

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Кошкина Дарья Олеговна

**Пионерная функция PARP1 в организации хроматина: структурные
перестройки нуклеосом и эффекты ингибиторов PARP**

1.1.10. Биомеханика и биоинженерия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Малюченко Наталия Валериевна

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	14
1.1 Организация и регуляция хроматина эукариот	14
1.2 Белок PARP1	23
1.3 Ингибиторы PARP	34
1.4 Белок p53 в регуляции клеточного гомеостаза.	44
1.5 CRISPR/Cas в современных подходах биоинженерии	51
1.6. Заключение к литературному обзору	56
Глава 2. Материалы и методы	57
2.1 Реактивы, коммерческие наборы, плазмиды	57
2.2 Буферы	58
2.3 Оборудование	62
2.4 Обозначения нуклеосом и праймеров.....	62
2.5 Получение гистоновых октамеров.....	65
2.6 Получение PARP1 человека.....	68
2.7 Получение и очистка p53DBD человека.....	70
2.8 Получение и очистка dCas9.....	72
2.9 Получение позиционированных нуклеосом.....	74
2.10 Подготовка белок-нуклеосомных комплексов	79
2.11 EMSA (electrophoretic mobility shift assay) – изучение электрофоретической подвижности в геле.	81
2.12 Измерение spFRET (single particle Forster resonance energy transfer) раствора нуклеосом.....	81
2.13 Анализ синтеза полимеров АДФ-рибозы методом Вестерн блот	82
2.14 Регистрация спектров поглощения ресвератрола.....	83
Глава 3. Результаты и их обсуждение	84
3.1 Влияние PARP1 на структуру нуклеосом.....	84
3.2 Взаимодействие PARP1 с нуклеосомами в различных структурных состояниях хроматина.....	94
3.3 Изучение характера взаимодействия PARP1 и регуляторных белков p53 и dCas с нуклеосомами.	98
3.4 Молекулярные механизмы действия синтетических ингибиторов (олапариб, талазапариб и велипариб) на ДНК-связывающую и ферментативную активность PARP1	115
3.5 Ингибирующая PARP1 активность ресвератрола.....	120
Заключение.....	123
Основные результаты и выводы	125
Список используемых сокращений	126
Благодарности	131

Список литературы..... 132

Введение

Актуальность темы исследования

Основная структурная единица хроматина – нуклеосома, состоящая из октамера положительно заряженных белков-гистонов и обернутой вокруг него на ~ 1,65 оборота молекулы ДНК (Richmond T.J., Davey C.A., 2003; Luger K. et al., 1997). Такая пространственная организация ДНК способствует эффективной компактизации генома, сохраняя его функциональность за счет ряда регуляторных хроматин-ассоциированных белков, к которым относятся, в частности, пионерные факторы (ПФ). ПФ – класс транскрипционных факторов, способных связываться с неактивным хроматином и открывать ранее недоступные участки ДНК для других регуляторных белков (Iwafuchi-Doi M., 2019; Zaret K.S., Carroll J.S., 2011). Изучение пионерных свойств белков составляет актуальную задачу биоинженерии, поскольку именно они обеспечивают доступ различных регуляторных и редактирующих систем к конденсированному геному, включая транскрипционный аппарат, эпигенетические регуляторы и инструменты геномного редактирования (Zaret K.S., Mango S., 2016).

Традиционно белок PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза1) рассматривается как сенсор разрывов ДНК, обладающий высокой аффинностью к одно- и дунитевым повреждениям (Pandey N., Black B.E., 2021; Satoh M.S., Lindahl T., 1992). PARP1 катализирует синтез поли(АДФ-рибозы), которая служит сигналом для привлечения факторов репарации. Быстрая активация PARP1 в ответ на повреждение ДНК позволяет ему не только запускать репарацию, но и выступать в роли центрального регулятора стрессового ответа клетки (Mortusewicz O. и др., 2007; Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., 2017; Zhang H., Zha S., 2024). Данный механизм является основой разработки таргетных препаратов – ингибиторов PARP (PARPi). PARPi уже более 10 лет эффективно применяются для лечения рака яичников, молочной железы, простаты и поджелудочной железы, ассоциированных с дефектами в системе репарации гомологичной рекомбинации (Kumar S., 2025; Wang F. et al., 2025). Однако их долгосрочное использование сталкивается с двумя основными проблемами: развитием резистентности и значительной токсичностью. Все это значительно ограничивает применение имеющихся препаратов. В связи с этим, особо актуален поиск новых химических соединений с улучшенным профилем безопасности при сохранении или повышении терапевтического эффекта.

В последние годы появляются данные, что PARP1 способен связываться с неповрежденной ДНК (Bell N.A.W. и др., 2021; Rudolph J. и др., 2021), а также с рядом

ядерных факторов и хроматин-связывающих белков, влияя на транскрипционные программы клетки (Krishnakumar R., Kraus W.L., 2010; Lu Y. и др., 2024; Schiewer M.J., Knudsen K.E., 2014). Эта способность позволяет рассматривать PARP1 в качестве фактора с пионерподобной активностью, которая инициирует локальные перестройки хроматина для обеспечения доступа к нуклеосомной ДНК и создает условия для последующего связывания ключевых транскрипционных факторов. Таким образом, наличие нескольких активностей позволяет PARP1 напрямую модулировать важнейшие клеточные процессы – репарации, транскрипции и репликации. Изучение пионерной функции PARP1 является чрезвычайно актуальной задачей, так как конкретные механизмы, с помощью которых он выполняет инициацию ремоделирования хроматина, практически неохарактеризованы. Важно отметить, что хроматин-реорганизующая (пионерная) функция PARP1 имеет существенное прикладное значение, поскольку способна обеспечивать доступ крупных регуляторных комплексов, включая системы на основе CRISPR/dCas, к мишеням в «закрытых» нуклеосомных или гетерохроматиновых областях. Именно отсутствие доступа CRISPR/dCas в целевые участки плотно упакованной хроматиновой ДНК является проблемой биоинженерии в области геномного и эпигеномного редактирования (Horlbeck M.A. и др.; Liu G. et al., 2019; Uusi-Mäkelä M.I.E. et al., 2018; Verkuijl S.A., Rots M.G., 2019). Использование хроматин-реорганизующей активности PARP1 позволяет преодолеть это ограничение.

Особое значение имеет взаимодействие с p53: посредством прямого поли(АДФ-рибозил)ирования и опосредованного взаимодействия, а также через изменение хроматинового окружения, PARP1 влияет на активность p53, что в итоге определяет выбор клеточной судьбы после повреждений (Elkholi R., Chipuk J.E., 2014; Simbulan-Rosenthal C.M. и др., 2001; Fischbach A. et al., 2018). Молекулярные механизмы взаимодействия PARP1-p53, изучены фрагментарно и спектр их совместных функций требует дальнейшего исследования.

Регуляция пионерной функции PARP1 открывает путь к созданию следующего поколения высокоточных биоинженерных инструментов для управления структурой хроматина и экспрессией генов. Кроме того, PARPi, способные подавлять пионерную активность PARP1, вероятно, будут оказывать более широкое противоопухолевое действие, и будут эффективны даже при отсутствии классических дефектов репарации (например, мутаций BRCA), что создает основу для синергии действия PARP1 с иммунотерапией.

Актуальность работы подтверждена успешной экспертизой и финансовой поддержкой министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2024-539 от 24.04.2024 по теме: «Эпигенетика как основа для разработки новых стратегий лечения болезней».

Таким образом, изучение роли PARP1 в организации хроматина и регуляции действия транскрипционных факторов важно для решения фундаментальных и прикладных задач биоинженерии.

Степень разработанности темы исследования

Проблемам структуры хроматина и роли ПФ в его реорганизации посвящены труды отечественных и зарубежных ученых. Существенный вклад в изучение нуклеосомы как основной структурной единицы хроматина внесли R.D. Kornberg, C. Wu, K. Luger, В.М. Студитский и др. (Gaykalova D.A. и др., 2015; Kornberg R.D., Lorch Y., 1999; Tsukiyama T., Wu C., 1995; Walter W., Studitsky V.M., 2001; Chang H.-W. et al., 2016; Luger K. et al., 1997). Их работы определили фундаментальные механизмы компактизации генома и доступа регуляторных белков к ДНК. Важнейшим вкладом данных ученых стало описание молекулярных механизмов, с помощью которых реализуется процессы транскрипции и репликации в условиях плотно упакованного хроматина. Работы таких ученых, как D. Reinberg, S. Yamanaka, A. Young и др., позволили охарактеризовать пионерные транскрипционные факторы и описать их ключевую способность связываться с закрытым хроматином, недоступным для большинства ДНК-связывающих белков, инициируя его локальную реорганизацию (Boyer L.A. и др., 2005; Chambers I., Tomlinson S.R., 2009; Zaret K.S., Mango S., 2016; Iwafuchi-Doi M., 2019; Zaret K.S., Carroll J.S., 2011). В последние 7 лет накопился ряд данных, свидетельствующих о том, что PARP1 обладает некоторыми свойствами пионерного фактора (Kotova E.Y. и др., 2022; Maluchenko N.V., 2019; Maluchenko N.V. и др., 2021a; Rudolph J. и др., 2021; Малюченко Н.В. и др., 2019). В то же время эта неклассическая пионерная функция PARP1 практически не изучена. Имеющиеся данные разрозненны и неполны. Так, например, в группе K. Luger было обнаружено, что PARP1 способен связываться с неповрежденной ДНК (Rudolph J. и др., 2021). Есть фрагментарные данные о функциональной связи PARP1 и p53 в ответе на повреждения ДНК: было показано, что PARP1 модифицирует p53 путем поли(АДФ-рибозил)ирования, влияя на его стабильность, связывание с ДНК и транскрипционную активность (Simbulan-Rosenthal C.M. и др., 2001). Однако молекулярные механизмы пионерподобной

активности PARP1 и ее влияние на реорганизацию хроматина неясны. В частности, совместное действие PARP1 и p53 на уровне нуклеосомы изучено фрагментарно. Остается неполным понимание их кооперативного и конкурентного влияния на организацию нуклеосом, особенно в зависимости от состава гистонового октамера и наличия линкерного гистона, отражающего разные функциональные состояния хроматина.

В отличие от этого, классическая роль PARP1 как основного сенсора разрывов ДНК изучена гораздо глубже. Этой проблематикой активно занимаются ведущие научные группы под руководством J. Pascal, L. Kraus, M. Langelier, а также новосибирская лаборатория под руководством О.И. Лаврик (Luo X. and K., 2012; Zandarashvili L. и др., 2020; Pascal J.M., 2018; Huang D., Kraus W.L., 2022; Kurgina T.A. и др., 2025, 2023; Robu M. и др., 2025). Благодаря их трудам PARP1 был детально охарактеризован как «страж генома», обеспечивающий мгновенное распознавание повреждений ДНК и рекрутирование белков репарации. Также тема получения клинических ингибиторов PARP (PARPi) характеризуется высокой степенью научной и клинической проработки (Malyuchenko N.V. и др., 2015; Murai J. и др., 2012; Andronikou C., Rottenberg S., 2021; Jackson S.P., Bartek J., 2009; Zou Y. и др., 2025). Ее фундамент заложен классическими работами по синтетической летальности, а ключевые механизмы действия – подавление каталитической активности PARP1 и индукция его «траппинга» на ДНК – детально изучены и стали основой для создания ряда клинических препаратов (Murai J. и др., 2012; Lord C.J., Ashworth A., 2017a, 2016; Jackson S.P., Bartek J., 2009). Тем не менее, даже в рамках этой устоявшейся парадигмы актуальной задачей остается переход к соединениям нового поколения, обладающим улучшенным профилем безопасности без потери терапевтической эффективности.

Еще одним малоизученным аспектом функции PARP1 является использование его пионерной функции для повышения эффективности систем CRISPR/Cas, что открывает дополнительные перспективы для биомедицинской биоинженерии. Благодаря работам групп J. Doudna и E. Charpentier была создана универсальная система редактирования генома CRISPR-Cas9, которая превратилась в мощнейший инструмент молекулярной биологии и прикладной биоинженерии (Jinek M. и др., 2012; Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A., 2012). Разработанный Gilbert, Weissman и др. платформенный подход на основе неактивной dCas9 использует ее как каркас для таргетной доставки функциональных доменов (Gilbert L.A. и др., 2013). Присоединение к dCas9 эффекторов,

например эпигенетических модификаторов, позволяет осуществлять направленное управление транскрипцией. Ключевым ограничением этих технологий является неспособность комплексов на основе Cas9 или dCas9 проникать в плотно упакованные участки хроматина, что делает значительную часть геномных мишеней недоступной (Horlbeck M.A. и др.). Решение этой проблемы может заключаться в использовании способности PARP1 реорганизовывать хроматин и открывать конденсированные участки ДНК, что может обеспечить доступ системам CRISPR/dCas к ранее недостижимым локусам. Таким образом, исследование пионерной активности PARP1 имеет важное прикладное значение для решения биоинженерных задач в области эпигеномного редактирования.

Цель настоящей работы – исследовать структурные основы пионерной функции PARP1, а именно: определить молекулярный механизм, с помощью которого PARP1 осуществляет реорганизацию нуклеосом, и оценить модулирующее влияние на этот процесс регуляторных факторов (p53, dCas9) и фармакологических ингибиторов PARP1.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать влияние белка PARP1 на пространственную организацию нуклеосом, реконструированных на разных ДНК-матрицах и отличающихся источниками гистонов.
2. Выявить влияние PARP1 на организацию хроматосом, содержащих линкерный гистон H1.0.
3. Определить структурные изменения H2A.Z-содержащих нуклеосом под действием PARP1.
4. Оценить влияние PARP1 на взаимодействие регуляторных белков (p53 и dCas9) с нуклеосомой.
5. Уточнить молекулярные механизмы действия ингибиторов PARP1 на нуклеосомном уровне.
6. Оценить ингибирующую PARP1 активность ресвератрола в нуклеосомной системе.

Научная новизна работы

Впервые установлено, что белок PARP1 способен реорганизовывать нуклеосому по всей длине ДНК, включая как линкерную, так и коровую области. При этом, подобная нуклеосом-реорганизующая активность PARP1 не зависит от набора посттрансляционных модификаций гистонов, нуклеотидной последовательности ДНК, а

также наличия или отсутствия линкерной области нуклеосомы. Показано, что даже в отсутствии каталитической активности PARP1 способен вытеснять линкерный гистон H1.0 из реконструированных *in vitro* хроматосом. Такой механизм конкурентного вытеснения H1.0 PARP1 на уровне отдельных нуклеосомных частиц может служить основой для локального ремоделирования хроматина в клетке. Выявленным новым фактором является зависимость этого процесса от длины линкерной ДНК: при коротких линкерах (20 п.н.) вытеснение происходит эффективно, тогда как при удлинении линкера до 40 п.н. способность PARP1 конкурировать с H1.0 резко снижается. Это указывает на то, что структурный контекст хроматина может являться критическим регулятором пионерной функции PARP1. Использование системы dCas в качестве высокочувствительного зонда позволило впервые зафиксировать увеличение доступности нуклеосомной ДНК, индуцированное PARP1. Также показано, что PARP1 повышает доступность нуклеосомной ДНК для связывания белка p53DBD в нуклеосомах, содержащих гистон H2A.Z. На созданной нуклеосомной платформе проведена, первая прямая сравнительная оценка механизмов действия ингибиторов PARP, в результате которой для олапариба и талазопариба был зафиксирован феномен траппинга, аналогичный наблюдаемому *in vivo*. Это доказывает, что данный эффект является внутренним свойством комплекса «PARP1-ингибитор-нуклеосома», что позволяет использовать нуклеосомы в качестве альтернативы клеточным системам для скрининга и определения молекулярного механизма действия ингибиторов PARP1. Благодаря разработанному подходу была впервые обнаружена и продемонстрирована способность природного соединения ресвератрола ингибировать активность фермента PARP1, а также уточнен тип его ингибирующего действия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии фундаментального механизма пионерной функции PARP1. Установлено, что PARP1 способен универсально реорганизовывать нуклеосомную структуру и обеспечивать доступ к ДНК независимо от гистонового состава, что подтверждает его роль как ключевого фактора АТФ-независимого ремоделинга. Кроме того, впервые показана кооперация PARP1 с фактором p53, эффективность которой модулируется структурным состоянием хроматина, что вносит вклад в понимание тонкой регуляции транскрипционного ответа на стресс. Практическая значимость работы также определяется пониманием механизмов действия ингибиторов PARP на нуклеосомном уровне на основе использования простой, хорошо

контролируемой *in vitro*-платформы на основе позиционированных нуклеосом и их комплексов с PARP1, пригодной для первичного скрининга и сравнительной оценки ингибиторов PARP и других малых молекул до их анализа с использованием клеточных и *in vivo* моделей. Кроме того, выявленная универсальная пионерная активность PARP1 создаёт основу для оптимизации технологий на основе CRISPR/dCas в задачах прикладной биоинженерии. Целенаправленная активация PARP1 или его рекрутирование к специфическим локусам может быть использовано для предварительной реорганизации компактного хроматина, что значительно повысит эффективность связывания dCas-конструктов и последующего эпигенетического редактирования или модуляции экспрессии генов. Данный подход открывает новые пути для преодоления ключевого ограничения генной терапии – низкой доступности мишеней в нуклеосомной ДНК.

