

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

Актуальность темы. Диссертационное исследование посвящено роли G-квадруплексов (G4 или GQ) из суперэнхансеров (SE) и границ транскрипционных (суб)доменов в регуляции транскрипции. Актуальность данной работы обусловлена необходимостью учитывать влияние GQ из SE и инсуляторов при прогнозировании эффектов GQ-лигандов. GQ промоторов онкогенов привлекают внимание исследователей в контексте противоопухолевой терапии и являются признанной мишенью для разработки низкомолекулярных терапевтических агентов (GQ-лигандов). GQ других регуляторных элементов изучаются существенно реже. Однако, они также могут быть чувствительны к лигандам и участвовать в контроле транскрипции; прояснение их роли - значимая научная проблема.

Структура и содержание диссертации. Работа построена стандартно и состоит из введения, обзора литературы, главы «Результаты и обсуждение», главы «Материалы и методы» и заключения. Главы «Результаты и обсуждение» и «Материалы и методы», в свою очередь, состоят из трех частей.

Обзор литературы отражает современные представления о механизмах участия GQ (главным образом, промоторных) в регуляции транскрипции и включает информацию о типах биоконденсатов на GQ, в том числе транскрипционных.

В первой части главы «Результаты и обсуждение» уделяется внимание квадруплексам, расположенным на границах транскрипционных (суб)доменов, и взаимодействию таких GQ с белком-инсулятором CTCF, формирующим эти границы. В работе показано, что GQ связываются с CTCF, а обработка клеток линии K-562 GQ-лигандами повышает частоту связывания GQ с CTCF, т.е. может укреплять инсуляторы.

Во второй части главы «Результаты и обсуждение» описывается исследование влияния GQ на сборку нуклеосомы в *in vitro* модели хроматина и сделан вывод о меньшей эффективности сборки гистонового октамера на GQ-содержащей ДНК-матрице. Способность GQ в линкерной ДНК вытеснять гистоновые октамеры, открывая сайты

связывания транскрипционных факторов, является дополнительной составляющей GQ-опосредованной регуляции транскрипции.

В третьей части главы «Результаты и обсуждение» в контексте связи с транскрипцией рассматриваются квадруплексы SE. Сначала биоинформатическими методами подтверждается значимость обогащения SE квадруплексами. Затем изучается взаимодействие GQ с маркером SE – белком BRD4, в том числе в составе минимальной *in vitro* модели транскрипционных конденсатов, образующихся за счет разделения фаз. Показано, что GQ связываются с BRD4 и способствуют разделению фаз в растворе BRD4. Далее показано, что GQ-лиганды ингибируют взаимодействие BRD4 с GQ и снижают долю конденсатов BRD4-G4. Данный результат косвенно подтверждается в экспериментах на клеточных линиях: экспрессия генов под контролем GQ-богатых SE снижается после обработки GQ-стабилизирующими лигандами, причем действие лигандов коррелирует с количеством суперэнхансерных GQ, имеющих потенциал к стабилизации. Эти результаты расширяют представления об SE-зависимой транскрипции и могут учитываться при разработке онкотерапевтических комбинаций GQ-лигандов с ингибиторами связывания BRD4 с ацетилированными гистонами.

Части главы «Материалы и методы» соответствуют частям главы «Результаты и обсуждения» и раскрывают методологию работы достаточно подробно. Использование комплементарных методов при экспериментальной проверке гипотез гарантирует **достоверность результатов.**

Все ключевые результаты отличаются **новизной**. В частности, впервые было показано взаимодействие GQ с BRD4 и CTCF. Предложена оригинальная интерпретация этих результатов в контексте регуляции транскрипции.

Теоретическая и практическая значимость результатов. В теоретическом плане работа дополняет и расширяет понимание механизмов GQ-опосредованной транскрипции. В практическом плане, полученные результаты могут быть использованы при разработке новых онкотерапевтических комбинаций.

Замечания. Имеются некоторые непринципиальные вопросы и замечания, которые носят дискуссионный характер и не снижают научно-практическую ценность диссертационной работы.

- 1) Экспериментальная работа выполнена на высоком уровне, однако, не уточняется, как контролировали чистоту G-квадруплекс-содержащих конструкций после этапа выделения. Известно, что G-богатые последовательности при хранении медленно,

но необратимо агрегируют с образованием межмолекулярных G-квадруплексов. По нашим данным в случае $G_{3-5}NG_{3-5}NG_{3-5}NG_{3-5}$ -содержащих дуплексных конструкций зачастую содержатся примеси тетрамерных G-квадруплексов, которые искажают трактовку спектров КД и интенсивности окрашивания флуоресцентными красителями. К сожалению, образование олигомеров невозможно предотвратить полностью, поэтому требуется постоянный контроль качества. В том числе, проверять не сдвигает ли лиганд равновесие в сторону олигомеров. Это замечание подкрепляется спектрами ЯМР, в которых видны плохо разрешенные пики GQ (т.н. «горбы»), которые часто встречаются у олигомерных GQ.

- 2) На мой взгляд, работу стоило дополнить обсуждением полученных констант диссоциации комплексов G-квадруплексов с белками. Оцененная аффинность белков к G-квадруплексам относительно невелика: от 120 нМ для CTCF до 5 мкМ для BRD4. Из литературы известно, что некоторые транскрипционные факторы связываются с G-квадруплексами с константами 1-20 нМ (например, SP1). Хотелось бы дополнить обсуждение результатов некоторым разграничением специфических взаимодействий от неспецифических, а также объяснением почему низкоаффинные взаимодействия могут быть релевантны в клетке. Нужны ли какие дополнительные условия для сборки этих комплексов в клетках?
- 3) Найдено несколько опечаток, которые, впрочем, не влияют на восприятие материала. Некоторые части рисунков недостаточно информативно подписаны. Например, сложно понять рис.8 В, где присутствуют 2 вставки без индивидуальной подписи.

Диссертационное исследование Ю.И. Павловой выполнено на высоком научно-методическом уровне. Выносимые на защиту положения и ключевые выводы являются убедительными и хорошо обоснованными. Содержание автореферата полностью отражает основные идеи диссертации.

По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных журналах. Основные положения работы были представлены на 9 российских и международных конференциях.

Заключение. Диссертационное исследование Ю.И. Павловой представляет собой самостоятельное, завершённое научное изыскание, содержащее новые значимые результаты в области молекулярной биологии. По критериям актуальности, достоверности, новизны и научно-практической значимости диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11 и 13-14 «Положения о

присуждении ученых степеней», утв. Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013. (ред. от 16.10.2024) "О порядке присуждения ученых степеней" с изм. и доп., вступ. в силу с 01.01.2025), и её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

доктор химических наук по специальности

1.4.9 – Биоорганическая химия

доцент кафедры химии природных соединений

химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

 Завьялова Елена Геннадиевна

«29» октября 2025г

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.3

Тел.: +7 (495) 939-54-18

E-mail: zlenka2006@gmail.com

<https://chem.msu.ru>

