



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**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
(ГНЦ ИБХ РАН)**

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

24 ОКТ 2025

№ 4.10-48-1404

на № _____

от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Врио директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Государственный
научный центр Российской Федерации Институт
биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

(ГНЦ ИБХ РАН)

д.х.н., академик РАН

Габибов Александр Габибович



«24» октября 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию 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 Павловой Юлии Ивановны посвящена гуаниновым квадруплексам (G4) генома человека и их участию в контроле транскрипции. Формирование данных неклассических структур ДНК рассматривается как один из уровней эпигенетической регуляции. Хотя вклад G4 в модуляцию экспрессии онкогенов можно считать доказанным, связь между изменением G4-профиля и активацией онкогенов, а также генов, ассоциированных с резистентностью к терапии, проанализирована недостаточно. Исследования по данной теме **актуальны** в контексте совершенствования стратегий противоопухолевой терапии ввиду возможности таргетирования геномных G4 малыми молекулами – G4-лигандами.

Успехи последних лет в картировании самих G4, их комплексов с белками и т.д. позволили

прояснить тканеспецифичность G4-профилей в норме и патологии, а также получить более полную картину G4-интерактома. В результате стало очевидно, что спектр значимых G4-мишеней не исчерпывается промоторными структурами. В частности, с развитием резистентности к химиопрепаратам, по-видимому, ассоциированы интронные и межгенные (в том числе энхансерные) G4, а также протяженные G4-кластеры, для которых был предложен термин “супер G4” – по аналогии с суперэнхансерами (SE). Кроме того, в качестве мишеней на сегодняшний день предлагается рассматривать не изолированные G4, а их комплексы с белками, поскольку влияние лигандов на транскрипцию зависит не только от стабилизации G4, но также от конкуренции с белками за G4. Все эти аспекты учтены в работе Юлии Ивановны, что определяет соответствие диссертации современному уровню исследований в данной области.

В качестве объектов исследования Юлией Ивановной были выбраны непромоторные G4 и их кластеры. Последние обнаруживаются в сайтах скопления белка-инсулятора CTCF на границах хроматиновых петель и топологически ассоциированных доменов (ТАДов), а также в части SE. Солокализация G4 с CTCF была известна ранее. Высокая представленность G4 в части SE нескольких опухолевых клеточных линий и солокализация с маркером SE – бромодоменсодержащим белком BRD4 показана Юлией Ивановной впервые. Основной целью ее работы стало раскрытие вероятных механизмов участия G4 из SE и границ ТАДов в контроле генной экспрессии. Учет ТАДов и SE, которые являются мажорными цис-регуляторными элементами в пределах ТАДов, необходим для корректного соотнесения изменений G4-профиля с нарушениями транскрипции, что обуславливает научную значимость работы.

В рамках диссертационного исследования Павловой Ю.И. было показано, что типичные G4 границ ТАДов аффинны к CTCF и не уступают в этом плане консенсусному дуплексному мотиву связывания, а также повышают вероятность узнавания консенсусных мотивов во фланкирующих участках за счет снижения локальной нуклеосомной плотности и таким образом способствуют более четкой демаркации ТАДов. В то же время типичные G4 из SE имеют умеренное сродство к BRD4, достаточное для удержания данного маркера SE в областях низкой нуклеосомной плотности и сохранения BRD4-зависимых контактов SE с промоторами в пределах ТАДов. Примечательно, что подобно консенсусным сайтам связывания (ацетилированным гистонам в составе нуклеосомы) G4 из SE инициируют фазовый переход в растворах BRD4, что согласуется с предполагаемым разделением фаз при SE в клетке. Все эти результаты получены впервые, что определяет новизну работы Юлии Ивановны.

В диссертационной работе также охарактеризованы комплексы G4-CTCF и G4-BRD4. Первые аналогичны комплексам с консенсусным дуплексным мотивом узнавания CTCF, т.е. предполагает связывание по бороздке G4. Вторые принципиально отличается от комплексов BRD4 с классическими «партнерами» – ацетилированными гистонами. Хотя за взаимодействие также отвечают бромодомены, сайт связывания смещен относительно кармана узнавания ацетилированных гистонов, а ключевые контакты формируются с внешней тетрадой. Из этих результатов напрямую следует характер влияния G4-лигандов на комплексы G4-CTCF и G4-

BRD4. Поскольку типичные лиганды нацелены на внешние тетрады G4, для них ожидалась конкуренция с BRD4 за G4 и отсутствие конкуренции с CTCF. Полученные Юлией Ивановной результаты подтверждают данное предположение. Таким образом, наблюдаемые эффекты лигандов можно объяснить усилением инсуляции и нарушением работы G4-богатых SE. Этот вывод указывает на целесообразность комбинирования G4-лигандов с ингибиторами классических SE для предотвращения аномальной активации транскрипции в опухолевых клетках, что может дать новый стимул поиску эффективных стратегий применения G4-лигандов и определяет практическую значимость работы.

Структура диссертации традиционна. Вводный раздел содержит обоснование актуальности темы и краткий обзор исследований зарубежных коллективов, послуживших предпосылками к работе Юлии Ивановны, расшифровку ключевых понятий, формулировку цели и задач. Обзор литературы включает два раздела. В первом обобщены известные вклады промоторных и непромоторных G4 в регуляцию транскрипции; объяснена преимущественная ассоциация G4 с активной транскрипцией и иные аспекты, напрямую связанные с темой диссертации. Второй раздел касается разделения фаз в областях скоплений G4-ДНК/РНК и узнающих их белковых факторов. Он уместен ввиду значимости фазовых переходов для функционирования SE и гипотезы о том, что G4 в SE способствуют фазовым переходам.