Методология и методы исследования

Методология исследования была основана на технике реконструкции нуклеосомных комплексов *in vitro* из очищенных компонентов с последующим комплексным структурно-функциональным анализом. На первом этапе методами молекулярной биологии и биоинженерии были получены и очищены (многоступенчатой FPLC хроматографией) рекомбинантные белки человека: гистоны, PARP1 и p53DBD. На втором этапе их свойства исследовали с помощью взаимодополняющих методов: электрофорез в нативном и денатурирующем геле использовали для контроля состояния белков, гель-шифт анализ (EMSA) - для анализа специфического связывания с нуклеосомами, а spFRET – для изучения структурных изменений нуклеосомных комплексов с белками. В экспериментах с PARP1 также использовали методы вестерн-блоттинга. Все эксперименты включали соответствующие контроли и были статистически обеспечены независимыми повторами.

Положения, выносимые на защиту

1. PARP1 реорганизует нуклеосомы по всей длине ДНК, действуя независимо от состава гистонового кора, его посттрансляционных модификаций, а также последовательности и длины самой ДНК. Наиболее выраженный эффект наблюдается для нуклеосом, содержащих гистоновый вариант H2A.Z. При этом даже в отсутствие каталитической активности PARP1 способен вытеснять линкерный гистон H1.0 из хроматосом с короткими линкерными участками ДНК (20 п.н.), тогда как при увеличении длины линкера до 40 п.н. вытеснение H1.0 не происходит.

2. Связывание PARP1 с нуклеосомами формирует платформу для рекрутирования регуляторных белков: реорганизованные PARP1 нуклеосомы с каноническим гистоновым октамером становятся доступными мишенями для dCas9, тогда как H2A.Z-содержащие нуклеосомы с присоединённым PARP1 приобретают способность связываться с p53.
3. На нуклеосомном уровне клинически применяемые ингибиторы PARP1 подавляют каталитическую активность фермента и индуцируют его траппинг (заякоривание). Этот эффект является внутренним свойством нуклеосомных комплексов «нуклеосома–PARP1–ингибитор» и может быть использован для бесклеточного скрининга ингибиторов PARP1. В отличие от изученных ингибиторов PARP1, ресвератрол ингибирует ферментативную активность PARP1 по иному механизму: он снижает аффинность PARP1 к нуклеосомной ДНК, не вызывая траппинга.

Степень достоверности данных

Для написания обзора литературы были использованы актуальные публикации в рецензируемых научных изданиях, соответствующие теме диссертации по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия. Полученные в ходе исследования результаты воспроизводимы и обработаны с использованием статистических программ, а также программных обеспечений для работы с изображениями. В работе использованы традиционные и современные методы микробиологии, биохимии, молекулярной биологии и биофизики.

Личный вклад автора

Основные результаты, представленные в диссертационной работе, получены лично автором. Его вклад включает анализ научной литературы, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию данных, подготовку публикаций и представление результатов на научных конференциях. В работе Koshkina et. al. *Biomolecules*, 2024, автор участвовал в разработке дизайна эксперимента по изучению влияния ресвератрола на связывания PARP1 с нуклеосомами и его каталитическую активность, проведены исследования методом вестерн-блота, выполнено спектроскопическое изучение ресвератрола, а также анализ полученных данных и интерпретация результатов. В работе Koshkina D.O. et. al. *Cells*, 2025 автором спланированы и реализованы эксперименты по изучению неклассического H1-подобного связывания PARP1 с нуклеосомами и хроматосомами, включающие подготовку

нуклеосомных и хроматосомных образцов с расположением флуорофоров в различной конфигурации, проведение биохимических и биофизических исследований, участие в анализе и интерпретации результатов. В работе Кошкина Д.О. и соавт. Вестник МГУ серия 16, 2025, автором предложена концепция PARP1-опосредованных изменений в нуклеосоме, модулирующихся действием белка р53. Автором проведена разработка дизайна экспериментов, подготовка нуклеосомных и белковых образцов, проведение исследований по совместному взаимодействию агентов, а также анализ и интерпретация результата, подготовлен текст статьи и сформулированы выводы о роли р53 в регуляции структуры нуклеосом. В работе Maluchenko et. al, Cells, 2022 автор принимал непосредственное участие в подготовке белковых и нуклеосомных препаратов, проведении исследований, статистической обработке и обсуждении изучаемых механизмов. В работе Лобанова А.А. и соавт Вестник МГУ серия 16, 2024 автор принимал участие в разработке подхода гель-электрофореза для классификации ингибиторов PARP1 и PARP2, участвовал в подготовке фермент-содержащих комплексов и оптимизации протоколов электрофоретического разделения и анализа миграции комплексов и интерпретации результатов. В работе Лобанова А.А. и соавт. Вестник МГУ серия 16, 2025 автор принимал участие в оптимизации методики регистрации связывания PARP1 на Ni-NTA-агарозных шариках в режиме реального времени, а также интерпретации результатов. В работе Малюченко Н.В. и соавт. Acta Naturae, 2021 автор внес вклад в развитие концепции функционирования поли(АДФ-рибозил)ирования, участвовал в анализе литературы и написании части текста работы.

Публикации по теме работы

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова.

1. Koshkina D.O., Maluchenko N.V., Korovina A.N., Lobanova A.A., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Resveratrol Inhibits Nucleosome Binding and Catalytic Activity of PARP1 // Biomolecules. — 2024. — vol. 14, №11. — pp. 1398–1398. EDN: BSXGZM. Импакт-фактор 4,8 (JIF) (1,27/0,30)¹.
2. Koshkina D.O., Maluchenko N.V., Nilov D.K., Lyubitelev A.V., Korovina A.N., Pushkarev S.S., Armeev G.A., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Non-Classical H1-like PARP1 Binding to Chromatosome // Cells. — 2025. — vol. 14, №17. — pp. 1309–1309. EDN: NXIWPY. Импакт-фактор 5,2 (JIF) (2,20/0,30)¹.

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах

3. Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Новичкова А.М., Феофанов А.В., Студитский В.М. PARP1-зависимые изменения нуклеосомной организации: возможное участие p53 // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2024. — Т. 80, №3S. — С. 67–72. EDN: SWAJFR. Импакт-фактор РИНЦ 1,181 (2022) (0,69/0,30)¹.
4. Maluchenko N.V., Koshkina D.O., Korovina A.N., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Interactions of PARP1 Inhibitors with PARP1-Nucleosome Complexes // Cells. — 2022. — vol. 11, №21. — pp. 3343–3343. EDN: NIZLIC. Импакт-фактор 5,2 (JIF) (1,27/0,20)¹.
5. 5.1 Малюченко Н.В., Кошкина Д.О., Феофанов А.В., Студитский В.М., Кирпичников М.П. Полифункциональный код поли(АДФ-рибозилирования) // Acta Naturae. — 2021. — Т. 13, №2. — С. 58–69. EDN: MAMWOK. Импакт-фактор 2,0 (JIF) (1,39/0,20)¹.
5.2 Maluchenko N.V., Koshkina D.O., Feofanov A.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Poly(ADP-Ribosyl) Code Functions // Acta Naturae. — 2021. — vol. 13, №2. — pp. 58–69. EDN: ТКННВW. Импакт-фактор 2,0 (JIF) (1,39/0,20)¹.
6. Лобанова А.А., Коровина А.Н., Кошкина Д.О., Черникова П.А., Феофанов А.В., Студитский В.М., Нилов Д.К., Малюченко Н.В. Гель-электрофорез как метод классификации ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз 1 и 2 // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2024. — Т. 79, №4. — С. 322–329. EDN: RGFCPZ. Импакт-фактор РИНЦ 1,181 (2022) (0,92/0,10)¹.
7. Лобанова А.А., Саулина А.А., Гераськина О.В., Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Феофанов А.В., Студитский В.М. Оценка связывания ингибиторов PARP в режиме реального времени на основе Ni-NTA-агарозных шариков // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. — 2025. — Т. 80, №3S. — С. 73–80. EDN: MQHRBZ. Импакт-фактор РИНЦ 1,181 (2022) (0,92/0,10)¹.

Апробация работы

Апробация результатов диссертационной работы осуществлялась на международных и всероссийских конференциях, симпозиумах, школах и научных фестивалях. Основные результаты, связанные с исследованием PARP1-зависимых изменений структуры нуклеосом, кооперативным действием PARP1 и p53, влиянием гистоновых вариантов H2A.Z и линкерных гистонов, а также с разработкой и тестированием ингибиторов PARP на нуклеосомных моделях, были представлены в форме устных и стендовых докладов на XXV Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН–ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 2019, 2025), на VI, IX и XI Всероссийских конференциях по молекулярной онкологии (Москва,

2019, 2021, 2022, 2024), на VI и X Междисциплинарных конференциях «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (Нижний Новгород, 2020; Санкт-Петербург, 2025), на III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2022), а также на конференции «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 2025).

Результаты работы докладывались на международных мультikonференциях «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology» (BGRS/SB-2022, BGRS/SB-2024; Новосибирск, 2022, 2024), на российских и международных конференциях по крио-электронной микроскопии (RICSEM-2020, 2021, 2023, 2025; Черноголовка, Москва), на конференциях «Smart NanoMaterials» и SPb-POEM (Париж, 2021; Санкт-Петербург, 2020, 2021), конгрессе IUBMB–FEBS–PABMB (Лиссабон, 2022), 44-м конгрессе FEBS (Краков, 2019), конференциях «Current Trends and Achievements in Life Science» и ICG-19 Youth Symposium (Шэньчжэнь, 2023, 2024), а также на международной конференции MEDOPTICS-2022 (Олюдениз, Турция, 2022).

Отдельные результаты, касающиеся влияния линкерного гистона H1.0 на структуру нуклеосом, spFRET-анализа взаимодействий лекарственных соединений с нуклеосомными комплексами, а также разработки тест-системы на основе моноклеосомных наночастиц для изучения ингибиторов PARP, представлены на конференциях «Российская конференция по электронной микроскопии», «Future of Biomedicine 2025», школе молодых ученых «Генетика и эпигенетика: механизмы, структура, функция», Фестивале науки «НАУКА 0+», конференциях «Ломоносов-2019» и «Ломоносовские чтения» (Москва, 2018–2025).

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка сокращений, списка литературы, включающего 391 наименование. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, содержит 54 рисунка и 3 таблицы.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Организация и регуляция хроматина эукариот

1.1.1 Уровни организации хроматина

В эукариотических клетках геном организован в хроматин – динамическую надмолекулярную структуру, образованную ДНК и ассоциированными с ней белками, которые обеспечивают компактизацию и регуляцию доступности генетического материала в клетке (Bannister A.J., Kouzarides T., 2011). Базовой единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из 147 пар оснований ДНК, обёрнутых вокруг октамера положительно заряженных белков гистонов (Luger K., 1997). Это обеспечивает первый уровень компактизации генома, формируя барьер, ограничивающий доступ молекулярных комплексов к ДНК. Между собой нуклеосомы соединены линкерным регионом ДНК, с которым взаимодействуют белки, участвующие в дальнейшей компактизации генома (Fyodorov D.V. и др., 2018). Дальнейшая компактизация хроматина обусловлена уплотнением хроматиновых нитей, образующих сложноорганизованные домены, топологически ассоциированные области и фибриллярные структуры, обеспечивающие пространственную архитектуру генома и регуляцию его функционального состояния (Sandhu K.S. и др., 2012). Сложная иерархическая (Рис. 1) организация хроматина требует строгой пространственно-временной регуляции и точной координации его структуры и функций. Регуляция состояния хроматина осуществляется посредством эпигенетических механизмов, включающих химические модификации непосредственно ДНК и гистонов, а также его динамической реорганизации под действием регуляторных белков (Handy D.E., Castro R., Loscalzo J., 2011; Martire S., Banaszynski L.A., 2020; Bannister A.J., Kouzarides T., 2011).

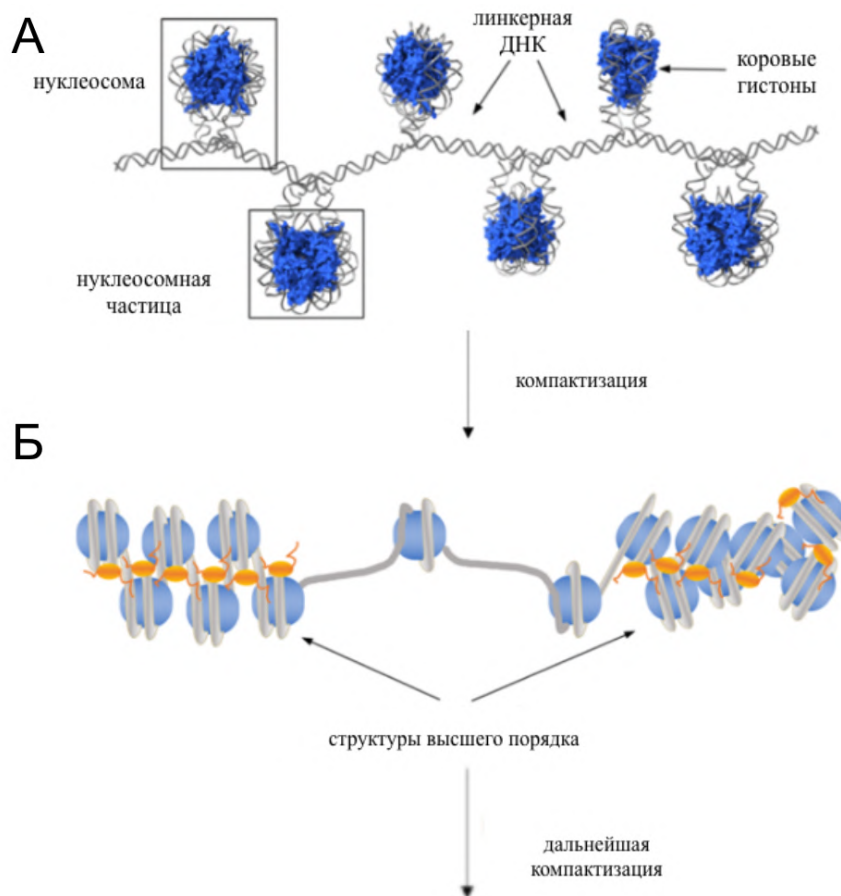


Рисунок 1 – Структурная иерархическая организация хроматина

Источник: (Zhou В.-R., Bai Y., 2019) с изменениями. Примечания: А – нуклеосомная организация хроматина; Б – структуры хроматина высшего порядка.

1.1.2 Строение и организация нуклеосом

Структурной единицей эукариотического хроматина является нуклеосома. Она состоит из октамера положительно заряженных гистоновых белков, вокруг которых ДНК обернута в ~1,65 раза (Luger K. et al., 1997). Центральный участок нуклеосомной ДНК, состоящий из 144–147 пар нуклеотидов, в комплексе с гистоновым октамером формирует нуклеосомный кор (Luger K., 1997). Нуклеосомный кор не только обеспечивает компактизацию ДНК, но и служит одним из основных центров регуляции доступности ДНК (Cutter AR H.J., 2015; North J.A. et al., 2012). Это связано с тем, что состав кора, а именно наличие вариантных форм гистонов, а также набор посттрансляционных модификаций определяют структурное и функциональное состояние хроматина (Martire S., Banaszynski L.A., 2020; Bannister A.J., Kouzarides T., 2011).

