная плотность BRD4. Охарактеризованное Павловой Ю.И. и доказанное в простейшей модели хроматина взаимодействие BRD4 с G4 разрешает видимое противоречие.

Выявленная Павловой Ю.И. способность G4 подавлять сборку нуклеосом на ближайших участках ДНК, содержащих мотив позиционирования гистонового октамера, также является фундаментальным результатом. Хотя ассоциация G4 с низкой нуклеосомной плотностью известна давно, прямые доказательства взаимоисключающего характера гистоновых октамеров и G4 отсутствовали. Вытеснение гистонов вблизи G4 не только побудило диссертанта пересмотреть организацию SE, но также объяснило описанное в литературе положительное влияние G4 на связывание CTCF с ближайшими к G4 консенсусными дуплексными мотивами узнавания. Вероятно, G4 обеспечивают доступность ближайших дуплексов для узнавания инсулятором и иными факторами за счет ремоделирования нуклеосомной укладки. Таким образом, результаты работы добавляют цельности современным представлениям о регуляции транскрипции, что и определяет их теоретическую значимость.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена традиционно; состоит из введения, обзора литературы, описания полученных результатов и их обсуждения, описания материалов и методов исследования, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 261 источник. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 25 рисунков, 7 таблиц. В обзоре литературы коротко рассмотрены современные методы картирования G4 и результаты картирования G4 в геноме человека, подробно обсуждается ассоциация G4 с активной транскрипцией и частично – с ремоделированием

хроматина, а также обобщены данные по влиянию на G4 на внутриклеточное разделение фаз «жидкость-жидкость» при транскрипции, укладке хроматина и проч.

В первой части раздела «Результаты и обсуждение» автор демонстрирует, что G4 способны напрямую связываться с CTCF *in vitro* с наномолярным сродством, сопоставимым с таковым для консенсусного дуплексного мотива. Это показано методом микромасштабного термофореза и согласуется с данными молекулярного моделирования. Обработка клеток линии K-562 G4-лигандами усиливает связывание CTCF с G4-сайтами, имеющими потенциал к стабилизации. Обсуждается значимость этого эффекта для инсуляции SE от промоторов, т.е. демаркации хроматиновых доменов.

Результаты экспериментов с реконструированными нуклеосомами, представленные во второй части, показывают, что G4 в участках, фланкирующих сайт позиционирования гистонового октамера на ДНК, существенно снижают эффективность его сборки. То же справедливо в отношении октамера с ацетилированными гистонами H3. Эти результаты позиционируются как вероятный дополнительный механизм привлечения CTCF и основание пересмотра организации G4-богатых SE.

Биоинформатический анализ, выполненный в третьей части раздела «Результаты и обсуждение», подтверждает обогащение G4 в SE. Показано, что G4 способны напрямую связываться с BRD4, подобно ацетилированным гистонам, и инициируют разделение фаз на границе двух жидкостей *in vitro*, что аналогично сборке транскрипционных биоконденсатов в клетке. Там же показано, что G4-лиганды ингибируют сборку конденсатов и подавляют экспрессию генов, контролируемых G4-богатыми SE. Это открывает перспективы для исследований в области терапии онкологических заболеваний, связанных с гиперэкспрессией онкогенов, контролируемых суперэнхансерами.

В разделе «материалы и методы» достаточно подробно изложены протоколы всех экспериментов, включая иммунопреципитацию хроматина, эксперименты *in vitro* с использованием спектральных, форетических и иных методов, анализ влияния лигандов на генную экспрессию в клеточных культурах и др. Использование взаимодополняющих методов определяет достоверность результатов исследования.

Замечания

Несмотря на высокий общий уровень работы, некоторые аспекты работы требуют уточнения.

- 1) Влияния пиридостатина на профиль ChIP-seq CTCF описано недостаточно подробно. Автор дает только общую оценку: изменения «носили преимущественно

- количественный характер» (стр. 33). Сколько всего было пиков CTCF и сколько новых пиков появилось после обработки? Какова частота совместной локализации новых пиков CTCF и пиков G4-seq? Использовались данные G4-seq, полученные на клетках после обработки пиридостатином, или на контрольных клетках?
- 2) Лиганды PDS и PhenDC3, по-видимому, стимулировали рост пиков связывания CTCF на сайтах с потенциальными квадруплексами (стр. 34). На основании полученных авторами структурных данных, можно ли оценить влияние этих лигандов на формирование комплекса G4 и CTCF? Будут ли лиганды разрушать комплекс, стабилизировать его или не окажут никакого влияния? В работе проведен анализ такого влияния на взаимодействие BRD4 с квадруплексом, было бы логично сделать его также для CTCF.
 - 3) Как были получены гистоны для сборки нуклеосом *in vitro* (стр. 44)? Использовались рекомбинантные гистоны (без посттрансляционных модификаций) или общие гистоны, выделенные из клеток (все возможные состояния модификаций)?
 - 4) Анализ связывания BRD4 с квадруплексами *in vitro* и *in silico* проводился для фрагмента белка без неупорядоченного домена. Может ли последний вносить вклад в это взаимодействие?
 - 5) В финальной модели (стр. 75) автор предполагает, что ингибиторы G4 снижают аффинность суперэнхансеров к BRD4. Однако автор не упоминает другой потенциальный путь: ингибиторы G4 должны повышать связывание ацетилированных нуклеосом и тем самым стимулировать привлечение BRD4. Возможно ли дать количественную оценку вклада этих двух путей влияния ингибиторов G4 на привлечение BRD4?

Замечания не снижают высокого уровня работы, соответствующего мировым стандартам.

Работа выполнена на достаточно высоком научном и методическом уровне. Обоснованность положений, выносимых на защиту, и ключевых выводов не вызывают сомнений. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в международных периодических изданиях. Основные положения диссертационной работы были представлены на 9 российских и международных конференциях.

В целом, диссертация Павловой Ю.И. представляет собой завершённое научное исследование, содержащее новые результаты в области молекулярной биологии. По

актуальности, достоверности и новизне исследования и полученных результатов, значимости выводов для науки и практики диссертация отвечает требованиям пп. 9-11 и 13-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (ред. от 16.10.2024) "О порядке присуждения ученых степеней" с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2025, а её автор заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент
доктор биологических наук по специальности
03.01.03 – Молекулярная биология,
профессор РАН,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией регуляции
экспрессии генов в развитии
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии гена РАН

26 октября 2025г

119334, г. Москва, улица Вавилова, д.34/5.
Тел.: +7(499)135-60-89.
E-mail: info@genebiology.ru
<https://genebiology.ru>

Шидловский Юлий Валерьевич