Глава “Результаты и обсуждение” содержит три раздела. В первом представлены данные по взаимодействию G4 с белком-инсулятором и маркером границ ТАДов – CTCF; показано влияние G4-лигандов на распределение CTCF относительно G4 в геноме. В рамках дискуссии обсуждается два механизма G4-зависимого привлечения CTCF: напрямую или за счет снижения нуклеосомной плотности. Проверке ингибирования сборки гистоновых октамеров на фланкирующих G4 участках ДНК посвящен второй раздел главы. Ингибирование показано как для немодифицированных гистонов, так и для ацетилированных, что подчеркивает парадоксальность существования G4-богатых SE, обогащенных аффинным к ацетилированным гистонами BRD4. В третьем разделе главы это находит объяснение. Приведен сравнительный анализ взаимодействия BRD4 с ацетилированными гистонами и G4. Показано существование двух типов SE: (1) свободных от G4, с BRD4 на ацетилированных нуклеосомах, и (2) G4-богатых, с низкой нуклеосомной плотностью и BRD4 на G4. Первые потенциально чувствительны к миметикам гистонов, вторые – к конкурирующим с BRD4 G4-лигандам.

В экспериментальной части описаны все использованные в работе методы. Их набор отличается разнообразием и включает методы полногеномного картирования сайтов позиционирования белков (иммунопреципитация хроматина в сочетании с секвенированием); анализ генной экспрессии методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР; методы оценки эффективности комплексообразования и структурных исследований комплексов (спектроскопия кругового дихроизма, ЯМР-спектроскопия), а также исследований процесса разделения фаз в образцах смесей BRD4 с G4 или контрольными ацетилированными нуклеосомами (микроскопия). Методы являются современными и надежными. Их выбор

соответствует задачам, а протоколы экспериментов изложены достаточно подробно. В совокупности это определяет достоверность материалов диссертации.

В заключительном разделе сформулированы выводы и подчеркнута научно-практическая значимость результатов. Обоснованность выводов не вызывает сомнений – они подкреплены достаточным объемом экспериментального материала. Материал диссертации прошел апробацию на отечественных и зарубежных конференциях, по нему опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

В ходе анализа диссертационной работы Ю.И. Павловой сформулированы следующие замечания:

1. Утверждение о том, что G4 «удерживают BRD4» в отсутствие ацетилированных гистонов, хотя и подкреплено данными SPR и микроскопии, требует дополнительной проверки *in cellulo*. В условиях клетки BRD4 может взаимодействовать с множеством партнёров (включая Mediator и другие компоненты транскрипционного аппарата), что может влиять на интерпретацию роли G4 как основного «якоря». Желательно было бы провести контрольные эксперименты с делецией или мутацией G4-мотивов в SE и оценить последствия для рекрутирования BRD4 *in situ*.
2. При анализе влияния G4-лигандов на экспрессию генов отсутствует контроль за возможными нецелевыми эффектами лигандов. В работе используются такие лиганды, как PDS, PhenDC3 и SOP1812, которые считаются относительно селективными к G4. Однако известно, что даже «селективные» G4-лиганды могут связываться с РНК-G4, ингибировать топоизомеразы и вызывать репликативный стресс. Были ли исключены неспецифические эффекты, такие как активация ответа на повреждение ДНК, которые сами по себе могут влиять на локализацию CTCF, нуклеосомную динамику и экспрессию генов? Рекомендуются обсудить альтернативные механизмы наблюдаемой регуляции и, по возможности, использовать генетические (а не только химические) подходы к модуляции G4-структур.
3. Хотя в выводах предлагается комбинированное применение G4-лигандов и ингибиторов BRD4 (например, JQ1) как перспективная противоопухолевая стратегия, в диссертации отсутствуют данные о совместном действии этих агентов. Ингибиторы BET-белков уже показали ограниченную эффективность в клинике из-за компенсаторных механизмов и токсичности. Не усугубит ли добавление G4-лиганда профиль токсичности такой комбинации?
4. Также не обсуждается потенциальная токсичность усиления CTCF-зависимых инсуляторных границ: чрезмерное «укрепление» ТАД-границ может нарушать нормальную регуляцию генов, в том числе опухолевых супрессоров. Этот аспект важен для оценки безопасности G4-таргетной терапии.
5. Исследование связывания G4 с CTCF (и аналогично с BRD4) могло быть проведено полнее. Например, оценивалась ли способность G4 вытеснять консенсусный дуплексный

мотив связывания CTCF из комплекса CTCF-дуплекс?

Указанные замечания носят рекомендательный характер и не препятствуют допуску работы к защите.

Диссертация Павловой Ю.И. представляет собой завершённое научное исследование, которое 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) с дополнением от 01.01.2025, а её автор Павлова Ю.И. заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании семинара отдела функционирования живых систем 25 сентября 2025 г.

Составитель отзыва:

Доктор химических наук,
Главный научный сотрудник
лаборатории мембранных и
биоэнергетических систем
ГНЦ ИБХ РАН

 Шахпаронов Михаил Иванович

117997, г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Тел. +7 (495) 335-01-00
E-mail: office@ibch.ru

Подпись

Шахпаронова М.И. заверяю
Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН,
доктор химических наук




Олейников Владимир Александрович

24.10.2025