Октамер гистонов образован центральным тетрамером (H3–H4)₂, к которому с обеих сторон присоединены два димера H2A–H2B (Workman J.L., Kingston R.E., 1992, 1998; Kornberg R.D., Thomas J.O., 1974). У коровых гистонов есть общий структурный план - гистоновый фолд, состоящий из трех альфа-спиралей, разделенных петлями. Белки располагаются под определенным углом друг к другу и формируют нековалентные взаимодействия контактов, что обеспечивает эффективное формирование гетеродимеров H2A-H2B и H3-H4 (Arents G. и др., 1991; Richmond T.J., Davey C.A., 2003; Luger K., 1997). За формирование гистонового кора отвечают гидрофобные и электростатические взаимодействия между гистоновыми субъединицами и ДНК. В тетрамере (H3-H4)₂ ключевую роль играют слабо выраженные гидрофобные взаимодействия между гистонами H3, тогда как связывание тетрамера и димера (H2A-H2B) обеспечивается взаимодействиями гистона H4 и гистона H2B, в основном поддерживаемые благодаря электростатическим контактам (Luger K., 1997). Благодаря такой организации, тетрамер стабилен при физиологических условиях, а димеры являются более лабильными, что обеспечивает динамику нуклеосомной структуры (Shi D., Huang Y., Bai C., 2023; Armeev G.A. et al., 2019; Workman J.L., Kingston R.E., 1998).

Все N-концевые участки гистонов неструктурированы и выступают за пределы нуклеосомного комплекса. Внутри нуклеосомы гистоновые хвосты благодаря своей гибкости укладываются между витками ДНК (Luger K., 1997). На этих участках есть сайты ковалентных модификаций (в первую очередь ацетилирования и метилирования лизинов), функционально связанных с регуляцией транскрипции. Наиболее задействованы в этих процессах N-терминальные участки гистонов H3 и H4 (Grant P.A., 2001; Bannister A.J., Kouzarides T., 2011; Berger S.L., 2002; Peng Y. и др., 2021), что связано с их физико-химическими особенностями. Неструктурированность и отсутствие устойчивой вторичной структуры увеличивает их эффективный радиус захвата и способствует распознаванию и связыванию с белками- “ридерами” и “райтерами” (Sanchez R., Zhou M.-M., 2011; Zaware N., Zhou M.-M., 2019; Hyun K. et al., 2017) аналогично описанному в 2000 году механизму “fly-casting” (Shoemaker BA P.J., 2000). Белки “ридеры” и “райтеры” обеспечивают функциональную избирательность эпигенетических меток, регулируя транскрипционную активность (Hyun K. et al., 2017). Белки “ридеры” содержат структурные модули, образующие высокоспецифичные сайты распознавания остатков, к ним относятся PHD-, bromo-, хромодомены. Например, PHD-домены, как показано для ряда эпигенетических факторов, вовлечены в распознавание

метиляции и/или ацетилирования лизинов N-концевых участков гистона H3 (Sanchez R., Zhou M.-M., 2011). Так, H3K4me3 – каноническая “активирующая” метка промоторов генов (Bernstein B.E. et al., 2002). В целом, N-терминальные участки гистонов вовлечены в широкий спектр клеточных процессов, включая регуляцию доступности ДНК посредством подвижности нуклеосом: дыхания, слайдинге и тд., а также выступают носителями сайтов посттрансляционных модификаций и связывания регуляторных белков (Li Z., Kono H., 2016; Peng Y. и др., 2021). Кроме этого, в этих участках представлены сайты посттрансляционных модификаций, а также положительно заряженные участки, которые взаимодействуют с ДНК, модулируя динамику нуклеосомы, а также межнуклеосомные контакты (Kouzarides T., 2007). С-терминальные участки гистонов являются преимущественно неструктурированными регионами, обогащенными заряженными аминокислотами, которые выступают за пределы нуклеосомного ядра и участвуют в контактах с ДНК и соседними нуклеосомами (Kouzarides T., 2007).

Следующая стадия организации хроматина - хроматосома, представляющая собой комплекс нуклеосомы и линкерного гистона H1 типа (Рис. 2). Линкерные гистоны H1 типа образуют обширное семейство архитектурных ДНК-связывающих белков ядра эукариот. Для них характерна трехдоменная организация: упорядоченный глобулярный домен окружен неструктурированными N- и С-концевыми хвостами (Нао F. и др., 2021; Woods D.C., Wereszczynski J., 2020; Vyas P., Brown D.T., 2012). Глобулярный домен является высококонсервативным по последовательности среди вариантных линкерных гистонов и необходим для специфического связывания с нуклеосомой, формируя ключевые контакты с областью входа/выхода ДНК нуклеосомы. С-концевой участок богат положительно заряженными аминокислотами, преимущественно лизином, и активно взаимодействует с ДНК (Hergeth S.P., Schneider R., 2015). N-концевой участок также структурно неупорядочен, однако его длина и свойства несколько отличаются. Благодаря наличию гидрофобных остатков в дистальном фрагменте “хвоста”, этот участок способен тонко модулировать аффинность и кинетику связывания различных вариантных форм линкерного гистона с нуклеосомами, хотя его прямой вклад в эти взаимодействия невелик. В ряде работ показано, отличия вариантных гистонов именно в этом участке определяют стабильность связывания H1 с хроматином (Vyas P., Brown D.T., 2012).

Гистон H1 представлен в организме млекопитающих в количестве 11 различных белков: 7 соматических (H1.1–H1.5, H1.0, H1.10) и 4 герминативных, каждый имеет свои особенности экспрессии и функции [15; 16]. Линкерный гистон H1.0 характеризуется более высокой способностью к компактизации хроматина по сравнению с другими вариантами H1, что обусловлено его структурными особенностями и повышенным сродством к нуклеосомам (Clausell J. и др., 2009).

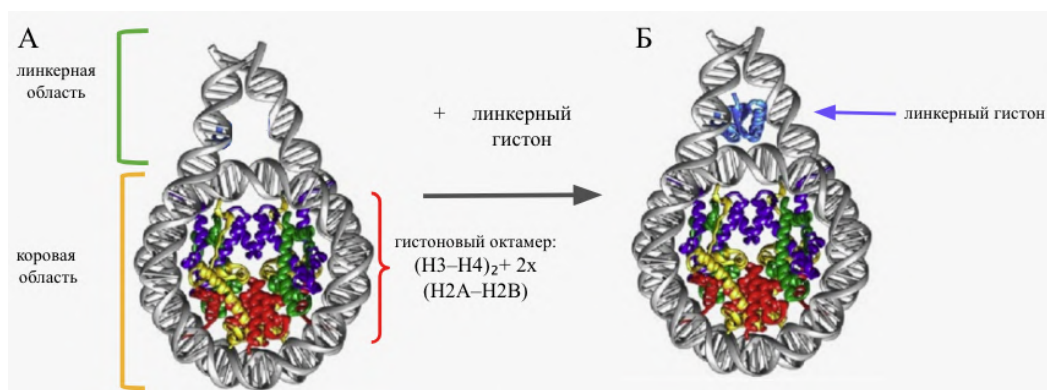


Рисунок 2 – Строение нуклеосомы и хроматосомы.

Источник: (Wang S. et al., 2021) с изменениями. Примечание: А – Зеленой скобкой обозначена линкерная ДНК, оранжевой скобкой обозначена коровая область, состоящая из ДНК ~147 пар нуклеотидов и гистонового октамера, содержащего тетрамер коровых гистонов H3 (синий) –H4 (зелёный) и два димера H2A (жёлтый) – H2B (красный). Б – Добавление линкерного гистона в линкерную область приводит к образованию хроматосомы, что отражает переход на более высокий уровень организации хроматина.

Вариант H1.0 характерен для терминально дифференцированных клеток и отличается высоким положительным зарядом среди вариантных форм линкерных гистонов, что обусловлено аминокислотным составом его С-терминального участка (Caterino TL H.J., 2011; Kowalski A., 2016; Terme J.-M. и др., 2011). Этот участок обеспечивает повышенное сродство к нуклеосомам, что приводит к более эффективной H1-зависимой конденсации хроматина (Gibbs E.B., Kriwacki R.W., 2018; Burge N.L. et al., 2022). Учитывая его способность усиливать компактизацию, в нашей работе мы использовали данный вариант H1.0 гистона для моделирования закрытого хроматина. Ряд работ показывает, что изменение содержания вариативного состава H1 влияет на доступность нуклеосомной ДНК для транскрипционных факторов и ферментов, включая PARP1 (Krishnakumar R. et al., 2008; Serna-Pujol N. et al., 2022; Lu Y. и др., 2024). В

частности, показано, что H1-зависимая компактизация хроматина ограничивает доступ PАРP1 к ДНК-повреждениям и иным регуляторным участкам, а снижение количества H1.0 и/или его замещением на другие варианты формы сопровождается перестройкой транскрипционных программ и изменением чувствительности клетки к стрессу.

1.1.3 Вариантные гистоны и их роль в организации хроматина

Экспрессия канонических гистонов H3, H4, H2A и H2B жёстко приурочена к S-фазе клеточного цикла, где синтезированные белки поступают на нуклеосомы, формирующиеся за репликационной вилкой. Биосинтез гистонов начинается при переходе G1/S и обеспечивает двукратное увеличение их количества к завершению репликации ДНК (Armstrong C., Spencer S.L., 2021). Основная функция канонических гистонов – компактизация реплицирующейся ДНК, тогда как в регуляции локальных перестроек хроматина их роль ограничена. Эту функцию берут на себя варианты гистоны, которые депонируются репликационно-независимыми путями и точно замещают канонические гистоны в специфических тканях или областях хроматина, а также при смене клеточного состояния и состояния ДНК (Рис. 3) (Hegazy Y.A. и др., 2024; Mendiratta S., Gatto A., Almouzni G., 2019). К основным и наиболее изученным, неспецифичным по тканям гистонам относятся следующие: H2A.Z располагается в промоторах, энхансерах, а также на границах гетерохроматина, (Guillemette B. и др., 2005; Oberdoerffer P., Miller K.M., 2023; Babiarz J.E., Halley J.E., Rine J., 2006); H2X-DDR детектируется в клетке при репликационном стрессе, участвует в поддержании стабильности генома (Oberdoerffer P., Miller K.M., 2023; Georgoulis A. et al., 2017; Rahmanian N., Shokrzadeh M., Eskandani M., 2021); macroH2A выступает в качестве маркера репрессивных доменов хроматина, связан с периферическим гетерохроматином (Oberdoerffer P., Miller K.M., 2023); гистоном H3.3 обогащены нуклеосомы в эухроматине, а именно в активно транскрибируемом и динамичном хроматине, поддерживая дифференцировку и устойчивую работу генов (Ahmad K., Henikoff S., 2002; Talbert P.B., Henikoff S., 2017; Chow C.-M. и др., 2005); CENP-A также является вариантом гистона H3, хотя и имеет отличное историческое название, он замещает канонический H3 в центромерных нуклеосомах и создает платформу для сборки кинетохора, эпигенетически задавая положение центромеры, тем самым внося существенный вклад в расхождение хромосом (Renaud-Pageot C. и др., 2022; Panchenko T.

et al., 2011; Talbert P.B., Henikoff S., 2017; Yoda K. et al., 2000; Ali-Ahmad A., Sekulić N., 2020).

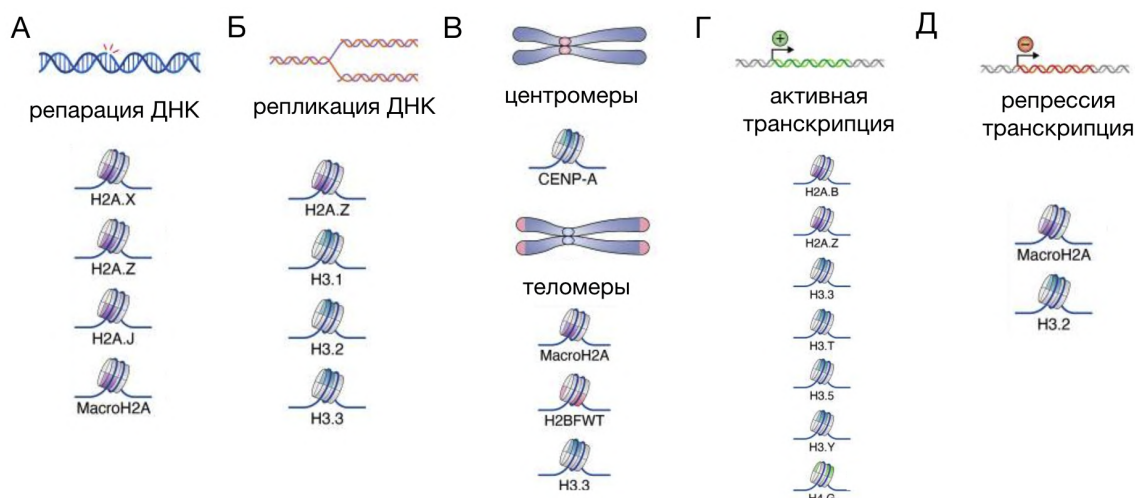


Рисунок 3 – Разнообразие вариантных гистонов в зависимости от состояния хроматина

Источник: (Negazy Y.A. и др., 2024) с изменениями. Примечания: представлены гистоны: А – ассоциированные с репарацией ДНК, Б – ассоциированные с репликацией ДНК, В – располагающиеся в области центромеры, Г – транскрипционно активные участки хроматина, Д – транскрипционно неактивный хроматин

1.3.4 H2A.Z: структура, распределение в хроматине и функции

Вариантный гистон H2A.Z является одним из наиболее изученных гистонов. Он является высококонсервативным вариантом H2A и изменяет структуру и динамику нуклеосом, расположенных в промоторах и энхансерах, меняя их архитектуру (Giaimo B.D. и др., 2019; Lewis T.S. и др., 2021; Cole L. и др., 2021). Кроме того, H2A.Z локализуется на границах гетерохроматиновых доменов, формируя барьер, препятствующий распространению компактизации. Благодаря этому он участвует в регуляции транскрипции, репарации ДНК и стрессового ответа клетки (Cole L. и др., 2021). Говоря о структурных особенностях H2A.Z в сравнении с каноническим вариантом, важно отметить особенности С-терминального хвоста гистона. Отличия в аминокислотной последовательности этого участка белка приводят к перераспределению прочности контактов в октамере: происходит усиление взаимодействия со вторым димером H2A.Z-H2B, и ослабление контактов с тетрамером (H3-H4)₂, что повышает пластичность нуклеосомы и может способствовать как более легкой диссоциации таких димеров в одних условиях, так и стабилизации октамера в других условиях (Bowerman S.,

Wereszczynski J., 2016; Weber C.M., Henikoff J.G., Henikoff S., 2010). В сравнении с каноническим H2A гистоном C-конец H2A.Z лишён четырёх аминокислотных остатков, среди которых три положительно заряженных лизина, что ослабляет его контакты с ДНК (Li S., Wei T., Panchenko A.R., 2023), что в свою очередь понижает нуклеосомный барьер для транскрипции, а также облегчает диссоциацию ДНК от гистонов в области входа/выхода ДНК нуклеосомы (Lewis T.S. и др., 2021).

Распределён H2A.Z по геному в основном в областях промоторов и энхансерах. Для дрожжей показано, что он локализуется в промоторах генов полимеразы 2, где он фланкирует -1 и +1 нуклеосомы; в гетерохроматиновых областях хроматина его практически не детектируют (Guillemette B. и др., 2005). Для эпителиальной клеточной линии молочной железы человека MCF-10A показано, что при нокдауне H2A.Z возникают значительные перестройки промоторной архитектуры (Cole L. и др., 2021). Кроме того, в клетках млекопитающих показано, что в областях TSS и на +1 нуклеосомах наблюдается высокое количество H2A.Z, где он дестабилизирует нуклеосомы для активной транскрипции (Hu G. и др., 2013; Cole L. и др., 2021). В целом, уровень заселённости H2A.Z на промоторах и энхансерах коррелирует с уровнем экспрессии генов в клетке (Hu G. и др., 2013).

В ряде работ показано, что H2A.Z играет ключевую роль в формировании границ теломерного гетерохроматина (Eirin-Lopez J., Ausio J., 2007; Zhou B.O. et al., 2010). Он препятствует распространению сайленсинга в субтеломерные регионы, что приводит к подавлению транскрипции приграничных генов (Babiarz J.E., Halley J.E., Rine J., 2006). Ацетилирование хвостов гистонов H4 и H2A.Z критично для барьерной активности в этой области хроматина: показано, что при мутации лизинов в хвостах этих гистонов наблюдаются нарушения в границе между эухроматином и теломерным гетерохроматином, а также распространение области компактизации хроматина (Guillemette B. и др., 2005; Babiarz J.E., Halley J.E., Rine J., 2006; Meneghini M.D., Wu M., Madhani H.D., 2003).

Помимо описанных выше функций, H2A.Z также вовлечён в процессы репарации двухцепочечной ДНК. Он активно депонируется в области двухцепочечных разрывов ДНК, что сопровождается временной конденсацией, которая ограничивает область разрыва, и дальнейшим рекрутированием компонентов системы репарации. Далее H2A.Z также активно удаляется из этих областей, при этом происходит повышенное

ацетилирование H4, необходимое для локального разрыхления этого участка хроматина (Zlatanova J., Thakar A., 2008; Li S., Wei T., Panchenko A.R., 2023).

H2A.Z формирует менее стабильный хроматин: он ослабляет межнуклеосомные взаимодействия и облегчает ремоделирование хроматина (Moos H.K. и др., 2025; Li S., Wei T., Panchenko A.R., 2023; Dias J.K. и др., 2026). Кристаллографические данные указывают на изменения в области кислого патча и гидрофобного ядра октамера, что влияет на термодинамическую стабильность H2A.Z нуклеосомы (Horikoshi N. et al., 2016; Morioka S. et al., 2023; Wakamori M. et al., 2015). Данные HS-AFM показывают, что эти изменения обеспечивают динамичное позиционирование нуклеосом, что согласуется с ролью H2A.Z в регуляции доступности ДНК для факторов транскрипции. Ключевой вклад вносит именно N-концевой хвост H2A.Z.1, тогда как замещение C-концевого хвоста на каноническую последовательность не нарушает способность нуклеосомы к быстрому скольжению (Morioka S. et al., 2023). В целом, ряд работ объяснил структурные основы нестабильности нуклеосом с H2A.Z. В канонической нуклеосоме гистоновый октамер $(H2A-H2B)_2-(H3-H4)_2$ плотно обёрнут ДНК. Замена H2A на H2A.Z вносит несколько критических изменений (Рис. 4) (Li S., Wei T., Panchenko A.R., 2023). Во-первых, изменённая область L1-петли: у H2A.Z эта петля, участвующая в контактах с соседним димером H2A-H2B, имеет другую конформацию, что ослабляет взаимодействия внутри октамера и снижает энергию, необходимую для диссоциации димеров H2A.Z-H2B. Во-вторых, изменён состав аминокислот в кислом патче на поверхности нуклеосомы, который служит сайтом связывания для многих регуляторных белков (включая ремоделирующие комплексы); это меняет аффинность к факторам, стабилизирующим хроматин высокой плотности. В-третьих, мутации в гидрофобных контактах между H2A.Z и H3 делают нуклеосому более податливой к разворачиванию под действием механического напряжения или ремоделеров. Учитывая, что нуклеосомы с H2A.Z характеризуются повышенной динамической нестабильностью и ассоциированы с открытой конформацией хроматина, в нашей работе мы использовали этот гистоновый вариант как модель активного хроматина.

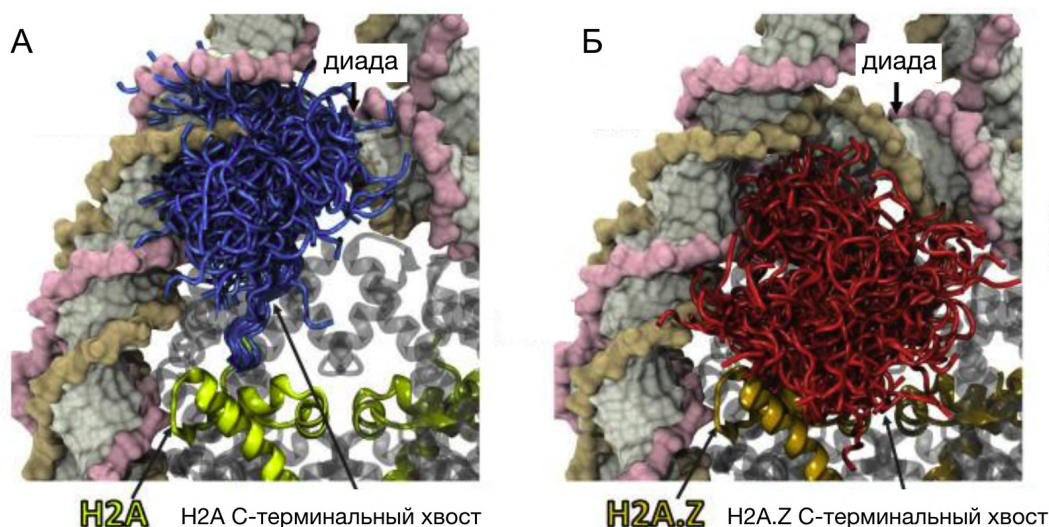


Рисунок 4 – Структурные конформации С-концевых хвостов H2A и H2A.Z вблизи диады

Источник: . Примечание: А – синим цветом отмечены конформации С-концевого хвоста H2A (остатки: 121 – 130) Б – красным цветом отмечены конформации С-концевого хвоста H2A.Z (остатки: 123 – 128)

1.2 Белок PARP1

1.2.1 Общие сведения

PARP1 является одним из наиболее распространённых ядерных белков и вовлечён во множество клеточных процессов, таких как репарация ДНК, репликация, транскрипция, регуляция клеточного цикла и программируемая клеточная гибель (Eisemann T., Pascal J.M., 2020; Kraus W.L., 2008). Во многом широкий функциональный спектр PARP1 обуславливается его ДНК-распознающей и связывающей способностью, а также каталитической активностью, обеспечивающей ковалентное присоединение цепей полимеров АДФ-рибозы к белковым мишеням с использованием НАД⁺ в качестве субстрата (Aberle L. и др., 2020; Ali AA T.G., 2012; Eisemann T., Pascal J.M., 2020).

PARP1 традиционно рассматривается прежде всего как сенсор повреждений ДНК, поскольку цинковые пальцы обеспечивают распознавание множества видов повреждений ДНК, включая одно и двухцепочечные разрывы, апуриновые сайты, разные неканонические структуры ДНК, такие как шпильки, крестообразные структуры и пр. (Pion E. Ullmann GM A.J., 2005; Pascal J.M., 2018) . PARP1 первым (через $T_{1/2} \sim 1,6$ сек) рекрутируется к месту повреждения ДНК (Haince J.-F. et al., 2008; Liu Z., Kraus W.L., 2017). Взаимодействие с ДНК приводит к авто-поли(АДФ-рибозил)ированию; при этом

происходят конформационные перестройки доменов PARP1, что вызывает каталитическую активацию белка (Altmeyer M.M.S., 2009). Поли(АДФ-рибозил)ирование белков, в том числе самого PARP1, приводит к разрыхлению и деконденсации в области повреждения ДНК, что облегчает доступ факторов, участвующих в репарации, а также ремоделирующих хроматин (Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., 2017).

Ключевая роль белка PARP1 в репарации ДНК определяет его как перспективную мишень таргетинговой терапии онкологических заболеваний (Canan Koch S.S. et al., 2002; Drew Y., Plummer R., 2009). Клетки с нарушениями пути репарации DSB (double strand break) гиперчувствительны к ингибиторам PARP (Bryant H.E. et al., 2005; Farmer H. et al., 2005). Предполагаемый механизм цитотоксичности ингибиторов заключается в том, что блокирование PARP1-зависимой репарации SSB (single strand break) приводит к образованию DSB на репликационной вилке. В нормальных или гетерозиготных по мутациям в генах BRCA1 или BRCA2 клетках механизмы DSB могут восстанавливать повреждение и репликацию ДНК, и клеточное деление продолжается. Однако в клетках, где репарация двуцепочечных разрывов (DSB) нарушена (например, при гомозиготных мутациях в BRCA1 или BRCA2), ингибиторы PARP приводят к синтетической летальности; при этом потеря двух путей репарации ДНК вызывает гибель клеток (Evers B. et al., 2008).

Также PARP1 участвует в регуляции транскрипции (Kotova E.Y. и др., 2022; Gaullier G., Luger K., 2017; Kraus W.L., Hottiger M.O., 2013). Будучи конститутивно связанным с хроматином, PARP1 может менять структуру нуклеосом в регуляторных участках определенных генов, образуя полимеры АДФ-рибозы (PAR) и облегчая доступ транскрипционных факторов к последовательности ДНК. PAR несут негативный заряд и поэтому могут конкурировать или мешать функциям факторов, которые связывают нуклеиновые кислоты (Petesch S.J., Lis J.T., 2012). Так, образование PAR приводит к уменьшению плотности гистонов на теле генов теплового шока, что, в свою очередь, облегчает транскрипцию Pol II (Maluchenko N.V. и др., 2021a; Bell N.A.W. и др., 2021; Zong W. et al., 2022).

Таким образом, наименее детально охарактеризованным аспектом функции белка PARP1 на сегодняшний день является его участие в модуляции структуры хроматина, несмотря на появление в последние годы нескольких исследований, подтверждающих PARP1-зависимое ремоделирование хроматина (Ahel D.; H., 2009; Thomas C. и др., 2019;

Maluchenko N.V. и др., 2021a; Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., 2017; Kim M.Y. et al., 2004; Rudolph J., Luger K., 2025).

1.2.2 Структура и функции

В структуре PARP1 принято выделять три домена: ДНК-связывающий, домен автомодификации и каталитический (Рис. 5) (Zong W. et al., 2022).

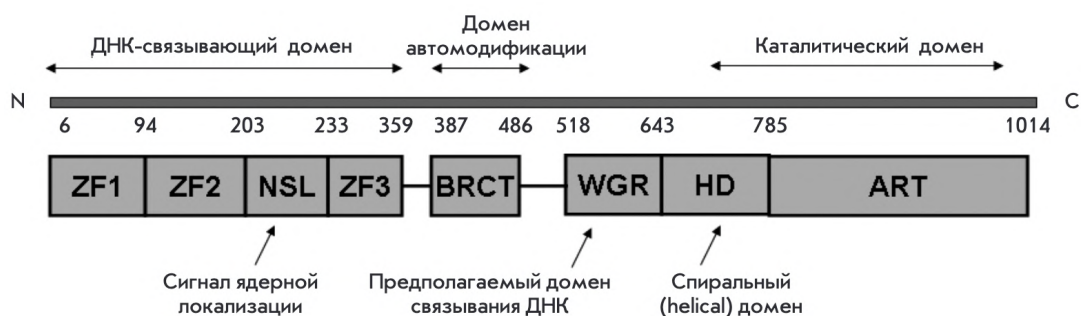


Рисунок 5 – Структурно-функциональная организация PARP1

Источник: (Maluchenko N.V. и др., 2021) с изменениями. Примечание: ZF1, ZF2, ZF3 – цинковые пальцы. NSL – сигнал ядерной локализации, BRCT-мотив, отвечающий за белок-белковое взаимодействие, WGR-домен (названный по центральному консервативному домену со следующими остаткам аминокислот: триптофан, глицин, аргинин), предположительно, отвечающий за связывание ДНК, HD – спиральный мотив, контролирующий доступ к каталитическому центру PARP1. ART мотив - отвечает за каталитическую активность белка (Spiegel J.O., Van Houten B., Durrant J.D., 2021).

ДНК-связывающий домен содержит три цинковых пальца (ZF 1, 2, 3). Они являются представителями PARP-подобных цинковых пальцев, узнающих не последовательность ДНК, а её структуру, а именно повреждения (D’Silva I. и др., 1999; Lonskaya I. et al., 2005). ZF1 и ZF2 структурно сходны, при этом ZF1 играет ключевую роль в регуляции сродства и активации PARP1, тогда как ZF2 важен для быстрого распознавания повреждений, но не определяющий вклад в общую активность фермента (Altmeyer M. M.S., 2009; Ikejima M. et al., 1990). ZF3 совместно с WGR координируют ДНК-связывающую активность ZF1 и ZF2 (Altmeyer M. M.S., 2009; Langelier M.F. и др., 2008; Tao Z. et al., 2008).

NLS- последовательность сигнала ядерной локализации, имеет 2 мотива, которые являются обязательными для таргетинга PARP1 в ядро (Schreiber V. et al., 1992). Между ними сайт связывания каспазы 3, которая во время апоптоза расщепляет PARP1 на 2

части. При этом оба участка (большой С-концевой и в 4 раза меньший N-концевой) сохраняют свою активность: один каталитическую, другой- связывающую. Это необходимо для сохранения внутриклеточного пула НАД⁺ в условиях апоптоза, поскольку в ходе программируемой клеточной гибели возникают множественные разрывы ДНК, которые гиперстимулируют активность PARP1. Это приводит к неконтролируемому синтезу поли(АДФ-рибозы) с истощением НАД⁺ – критического кофактора, необходимого для энергетического метаболизма и функционирования клетки. Сохранение НАД⁺ позволяет поддерживать энергетический баланс и обеспечивает своевременное протекание апоптотического каскада.

Домен аутомодификации - центральный в белке PARP1. В нем содержится BRCT мотив, отвечающий за белок-белковое взаимодействие, также он содержит LZ-мотив (от англ. leucine zipper – лейциновая застёжка), способствующий димеризации PARP1. Взаимодействия между PARP1 и его партнерами служат посредниками для более тонкой настройки эффектов поли-АДФ-рибозирования (Bork P. et al., 1997). Домен BRCT требуется для взаимодействия PARP1 с различными партнерскими белками, включая XRCC1, hUbc9, гистонами, OCT-1, SOX2, YY1 и др. (Loeffler P.A. и др., 2011; Kurgina T.A. и др., 2023). Кроме того, BRCT домен может являться мишенью действия различных ингибиторов, которые разобщают формируемый белок-белковый контакт (Dawicki-McKenna J.M. и др., 2015; Na Z., 2015; Gross S. et al., 2016).

WRG-мотив определяется по консервативным остаткам Trp, Gly и Arg; Он участвует в связывании нуклеиновых кислот и, подобно ZF3, задействован в формировании междоменных контактов (Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M., 2014; Lousa I. и др., 2020; Maluchenko N.V. и др., 2021a, 2023).

Каталитический домен PARP1 обладает всеми тремя каталитическими активностями полноразмерного белка, а именно: инициацией, удлинением и разветвлением PAR (Muthurajan U.M. et al., 2014). Остатки 859-908 PARP1 филогенетически консервативны и являются «визитной карточкой» всех членов суперсемейства PARP.

PARP1 является высококонсервативным белком. Столь высокая степень консервативности на протяжении эволюции отражает критическую роль доменов PARP1 в распознавании повреждений ДНК, регуляции активности PARP1 и осуществлении поли(АДФ-рибозил)ирования.

1.2.3 Особенности связывания PARP1 в хроматине

Существует несколько типов взаимодействия PARP1 с повреждениями ДНК, в частности при репарации одноцепочечных разрывов (SSB), двуцепочечных разрывов (DSB) и двуцепочечных разрывов с образованием выступа ДНК (Рис. 6).

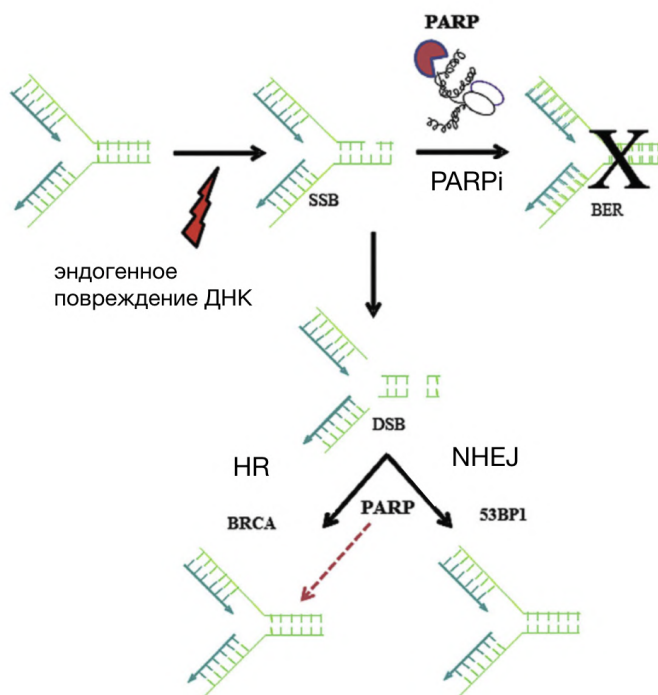


Рисунок 6 – PARP1 и репарация повреждений ДНК

Источник: (Rajawat J., Shukla N., Mishra D.P., 2017) с изменениями. Примечание: Повреждения ДНК, вызванные эндогенными или внешними агентами, вызывают SSB, которые распознаются PARP1 и репарируются с помощью BER. Ингибиторы PARP1 предотвращают BER, поэтому SSB преобразуются в DSB, которые могут быть восстановлены через HR или NHEJ, где PARP1 может играть роль в выборе конкретного пути

1.2.3.1 Узнавание одноцепочечных разрывов ДНК

SSB повреждение приводит к излому ДНК (угол 107°), это приводит к доступности к нуклеотидам и формированию гидрофобного интерфейса (Eustermann S. и др., 2015). На эту область могут садиться 2 цинковых пальца одной молекулы PARP1. На 3' конец садится ZF2, а на 5' конец садится ZF1 (Рис. 7). За счет того, что ДНК изогнута, присоединение цинковых пальцев не затруднено стерически. Считается, что ZF2 первый взаимодействует с ДНК и обладает более высокой аффинностью к повреждениям, чем к ZF1 (Eustermann S. et al., 2015).

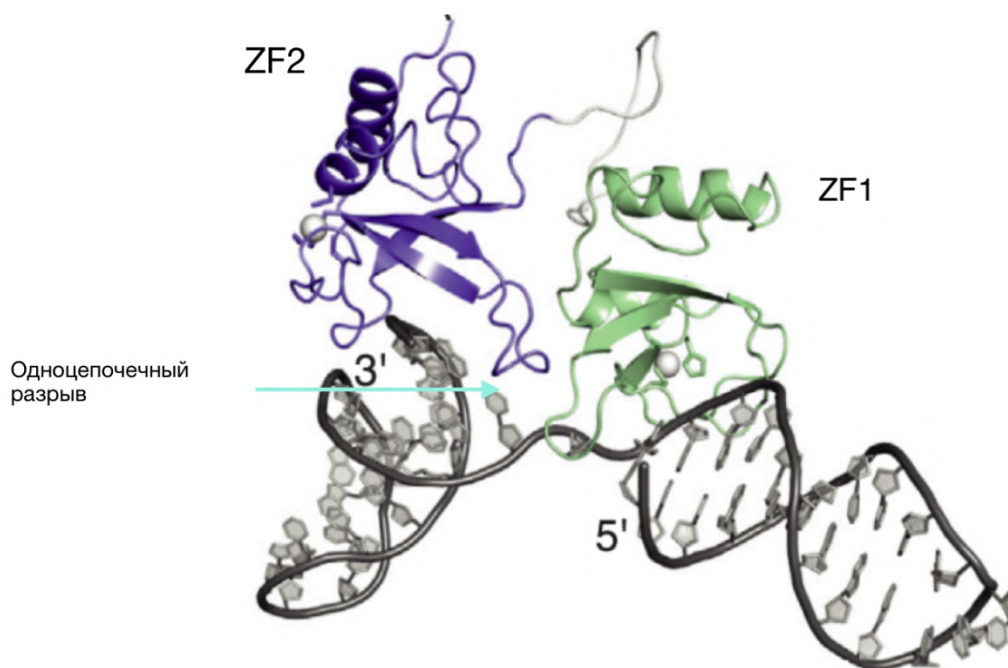


Рисунок 7 – Распознавание PARP1 одноцепочечного разрыва ДНК

Источник: (Eustermann S. et al., 2015) с изменениями. Примечание: Обозначения: ZF1 - цинковый палец 1, ZF2 - цинковый палец 2.

1.2.3.2 Механизм узнавания двухцепочечных разрывов

ZF1 связывается с двухцепочечным разрывом ДНК с использованием двух консервативных областей, называемых захватом основной цепи и петель укладки основания (Рис. 8) (Langelier M.-F. et al., 2012). ZF3 связывается с ДНК, контактирующей с ZF1, используя свою N-концевую α -спиральную область, чтобы охватить (доступную) малую бороздку. WGR связывается с 5'-концом одной цепи ДНК, удерживая основную цепь ДНК между центральным β -листом и α -спиралью WGR. Остаток WGR Trp589 укладывается против рибозных сахаров нуклеотидов, расположенных на конце 5'-концевой цепи ДНК. Контакт ZF1-WGR представляет собой солевой мостик, образованный между Asp45 ZF1 и Arg591 WGR. Arg591 также взаимодействует с HD; таким образом, WGR обеспечивает мост между интерфейсом повреждения ДНК ZF1 и CAT. ZF3 связывается с WGR и HD, используя расширенную петлю своей складки из цинковой ленты, а остаток Trp318 занимает центральное место на этом интерфейсе. ZF3 образует второй интерфейс в комплексе PARP1-ДНК, используя свою N-концевую спиральную область для взаимодействия с ZF1, вблизи их точек контакта с дуплексом ДНК (Langelier M.-F. et al., 2012).

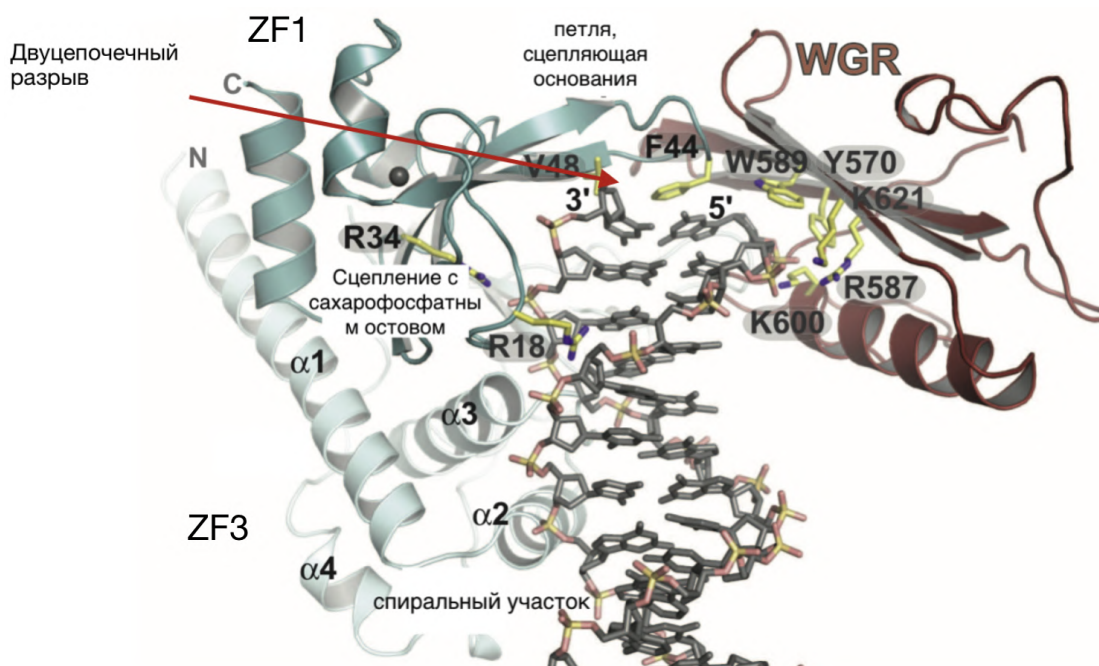


Рисунок 8 – Несколько доменов PARP1 участвуют в связывании ДНК

Источник: (Langelier M.-F. et al., 2012) с изменениями. Примечание: Домены ZF1, ZF3 и WGR совместно взаимодействуют с ДНК. R-аргинин; V-валин; F-фенилаланин; W-триптофан; Y-тирозин; K-лизин. (Langelier M.-F. et al., 2012) с изменениями.

1.2.3.3 Механизм транс-автомодификации с “выступом”:

На каждом крае разрыва ДНК с “выступом” формируется димерный комплекс (Рис. 9); таким образом сближаются две молекулы PARP1. За счет того, что две молекулы PARP1 находятся близко, каталитический сайт одной молекулы становится более доступным для другой. В результате осуществляется транс-автомодификация с последующей активацией PARP1 (Рис. 8):

а) PARP1 конститутивно связан с хроматином и может взаимодействовать с неповрежденной ДНК через слабые взаимодействия ZF1 с сахаро-фосфатным остовом (Ju B.-G. et al.).

б) Разрыв ДНК позволяет дополнительно присоединить ZF2 и сформировать модуль узнавания разрывов за счет димеризации со второй молекулы PARP1.

в) Близость двух молекул PARP1 влияет на доступность к акцепторному сайту для проведения транс-автомодификации.

г) PARP1 может поддерживать синапсис ДНК двухцепочечных разрывов за счет образования межмолекулярной димеризации PARP1.

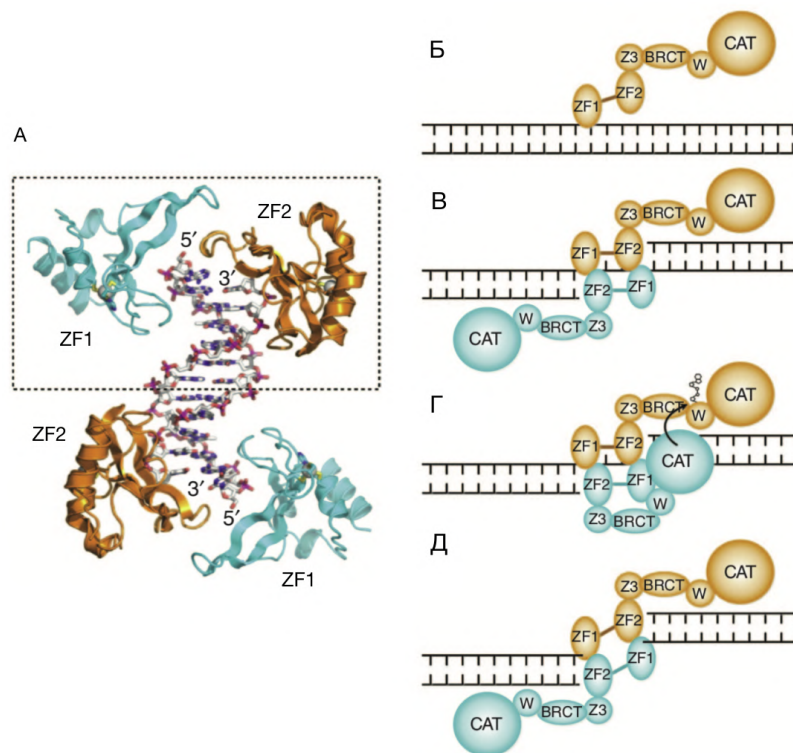


Рисунок 9 – Механизм транс-автомодификации PARP1

Источник: (Ali A.A.E. et al., 2012) с изменениями. Примечание: Обозначения на рисунке: ZF1 и ZF2 - первый и второй цинковые пальцы; Z3 - цинк связывающий домен; BRCT - концевой гомологичный BRCA1 домен; W- домен WGR; CAT- каталитический домен. А – комплекс ДНК и двух пар цинковых пальцев ZF1, ZF2. Б – Д Кооперативное распознавание доменами PARP1 разрывов ДНК

ZF3 отличается от предыдущих двух цинковых пальцев: он не связывается с ДНК самостоятельно, но он очень важен для ДНК- зависимой стимуляции активности PARP1 (Langelier M.-F., Pascal J.M., 2013). ZF3 опосредует междоменное взаимодействие между N-концевой (ДНК-связывающей) и С-концевой (каталитической) частями PARP1, что критично для ДНК-зависимой активации фермента. Он способствует правильной сборке доменов и передаче сигнала от места повреждения ДНК к каталитическому центру (Langelier M.F. и др., 2010; Langelier M.-F. et al., 2011)

Степень сродства цинковых пальцев к поврежденной ДНК различна: известно, что степень взаимодействия ZF2 с поврежденной ДНК в 100 раз выше, чем у ZF1. Механизм процесса связывания этих мотивов с нуклеиновой кислотой следующий: цинковые пальцы связываются с противоположными бороздками ДНК и образуют межмолекулярный ZF1-ZF2 комплекс (Rajawat J., Shukla N., Mishra D.P., 2017).

1.2.3.4 Особенности связывания PARP1 с нуклеосомной ДНК

PARP1 может связываться с нуклеосомной ДНК, защищая по 10-20 п.н. в линкерной области около нуклеосомного ядра, это напоминает H1-подобное взаимодействие нуклеосомы с гистоном (Kim M.Y. et al., 2004; Krishnakumar R. et al., 2008). В зависимости от количества и длины линкеров сродство к PARP1 различается. Как было показано ранее (Clark N.J. et al., 2012), наиболее предпочтительным субстратом для связывания PARP1 являются двухлинкерные нуклеосомы, причем чем длиннее линкер, тем выше степень сродства. На основе этих данных была предложена модель взаимодействия PARP1 с двухлинкерной нуклеосомой (Рис. 10). В работе (Clark N.J. et al., 2012) предлагается модель, где цинковый палец 1 связывается с одним линкерным участком, а цинковый палец 2 - с другим. При этом в связывание с нуклеосомной ДНК большой вклад вносит каталитический домен PARP1.



Рисунок 10 – Модель связывания полноразмерного PARP1 с нуклеосомой Источник: (Clark N.J. et al., 2012) с изменениями. Примечание: Двухлинкерная нуклеосома представляет собой наиболее предпочтительный субстрат для взаимодействия с PARP.

Недавняя работа существенно расширила понимание хроматин-ремоделирующего действия PARP1 (Liu Z., Kraus W.L., 2017). Было показано, что PARP1 способен связываться с нуклеосомами и облегчать посадку пионерных транскрипционных факторов (на примере фактора Sox2) на закрытые октамером гистонов сайты нуклеосомной ДНК (Рис. 11). Важно отметить, что обнаруженная хроматин-ремоделирующая активность PARP1 не зависела от его каталитической активности.

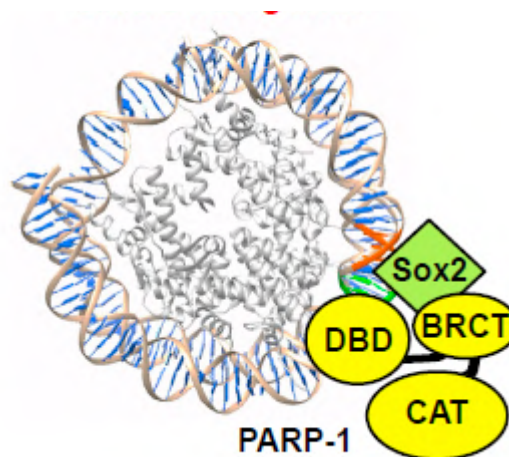


Рисунок 11 – Модель связывания Sox2 с нуклеосомами в PARP1-зависимых сайтах

Источник: (Liu Z., Kraus W.L., 2017) с изменениями. Примечание: PARP1 взаимодействует с нуклеосомной ДНК через свой ДНК-связывающий домен и SOX2 через мотив BRCT. PARP1 стабилизирует взаимодействие SOX2 с нуклеосомной ДНК.

В работе (Roper S.J. et al., 2014) было показано, что при ингибировании ADP-рибозилирующей активности PARP1 эмбриональные стволовые клетки демонстрируют снижение плюрипотентности. PARP1 играет критическую роль в защите плюрипотентного состояния, связывается с ключевыми генами плюрипотентности, в частности с Nanog, Pou5f1, SOX2, Stella, Tet1 и Zfp42, тем самым защищая их от эпигенетических модификаций. В работе (Liu C. et al., 2017) геномными и биохимическими исследованиями убедительно доказано, что именно неактивированный PARP1 способствует взаимодействию SOX2 с закрытыми в нуклеосомах сайтами ДНК. Таким образом, механизмы влияния каталитически неактивного PARP1 на структуру нуклеосом являются ключевыми для процессов роста и дифференцировки клеток.

Помимо каталитически-зависимых функций, PARP1 также осуществляет влияние на структуру нуклеосом. Эти свойства белка остаются недостаточно изученными, исследования в этом направлении обладают высокой актуальностью и приоритетностью. В пилотной работе, предпринятой в этом направлении, были использованы флуоресцентно-меченные нуклеосомы без линкеров и с одним линкером (Maluchenko N.V. и др., 2021a). В этой работе было продемонстрировано, что каталитически неактивный PARP1 может индуцировать полную реорганизацию нуклеосомы, причём для этого требуется стехиометрическое связывание нескольких молекул белка. Основным недостатком данных исследований заключался в том, что один

из концов ДНК в однолинкерных или оба конца в безлинкерных нуклеосомах, был представлен как «разрыв» на границы нуклеосомного кора (Maluchenko N.V. и др., 2021a). Поскольку это расстояние сопоставимо с размером ДНК-связывающего домена PARP1 (Eustermann S V.H., 2011; Rudolph J., Mahadevan J., Luger K., 2020), то в такой конфигурации невозможно четко различить сенсорную функцию PARP1 (поскольку связывание с разрывом ДНК является первым шагом в репарации) и структурно-модифицирующую функцию – связывание с нуклеосомой как с целостной структурой, приводящее к её реорганизации. Для решения этой проблемы нужно пространственно разделить участки связывания PARP1 как «сенсора разрыва» и как «структурного регулятора» на поверхности нуклеосомы. Именно эту стратегию изучения хроматин-реорганизующего действия PARP1 использовали в настоящей работе. В качестве оптимального модельного объекта нами были выбраны мононуклеосомы с двумя линкерными участками, что позволяет пространственно разобщить сайты связывания PARP1, имитирующие концы ДНК, и участки его потенциального взаимодействия с кором нуклеосомы.

1.3 Ингибиторы PARP

Белки BRCA1 и BRCA2 играют ключевую роль в процессе гомологичной рекомбинации ДНК (HR) (Prakash R. и др., 2015; Roy R.; С., 2011; Chen С.-С. и др., 2018). Это единственный механизм в клетке, который безошибочно может исправить двуцепочечный разрыв ДНК (DSB) (Roy R.; С., 2011; Abaji С., Cousineau I., Belmaaza A., 2005; Zhang J., 2013; Powell S.N., Kachnic L.A., 2003). При ряде нарушений функционирования клеток возникают мутации BRCA1/2 генов, которые связывают с высоким риском развития рака молочных желез или яичников (Miki Y. et al., 1994; Wooster R. et al., 1995). В основном, такие мутации являются герминальными, то есть наследственными, и присутствуют во всех клетках организма, повышая риск накопления дополнительных соматических изменений (Petrucci N., Daly M.B., Pal T., 1993), которые становятся драйверами развития BRCA-дефицитной опухоли. Однако, существует риск развития ненаследуемой соматической мутации в клетках конкретной ткани, в то время как остальные клетки являются BRCA-профицитными. В результате мутации будут детектироваться исключительно в опухолевых клонах (Pennington K.P. et al., 2014). Точная характеристика типа мутации позволяет установить её герминальный характер поражения, что важно для превентивной диагностики родственников пациента, однако,

для выбора таргетной терапии этого может быть недостаточно и может потребоваться исследование опухолевой ткани (Kwon J.S. и др., 2022).

Поскольку PARP1 поддерживает геномную стабильность, активируя репарацию повреждений ДНК несколькими путями (Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., 2017), он представляет собой привлекательную терапевтическую мишень для усиления цитотоксического эффекта ряда препаратов и подходов (Zong C. et al., 2022).

Ингибирование PARP1/2 нарушает репарацию одноцепочечных повреждений ДНК и их конверсию в двухцепочечные разрывы во время S-фазы, вызывая синтетическую летальность клеток в условиях дефектной гомологичной рекомбинации (в HR-дефицитных клетках) (Bryant H.E. et al., 2005; Farmer H. et al., 2005) (Рис. 12, 13).

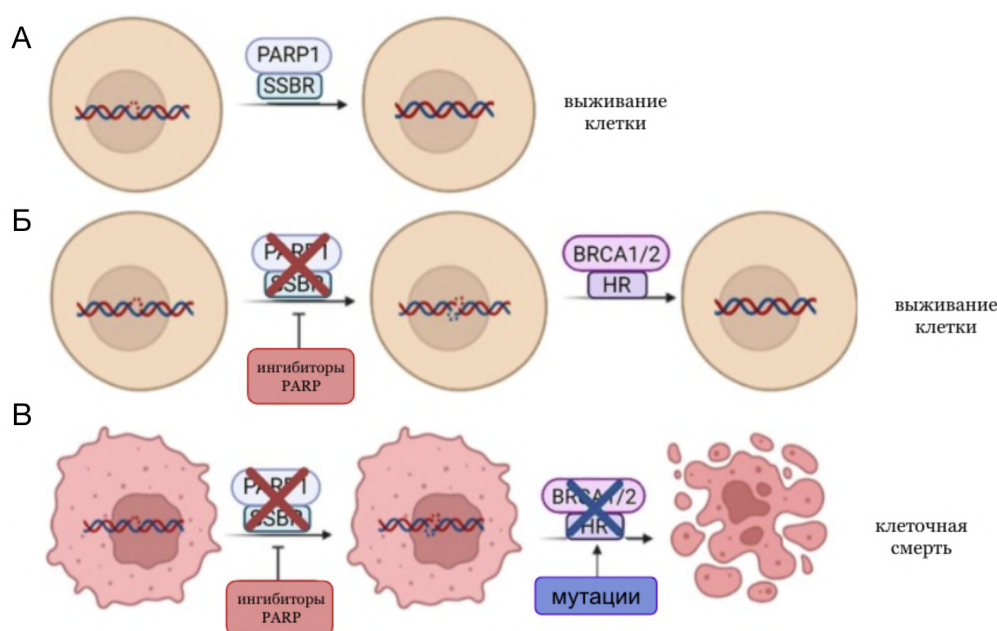


Рисунок 12 – Пути репарации повреждений ДНК с изменениями

Источник: (Bastos I.M., Rebelo S., Silva V.L.M., 2024) с изменениями. Примечание: А – PARP1-зависимый путь репарации одноцепочечных повреждений ДНК, Б – PARP1-независимый путь репарации двуцепочечных повреждений ДНК, В – Синтетическая летальность клетки, вызванная терапией ингибиторами PARP.

Молекулы, способные ингибировать действие PARP1/2 являются конкурентными аналогами НАД⁺ и эффективно связываются с каталитическим центром PARP1/2. Это блокирует перенос АДФ-рибозных остатков на белки-мишени (в том числе и PARP1/2) и останавливают образование полимеров АДФ-рибозы (Murai J. и др., 2012). Помимо ингибирования каталитической активности, также происходит “траппинг” PARP1/2 в

месте контакта с повреждением ДНК (Murai J. и др., 2012). Это может объясняться тем, что PARP1/2 теряет способность диссоциировать от места повреждения, которая возникает при авто-поли(АДФ-рибозилировании) (Hopkins T.A. и др., 2015; Rudolph J., Jung K., Luger K., 2022; Rudolph J., Mahadevan J., Luger K., 2020; Langelier M.-F. и др., 2018). Второе возможное объяснение – гипотеза обратной аллостерии, которая предполагает, что PARP1 повышает сродство к ДНК в результате конформационных изменений, вызванных ингибиторами PARP.

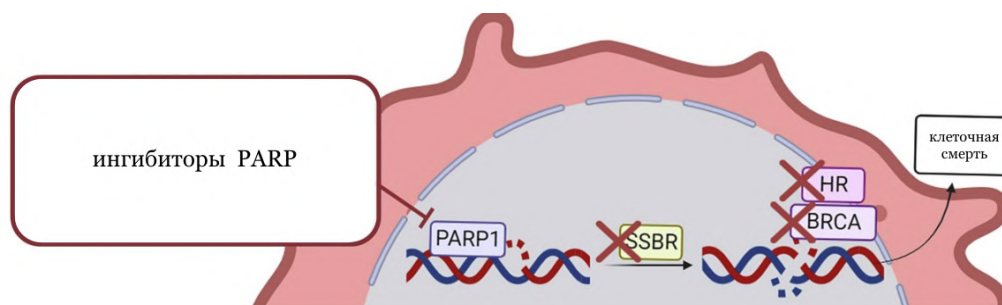


Рисунок 13 – Ингибирование действия PARP1 в клетке

Источник: (Bastos I.M., Rebelo S., Silva V.L.M., 2024) с изменениями. Примечание: При нарушении путей репарации происходит накопление одно- и двухцепочечных разрывов, что приводит к клеточной смерти.

Помимо BRCA1/2, есть еще ряд генов, нарушения в которых могут повышать чувствительность к ингибиторам PARP1, однако, эффект менее стабильный и зависит от контекста опухоли (Ghanem A., Domchek S.M., 2025; Incorvaia L. et al., 2023; Principe D.R. et al., 2020). Использование ингибиторов PARP отмечается при опухолях с HDR, HR мутациями и при HR-дефиците HRD-score (по классической версии “Myriad” HRD: LOH-score, TAI-score, LST-score)(Telli M.L. et al., 2016). Наиболее эффективно на терапию отвечают клетки с дефектами в PALB2, RAD51C, RAD51D и ряде других ключевых генов HRR (Ghanem A., Domchek S.M., 2025; Principe D.R. et al., 2020; Tomasik B., Wieńkowski M., Jassem J., 2021; Westphalen C.B. et al., 2022). Несколько нестабильный ответ демонстрируют клетки, содержащие нарушения в генах ATM, CHEK2, BARD1, BRIP1 и др (Miao R. et al., 2024; Paulet L. et al., 2022; Thapa B. et al., 2024; Tomasik B., Wieńkowski M., Jassem J., 2021). Для этих генов на данный момент разрабатываются дополнительные композитные биомаркеры (HRD-score, функциональные RAD51-assay и т.д.) для отбора на положительную динамику при

применении PARPi (Nakamura S., Kojima Y., Takeuchi S., 2025; Corti G. et al., 2024; Eiriz I. et al., 2023; O'Sullivan Coyne G. et al., 2022; Wang Y.-W. et al., 2025).

Согласно исследованиям (Langelier M.-F. и др., 2023), ингибиторы PARP1 можно разделить на три типа в зависимости от характера реализуемой ими обратной аллостерии PARP и последствий для взаимодействия фермента с ДНК. К ингибиторам I типа относятся соединения, вызывающие выраженный обратный аллостерический эффект: их связывание с каталитическим центром PARP усиливает их сродство к PARP и приводит к эффективному траппингу – заякориванию PARP на ДНК, а также к ингибированию работы фермента (талазопариб, нирапариб и др.). Ингибиторы II типа подавляют каталитическую активность PARP и не оказывают выраженного эффекта на заякоривание PARP1 (олапариб). Ингибиторы III типа характеризуются обратным аллостерическим эффектом с сохранением ингибирования каталитической активности PARP (рукапариб, нирапариб, велипариб) (Langelier M.-F. и др., 2023). Таким образом, ингибиторы PARP представляют собой класс таргетных препаратов, реализующих синтетическую летальность в опухолях с нарушениями гомологичной рекомбинации, а их противоопухолевая активность определяется не только степенью подавления каталитической функции PARP, но и способностью индуцировать траппинг PARP на цепи ДНК. Далее будут рассмотрены клинически наиболее значимые представители разных типов ингибиторов PARP.

1.3.1 Олапариб – первый ингибитор PARP1

Олапариб является первым ингибитором, получившим регистрацию от FDA в 2014 году (Kim G. et al., 2015). Его химическое название как русская ИЮПАК транслитерация выглядит следующим образом [4-[(3-{4-(циклопропилкарбонил)пиперазин-1-илкарбонил}-4-фторфенил)метил]фталазин-1(2H)-он. С точки зрения химической структуры олапариб представляет собой производное фталазин-1(2H)-она, содержащее конденсированное ароматическое ядро и пиперазиновый фрагмент с циклопропилкарбонильным заместителем (миметик никотинамидного кольца) (Рис. 14), что характерно для низкомолекулярных ингибиторов PARP первого поколения (Malychenko N.V. и др., 2015).

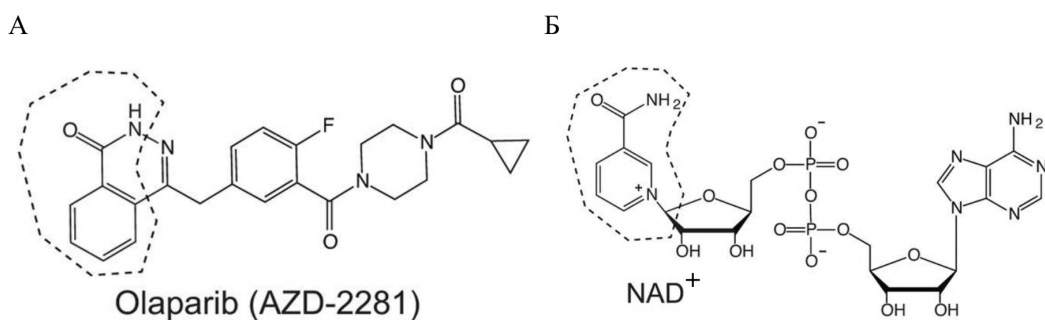


Рисунок 14 – сравнение структуры Олапариба и НАД⁺

Источник: (Murai J. и др., 2014) с изменениями. Примечание: А – формула олапариба, Б – формула никотинамиддинуклеотида.

Впервые во время доклинических и ранних клинических исследованиях Олапариб обозначался как AZD2281 и его эффективность доказана при BRCA-дефицитных опухолях, в клетках которых наблюдался дефект гомологической рекомбинации (HR) (Rottenberg S J.J., Cranston A O.M., 2008). Было показано, что он селективно ингибирует PARP1 и PARP2 в таких клетках, нарушая восстановление однонитевых разрывов ДНК (Liu J.F. и др., 2013; Rottenberg S J.J., Cranston A O.M., 2008). В итоге происходит аккумуляция однонитевых разрывов и последующем накоплением двунитевых разрывов. Вследствие невозможности проведения эффективной репарации (HR и NHEJ) наблюдается синтетическая летальность клеток (Lord C.J., Ashworth A., 2017b). Дополнительную цитотоксичность возникает в связи с эффектом “траппинга”, который удерживает PARP1 на ДНК (Wang H. и др., 2020). Эффективность олапариба продемонстрирована в ряде рандомизированных клинических испытаниях на четырех основных типах солидных опухолей. К ним относятся платиночувствительный и BRCA-ассоциированный рак яичников (Poveda A. и др., 2021), BRCA-мутированный и gBRCA-ассоциированный рак молочной железы (Robson M.E. и др., 2023), gBRCA-ассоциированный метастатический рак поджелудочной железы (Kindler H.L. и др., 2022) и HER2 негативный и gBRCA-ассоциированный рак предстательной железы (Vono J. de и др., 2020).

Таким образом, Олапариб является наиболее исследованным представителем низкомолекулярных никотинамидоподобных ингибиторов PARP первого поколения и служит удобной моделью для сопоставления с другими препаратами этой группы.

1.3.2 Талазопариб – ингибитор с выраженным “траппинг” эффектом.

Талазопариб (известный также как BMN 673 или MDV3800) относится к низкомолекулярным ингибиторам PARP1, с наиболее высокой способностью вызывать “траппинг” (Shen Y. и др., 2013). В структуре препарата присутствует конденсированное ароматическое кольцо (Рис. 15), содержащее никотинамид-подобный миметик, что обеспечивает конкурентное связывание с никотинамиддинуклеотидом каталитического домена белков PARP1/2 (Shen Y. и др., 2013).

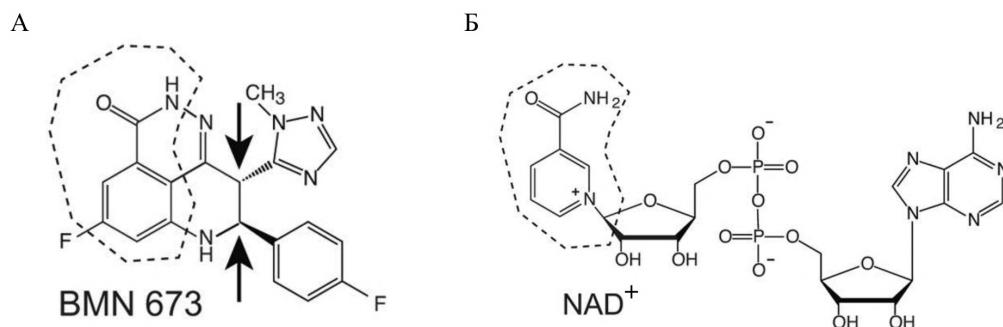


Рисунок 15 – Сравнение структуры НАД⁺ и Талазопариба с изменениями

Источник: (Murai J. и др., 2014) с изменениями. Примечание: А – формула талазопариба. Б – формула никотинамиддинуклеотида.

Во время доклинических исследований было показано, что талазопариб вызывает значительное накопление одно- и двунитевых разрывов ДНК, а также синтетическую летальность клеток, в которых были нарушены пути гомологичной рекомбинации. При этом его цитотоксичность по сравнению с олапарибом существенно выше при сопоставимых концентрациях веществ, что связывают с его более высокой способностью удерживать PARP1 на ДНК (Murai J. и др., 2014). Высокая эффективность соединения была отмечена в HER2-негативных и BRCA-дефицитных раках молочной железы (Litton J.K. и др., 2018).

Таким образом, талазопариб является соединением с наиболее выраженной ингибирующей активностью и способностью вызывать “траппинг” PARP, его часто используют в качестве референтного соединения для оценки потенциала других низкомолекулярных соединений (Rudolph J., Jung K., Luger K., 2022; Shen Y. и др., 2013).

1.3.3. Велипариб – сенсibiliзирующий PARP-ингибитор

Низкомолекулярный ингибитор велипариб (кодовое название АВТ-888) разрабатывался как усилитель уже применяющихся методов лечения, а именно как

потенциатор химио- и радиотерапии (Rodler E.T. и др., 2016). С точки зрения химической формулы велипариб представляет собой [(R)-2-метилпирролидин-2ил]-1H-бензамидазол-4-карбоксамид, где бензамидазол-4-карбоксамидная группа выступает в роли миметика нинотинамидного фрагмента НАД⁺ (Рис. 16) и обеспечивает ключевые контакты с каталитическим центром белков семейства PARP, в то время как пирролидиновый заместитель усиливает аффинность соединения (Borgini M., Wipf P., 2023; Donawho C.K., 2007).

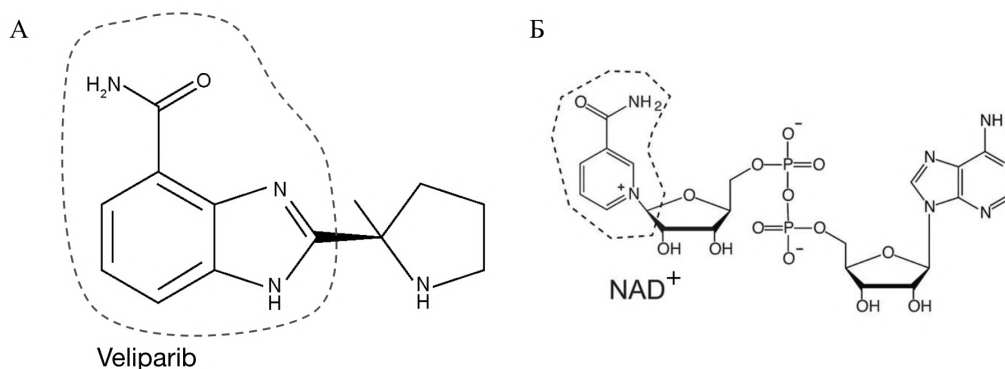


Рисунок 16 – сравнение структуры Велипариба и НАД⁺

Источник: (Wagner L.M., 2015; Murai J. и др., 2014) с изменениями. Примечание: А – формула велипариба, Б – формула никотинамиддинуклеотида.

В доклинических исследованиях показано, что он значительно усиливает эффект ДНК-повреждающих агентов и приводит к усиленной индукции апоптоза в моделях с дефицитом гомологической рекомбинации (BRCA1/2, PALB2 и др.). В этих работах комбинировали велипариб вместе с такими препаратами как карбоплатин, паклитаксел (рак яичников и молочной железы), цисплатин, этопозид или темозоломид (рак лёгкого), что приводило к повышенной цитотоксичности в сравнении с монотерапией (AbbVie, 2025; George R.R. и др., 2022); Однако, велипариб обладает несколько сниженной способностью к “траппингу” (Murai J. и др., 2012). Масштабные клинические испытания третьей фазы дали ограниченный результат, что не позволило его зарегистрировать в качестве самостоятельного противоопухолевого препарата (AbbVie, 2025).

Однако, ингибиторы PARP, включая применяемые в клинике (olaparib, rucaparib, niraparib, talazoparib) сопровождаются выраженной токсичностью, которая затрагивает не только опухолевые, но и нормальные клетки организма. Это связано с подавлением PARP-зависимых механизмов репарации ДНК и влиянием на пролиферирующие клетки крови. Основными и наиболее клинически значимыми побочными эффектами являются

гематологические осложнения: анемия, тромбоцитопения, нейтропения, в редких случаях развивается острый миелоидный лейкоз и миелодиспластический синдром (Zhao Q. и др., 2022; Wang C., Li J., 2021; Maiorano B.A. и др., 2025). Из менее опасных, но более широко распространенных нежелательных явлений отмечают высокую утомляемость, а также желудочно-кишечные симптомы, такие как тошнота, рвота, диарея (Logusso D. и др., 2020; Tian X. и др., 2022; Uekusa R. et al., 2024). Кроме того, ингибиторы PARP могут вызвать кардиоваскулярные нарушения (Palazzo A. и др., 2023), почечную дисфункцию, гепатотоксичность (Tian X. и др., 2022), а в редких случаях – заболевание лёгких (He Z. и др., 2023) и фотосенсибилизация (Tian X. и др., 2022). Во время доклинических испытаний было показано, что для ингибиторов PARP показано эмбрио-фетальная токсичность и тератогенный эффект, что обуславливает противопоказанность их приёма во время беременности (Barrow P., 2018).

Поэтому поиск новых, менее токсичных ингибиторов приобретает особую актуальность. Их разработка открывает возможность не только снизить частоту тяжелых нежелательных явлений, но и принципиально улучшить переносимость терапии, что критически важно для пациентов с сопутствующей патологией. Кроме того, появление таких соединений позволит расширить показания к применению ингибиторов PARP, в том числе за счет безопасного включения в комбинированные схемы лечения, где сегодня их использование нередко лимитировано накопленной токсичностью.

Одним из наиболее перспективных направлений является поиск ингибиторов среди природных соединений, синтезируемых растениями. В ряде исследований показано, что некоторые растительные полифенолы (например, мирицетин, кверцетин, эпигаллокатехин, физетин, трицетин, госсипетин и дельфинидин) способны подавлять активность PARP1. Благодаря более благоприятному профилю безопасности такие соединения могут стать основой для создания новых эффективных противоопухолевых агентов (Alqahtani S. и др., 2019; Dal Piaz F. и др., 2015; Geraets L. и др., 2007).

1.3.4 Ресвератрол – многофункциональный природный полифенол

Ресвератрол является природным полифенолом, широко известным антиоксидантом и противовоспалительным веществом (Рис. 17) (Meng T. и др., 2021; Koushki M. и др., 2018).

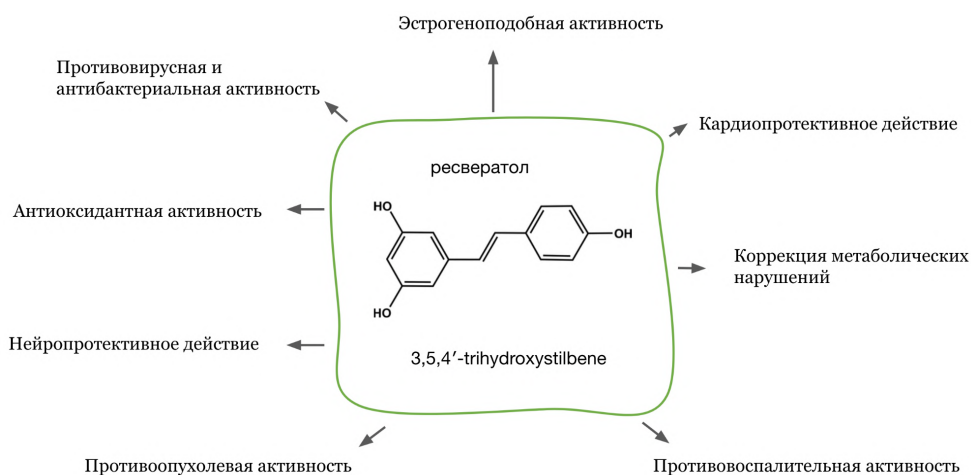


Рисунок 17 – Многообразие функций ресвератрола

Источник: составлено автором по материалам (Salehi В. и др., 2018). Примечание: Схематическое изображение основных биологических эффектов ресвератрола.

Он широко применяется в качестве пищевых добавок и нутрицевтических препаратов, а также положительно отмечен в ряде клинических исследований, связанных с сердечно-сосудистыми (Bonfont-Rousselot D., 2016; Magyar K. и др., 2012), неврологическими (Semenova E.V., Siprov A.V., Vedenkin M.A., 2025; Turner R.S. и др., 2015) и метаболическими (Batista-Jorge G.C. et al., 2024) заболеваниями. Также показано, что ресвератрол влияет на функционирование ряда ядерных ферментов в том числе НАД⁺-зависимых деацетилаз семейства sirtuins, в частности SIRT1. Это ядерная ацетилаза, которая участвует в деацетилировании гистоновых и негистоновых белков и активно регулирует структуру и динамику хроматина (Ghosh S., Liu B., Zhou Z., 2013). Показано, что ресвератрол способен напрямую взаимодействовать с двухцепочечной ДНК, меняя её конформационные и электростатические характеристики, что может влиять на её способность взаимодействовать с ДНК-связывающими белками, такими как транскрипционные факторы, топоизомеразы и др. (Kumar S., Kumar P., Nair M.S., 2021; N'Soukroe-Kossi C.N. и др., 2015; Usha S., Johnson I.M., Malathi R., 2006). Кроме того, показано, что ресвератрол, связываясь с нуклеосомами, вызывает небольшие конформационные изменения в линкерной и краевых областях, однако, это не исключает потенциальный эффект на способность взаимодействовать с ДНК-связывающими белками.

Природный полифенол ресвератрол (RSV) обладает широким спектром терапевтических эффектов: антиоксидантным, противовоспалительным,

антибактериальным, противовирусным, геропротекторным и противоопухолевым. Он оказывает кардио-, нейро- и гепатопротекторное действие, а также улучшает когнитивные функции. RSV влияет на работу ряда ядерных ферментов (например, ДНК-полимеразы α , топоизомеразы II, SIRT1, ДНК-метилтрансферазы и др.) и взаимодействует с ДНК, существенно не нарушая при этом структуру нуклеосом (Gomes B.A.Q. и др., 2018; Maluchenko N. V. A.T.V., Feofanov A. V. S.V.M., 2023; Maueri A. и др., 2018; Moraes D.S. и др., 2020; Cao W., Dou Y., Li A., 2018).

В данной работе будет изучена ингибирующая активность ресвератрола в отношении PARP1, включая его способность связываться с каталитическим центром фермента и влиять на его взаимодействие с нуклеосомами.

1.4 Белок p53 в регуляции клеточного гомеостаза.

1.4.1 Физиологические функции и онкосупрессорная активность p53

Продукт гена tp53 – белок p53 является одним из центральных участников ответа на клеточный стресс. К наиболее значимым функциям относят его участие в репарации ДНК, остановка клеточного цикла и инициации апоптоза (Zhang H. et al., 2024). Также p53 регулирует метаболизм и ответ на оксидативный стресс. Совокупность этих эффектов препятствует формированию и прогрессии опухолей. Благодаря способности предотвращать накопления мутаций в геноме и элиминировать клетки с необратимыми повреждениями ДНК, p53 называют “стражем генома”. Нарушения работы p53, прежде всего вследствие мутаций гена tp53, приводят к утрате онкосупрессивной активности белка: такие мутации выявляются более, чем у половины всех злокачественных новообразований человека (Hafner A. et al., 2019), (Chen J., 2016). На молекулярном уровне p53 представляет собой транскрипционный фактор, активирующий (Beckerman R., Prives C., 2010) или подавляющий (Quaas M., Müller G.A., England K., 2012) набор специфических генов в зависимости от клеточного контекста и типа стрессового сигнала (Sullivan K.D. et al., 2018). Активация p53 инициируется рядом различных типов стрессовых воздействий, включая повреждение ДНК, онкогенную стимуляцию, гипоксию и нарушения рибосомного биогенеза. При этом, то, по какому пути пойдёт клетка – временная остановка клеточного цикла, сенесценция, необратимая остановка клеточного цикла (устойчивое старение), или апоптоз – определяется интенсивностью и продолжительностью повреждающего воздействия, а также клеточного контекста (Zilfou J.T., Lowe S.W., 2009; Sullivan K.D. et al., 2018).

1.4.2 Доменная организация p53 и регуляция транскрипции

Белок p53 обладает модульной доменной организацией, которая определяет его способность детектировать сигналы стресса, а также избирательно регулировать транскрипцию генов-мишеней. Основные домены включают N-терминальный трансактивационный домен (TAD), обогащенный пролином (PRD), центральный ДНК-связывающий домен (DBD), домен тетрамеризации (TET) и С-терминальный регуляторный домен (CTD) (Рис. 18) (Okorokov A.L. и др., 2006).

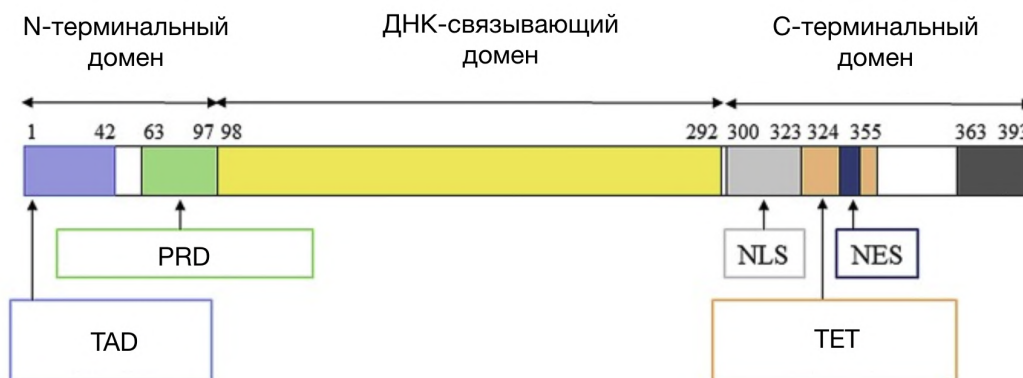


Рисунок 18 – Доменная организация p53

Источник: (Tanaka T., Watanabe M., Yamashita K., 2018) с изменениями. Примечание: N-терминальный трансактивационный домен (TAD), обогащенный пролином (PRD), центральный ДНК-связывающий домен (DBD), домен тетрамеризации (TET) и С-терминальный регуляторный домен (CTD).

Основные домены p53:

TAD (N-terminal transactivation domain), домен трансактивации, имеющий отрицательный заряд и неупорядоченную структуру. Он содержит две части: TAD1(1-41 а.а.) и TAD2 (41-61 а.а.) (Walker K.K., Levine A.J., 1996), обе могут взаимодействовать с транскрипционным аппаратом и его активаторами/инактиваторами для контроля транскрипции. Этот домен является мишенью множественного фосфорилирования, активирующего транскрипционную активность поэтапно (Lee C.W. и др., 2010). Например, фосфорилирование Thr18 or Ser20 контролируют связывание с МДМ2 и стресс-специфичными коактиваторами (Borrero L.J.H., El-Deiry W.S., 2021). Множественные посттрансляционные модификации TAD (фосфорилирование, ацетилирование) в ответ на различные типы стресса тонко настраивают аффинность p53 к коактиваторам и корепрессорам, тем самым определяя спектр активируемых и подавляемых генов-мишеней, что в свою очередь определяет клеточный ответ на стресс

и тип остановки клеточного цикла или направление в апоптоз (Jenkins L.M.M. и др., 2012; Xia Z. и др., 2022; Hafner A. et al., 2019).

Пролин-обогащенный участок Proline-rich domain (PRD), (62-83 a.a.) необходим белку для остановки клеточного цикла и индукции сигнального пути апоптоза (Ruaro E.M. и др., 1997; Dumont P. et al., 2003). Этот домен содержит PXXP-мотивы (пролин, две любые аминокислоты, снова пролин), которые формируют сайт взаимодействия с SH3-доменами партнерских белков и участвуют в передаче сигналов, ведущих к подавляющему рост и проапоптотическому ответу клетки (Venot C. и др., 1998; Baptiste N. и др., 2002; Walker K.K., Levine A.J., 1996).

Центральный, ДНК-связывающий домен, (DBD, DNA-binding domain) (96-292 a.a) (Cho Y. и др., 1994) способен связываться со специфическими последовательностями, а также взаимодействовать с рядом белковых партнёров. Этот домен содержит цинк-содержащий домен, так называемый цинковый палец, а также ряд (Pavletich N.P., Chambers K.A., Pabo C.O., 1993). Именно в этом участке обнаруживается большинство важных мутаций p53.

Домен тетрамеризации (TET) обеспечивает ассоциацию мономеров p53 в функциональный тетрамер [120], который является активной формой белка и необходим для высокоафинного и кооперативного связывания с ответными элементами ДНК. Ответные элементы (RE, responding elements) или сайты связывания ДНК содержат две копии участка ДНК “5'-RRRCWWGYYY-3'”, разделенных спейсером от 0 до 13 где R–пурин, С–цитозин, W–аденин или тимин, G–гуанин, а Y–пиримидин, с которыми может связываться белок p53 (Wang H. et al., 2023; Deiry W.S. et al. и др., 1992). Они располагаются в промоторах, а также дистальных энхансерах (Fischer M., 2017; Serra F. et al.). Домен тетрамеризации содержит сигнальную последовательность ядерной локализации [107].

С-терминальный регуляторный домен (C-terminal regulatory domain, CTD) белка p53 расположен в области аминокислот 324–355 [116]. Он обладает сайтами ацетилирования и фосфорилирования, и, благодаря этим посттрансляционным модификациям, регулирует активность ДНК-связывающего домена.

Совместная работа ДНК-связывающего домена, домена тетрамеризации и С-терминального домена p53 обеспечивают высокую специфичность связывания ответных элементов в промоторах и энхансерах целевых генов и контекст-зависимую регуляцию транскрипции. Благодаря совместному функционированию возможна не только

активация проапоптотических генов, но также подавление генов, контролирующих клеточный цикл (Beckerman R., Prives C., 2010; Engeland K., 2018; Quaas M., Müller G.A., Engeland K., 2012).

Гибкая структура и нестабильность p53 может способствовать взаимодействию с различными белками и иными регуляторными элементами (Bell S. и др., 2002). Модульная организация p53, сочетающая компактный ДНК-связывающий домен с несколькими неупорядоченными участками на N- и C-концах, обеспечивают ему высокую структурную пластичность и способность динамически переключаться между различными регуляторными элементами. Такая архитектура позволяет высокоспецифично распознавать консенсусные последовательности и в тоже время гибко переключаться между различными клеточными программами в зависимости от контекста сигнальной среды (Chillemi G. и др., 2017; He F. и др., 2019; Wells M. и др., 2008).

1.4.3 Особенности взаимодействия с нуклеосомами

При клеточном стрессе p53 связывается с промоторами определенных генов, стимулируя их экспрессию. Часто промоторы и сайты связывания p53 находятся в областях входа и выхода нуклеосом, и как следствие p53 чаще обнаруживается в регионах, населенных нуклеосомами (Laptenko O. и др., 2011; Nishimura M. и др., 2022; Lidor Nili E. et al., 2010; Krieg A.J., Hammond E.M., Giaccia A.J., 2006). Несмотря на наличие в геноме множества сайтов связывания, не все являются доступной мишенью для p53. Предположительно, не только последовательность определяет способность связывания p53, но и хроматиновый контекст (Lidor Nili E. et al., 2010). Несмотря на наличие множества сайтов связывания, многие не являются функциональными мишенями, что часто может быть обусловлено позиционированием этих сайтов в составе нуклеосом, а также локальным хроматиновым контекстом. Наиболее доступными сайтами связывания являются области входа/выхода, линкерная область, а также диада нуклеосомы (Wilson P.D., Yu X., Buck M.J., 2024). P53 проявляет пионерную активность при формировании комплекса с нуклеосомой, связываясь с линкерной областью вблизи входа/выхода нуклеосомной ДНК. Это вызывает частичное отворачивание нуклеосомной ДНК от октамера гистонов и расхождение линкеров (Nishimura M. и др., 2022). Это подтверждает способность p53 действовать как пионерный фактор, способный

распознавать целевой участок связывания в составе нуклеосомы и реорганизовать локальную структуру хроматина.

Эффективность связывания p53 с нуклеосомной ДНК определяется не только позиционированием сайта связывания вдоль ДНК, но и его ротационным расположением на поверхности нуклеосомы (Cui F., Zhurkin V.B., 2014). Показано, что наиболее высокое сродство характерно для положений, когда середина ответного элемента ориентирована в раствор. Разворот сайта связывания на 180° перемещает середину ответного элемента внутрь к гистоновому октамеру, который экранирует ДНК и препятствует эффективному формированию комплекса с p53 (Sahu G. и др., 2010). Таким образом, p53 способен взаимодействовать с нуклеосомной ДНК и ремоделировать структуру хроматина, что позволяет рассматривать его как пионерный фактор.

p53 преимущественно связывается с участками активного хроматина, а именно в областях промоторов и энхансеров целевых генов (например, p21 (Itahana Y. et al., 2016)), обогащённых активирующими модификациями гистонов (H3K4me3, H3K27ac и др.) (Bao F. et al., 2017; Serra F. et al., 2024), а также вариантами формами гистонов, характерных для участков хроматина с активной транскрипцией генов (H2A.Z, H3.3 и др.) (Gévry N. и др., 2007; Szenker E., Ray-Gallet D., Almouzni G., 2011);

В данный момент многие исследования сфокусированы на преодолении резистентности опухолей с использованием комбинаций таргетной терапии и эпигенетических подходов (Tornesello M.L., 2025). Изучение взаимодействия p53 с нуклеосомами, как базовыми единицами хроматина расширит понимание молекулярных механизмов его функционирования и сможет способствовать более рациональному дизайну комбинированных эпигенетических стратегий, сочетающих реактивацию p53 с фармакологической модификацией структуры и доступности хроматина (Dai W. et al., 2024; Andrysik Z., Espinosa J.M., 2025).

1.4.4. Координация сигнальных путей p53 и PARP1 в клеточном ответе на повреждение ДНК.

Координируя сигнальные пути p53 и PARP1 в ответ на повреждения ДНК, клетка определяет уровень стресса и направляется либо к репарации и выживанию, либо к активации программируемой клеточной гибели.

После повреждения ДНК PARP1 функционирует не только как сенсор разрывов и источник поли(АДФ-рибозы), но и напрямую модифицирует p53, выступая в качестве

ключевого регулятора его активности в хроматиновом контексте. (Simbulan-Rosenthal С.М. и др., 2001). При умеренных повреждениях PARP1 эффективно поли(АДФ-рибозил)ирует p53, что приводит к ограничению его транскрипционной активности. При чрезмерных же повреждениях PARP1 приводит к выраженному истощению клеточных запасов НАД⁺, что приводит к усилению фосфорилирования и ацетилирования p53, что вызывает активацию проапоптотических генов (Elkholi R., Chipuk J.E., 2014; Ко Н.Л., Ren E.C., 2012; Nikolettou V. и др., 2013).

Модификация p53 полимерами АДФ-рибозы приводит к изменению структуры белка и его аффинности к ДНК, что влияет на перераспределение его транскрипционной активности (Smith H.M., Grosovsky A.J., 1999). Поли(АДФ-рибозил)ирование p53 зависит не только от наличия или отсутствия повреждений, но и от его конформационного состояния p53 и наличия мутаций (Wesierska-Gadek J., Bugajska-Schretter A., Cerni C., 1996). Было показано, что взаимодействие p53 с ДНК и поли(АДФ-рибозой) приводит к различным конформационным перестройкам внутри белка. Это возникает вследствие вовлечения разных доменов в связывание с ДНК (ДНК-связывающий домен) и с поли(АДФ-рибозой) (С-терминальный домен). При связывании с ДНК и PAR (полимерами АДФ-рибозы) индуцируются различные изменения вторичной структуры белка, включающие и альфа спирали и бета листы, а также неупорядоченные участки. Это указывает на принципиально разные междоменные конфигурации в ДНК- и PAR-связанном состоянии (Krüger A. и др., 2019). Переключение конформаций предполагает, что p53 в контексте взаимодействия с полимерами АДФ-рибозы может переходить из ДНК-связанного транскрипционного режима в состояние, более ориентированное на ремоделирование хроматина, что связано с повышением сродства к PAR-модифицированным белкам/хроматину и ослаблением прямого ДНК-связывания (Smith H.M., Grosovsky A.J., 1999; Wesierska-Gadek J., Bugajska-Schretter A., Cerni C., 1996). Показано, что основным участком для поли(АДФ-рибозил)ирования является С-терминальный домен p53: он содержит как домены для ковалентного присоединения и для высокоспецифического нековалентного связывания с полимерами АДФ-рибозы (Fischbach A. et al., 2018). В С-концевом домене p53 аминокислотами, способными связывать полимеры АДФ-рибозы, являются лизины, аргинины, серины, глутаматы и аспартаты, что согласуется с представлением о специфичности PARP1 по аминокислотным остаткам (Zhu T. и др., 2023). Наиболее распространённым сценарий поли(адф-рибозил)ирования p53 заключается в его нековалентном первичном

присоединении к уже авто-поли(АДФ-рибозил)ированному PARP1 через C-терминальный домен с последующим ковалентным модифицированием уже в активном центре PARP1 (Simbulan-Rosenthal C.M. и др., 2001; Fischbach A. et al., 2018).

Однако, p53 выступает не только в качестве субстрата для PARP1, но также и регулирует PARP1-зависимые пути клеточной смерти, что отражает их взаимную координацию при выборе пути клетки (Elkholi R., Chipuk J.E., 2014; Mt V. et al., 2002). Через транскрипционную активность генов, участвующих в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, метаболизма НАД⁺ и путей клеточной смерти, p53 задаёт путь клетки, на котором возникает PARP1-опосредованный ответ (Mt V. et al., 2002).

Таким образом, PARP1 и p53 тесно сопряжены в определении ответа на повреждение ДНК, и поэтому особенно актуальным представляется выяснение того, как эта взаимосвязь реализуется на нуклеосомном уровне. В свете тесного взаимодействия p53 и PARP1 при формировании клеточного ответа на повреждение ДНК, представляют интерес современные инструменты направленного редактирования генома CRISPR/Cas.

1.5 CRISPR/Cas в современных подходах биоинженерии

CRISPR/Cas-системы (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) представляют собой форму адаптивного иммунитета прокариот, в которой часть ДНК патогенных организмов встраивается в CRISPR-массив и используется в качестве библиотеки для распознавания и элиминации носителя чужеродной генетического материала (Barrangou R. и др., 2007). Эти участки представляют собой серию коротких повторов, которые разделены спейсерами, вирусного или плазмидного происхождения (Barrangou R. и др., 2007). В реализации этого механизма принимают участие белки, кодируемые cas-генами, которые располагаются вне CRISPR-массива, однако они могут располагаться в пределах одного функционального локуса, который часто в литературе называют CRISPR-Cas-locus (Hille F., Charpentier E., 2016; Shabbir M.A.B. и др., 2016; Makarova K.S. и др., 2011). Они вырезают участки генома патогенов, инкорпорируют в CRISPR-локус, а далее полученный транскрипт формируют в направляющие РНК, которые далее в составе комплекса участвуют в распознавании целевого участка (Brouns S.J.J. et al., 2008). Благодаря универсальности и относительной простоте, этот механизм привлёк внимание как потенциальный инструмент для редактирования генома и регуляции экспрессии генов. Создание систем на основе Cas9 (Mali P. и др., 2013) и

Cas12 (Liu P. и др., 2019) позволило вносить направленные изменения последовательностей ДНК в клетках эукариот, что открывает широкие перспективы для фундаментальных исследований и биомедицинских приложений (Makarova K.S. и др., 2011).

1.5.1 Принципы организации и действия CRISPR/Cas-систем

Для разных классов и типов прокариотических CRISPR/Cas-систем, набор белков и архитектура массивов отличаются, однако принцип механизма остаётся единым. Согласно современной классификации существует два класса систем, определяемые количеством эффекторных комплексов, входящие в CRISPR/Cas-систему. Класс 1 включает белки, содержащие многокомпонентные эффекторные комплексы (типы I, III, IV). Класс 2 включает белки, где эффектор выступает единичным белком (типы II, V, VI). Наибольшую применимость в генетической инженерии нашли нуклеазы Cas9, относящиеся ко второму классу, типу II-A (*Streptococcus pyogenes*) (Chaudhuri A., Halder K., Datta A., 2022). Для всех представленных групп ключевыми стадиями являются 1) адаптация: включение нового спейсера (уникальный фрагмент чужеродной ДНК между повторами CRISPR) из в CRISPR-локус; 2) экспрессия и процессинг: образование комплекса направляющих РНК с Cas-белками; 3) интерференция: РНК-направленное узнавание и разрезание целевого участка ДНК (Barrangou R., Marraffini L.A., 2014; Koonin E.V., Makarova K.S., 2009; Barrangou R., 2015). Кроме того, для дополнительной специфичности для ряда комплексов характерно присутствие протоспейсер-ассоциированного мотива (PAM), состоящего из 2-6 нуклеотидов и примыкающий к протоспейсеру в чужеродной ДНК. Это позволяет эффекторным комплексам отличать чужеродную ДНК от собственного CRISPR-локуса (Almendros C. и др., 2012; Gleditsch D. и др., 2019; Shah S.A. и др., 2013). Таким образом, благодаря простой модульной организации и реализуемой высокой специфичности, белки этого семейства, прежде всего комплексы класса 2 (Cas9, Cas12, Cas13), нашли широкое применение в современных технологиях редактирования и регуляции генома, включая платформы каталитически неактивного Cas (dCas) (Makarova K.S. и др., 2015). Наибольшую применимость в задачах биоинженерии нашли нуклеазы Cas9, относящиеся ко второму классу, типу II-A (*S. pyogenes*). Эффекторный блок Cas9 образует рибонуклеопротеиновый комплекс с одноцепочечной направляющей РНК (sgРНК), в котором спейсерная часть sgРНК комплементарна целевому участку

двухцепочечной ДНК (Le Rhun A. и др., 2019; Jinek M. и др., 2012). Схематически организация такого комплекса продемонстрирована на рисунке 19.

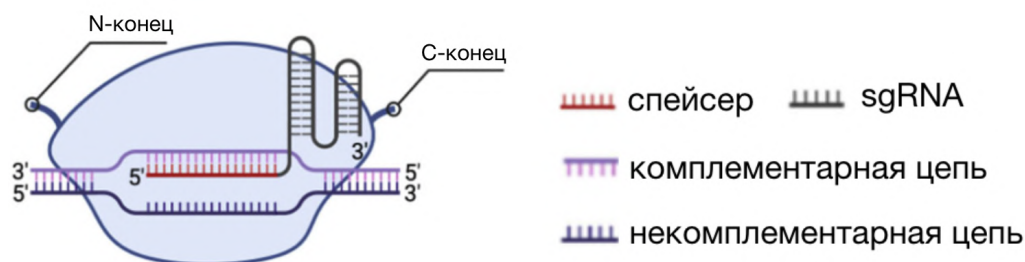


Рисунок 19 – Функциональная организация CRISPR/Cas систем на примере Cas9 *S. pyogenes*

Источник: (Kovalev M.A. et al., 2025) с изменениями. Примечание: направляющая РНК со спейсерной областью, комплементарной целевой ДНК и расположение комплементарной и некомплементарной цепей в пределах белка Cas9.

Каталитически активный Cas9 содержит две крупные доли (Рис. 20): NUC-доли (nuclease, нуклеазная доля) и REC-долю (recognition, доля распознавания). На N-конце располагается богатый аргинином участок, который участвует в связывании РНК и способствует первоначальному формированию рибонуклеопротеинового комплекса, далее следует REC-доля, отвечающая сразу за три функции благодаря наличию трёх альфа спиралей в этом участке. Домен отвечает за распознавание корректного паттерна ДНК, регуляцию правильного положения следующего далее домена HNH и фиксацию HNH в корректном каталитически компетентном состоянии (Palermo G. и др., 2018; Guo M. et al., 2019; Kim S. et al., 2025). Далее следует HNH-домен, содержащий каталитический мотив: аспаргиновая кислота (а.а. 839) гистидин (а.а. 840) аспарагин (а.а. 863), где ключевой остаток гистидин 840 функционирует каталитического основания: он отнимает протон у связанной молекулы воды, превращая в гидроксид-ион, который далее нуклеофильно атакует фосфодиэфирную связь комплементарной цепи ДНК, приводя к разрыву целевого участка. В С-концевом участке белка присутствует РАМ-распознающий домен (PI – РАМ interacting), который отвечает за специфическое узнавание мотивов РАМ в чужеродной ДНК за счёт серии водородных связей и гидрофобных контактов с малой бороздной ДНК и инициирует захват ДНК-мишени (Nishimasu H. и др., 2014; Nishimasu H. et al., 2018; Zuo Z. и др., 2019). В трёх местах на протяжении всего белка присутствует RuvC домен, представляющий три субдомена: в N-

концевом участке, С-концевом, а также после REC-домена. Объединенные три домена формируют активный центр, также отвечающий за разрыв некомплементарной ДНК. Каталитические остатки аспарагина¹⁰, глутамина⁷⁶², гистидинов ⁹⁸² и ⁹⁸⁵ а также аспарагиновая кислота ⁹⁸⁶ координируют два иона Mg²⁺, что формирует центр гидролиза фосфодиэфирных связей. В этом участке молекула воды координируется одним из ионов Mg²⁺, вследствие чего О-Н связь поляризуется превращаясь в гидроксид-ион, который также нуклеофильно атакует фосфат некомплементарной цепи ДНК (Nishimasu Н. и др., 2014; Tang Н. и др., 2021; Zuo Z., Liu J., 2016; Huai С. et al., 2017).

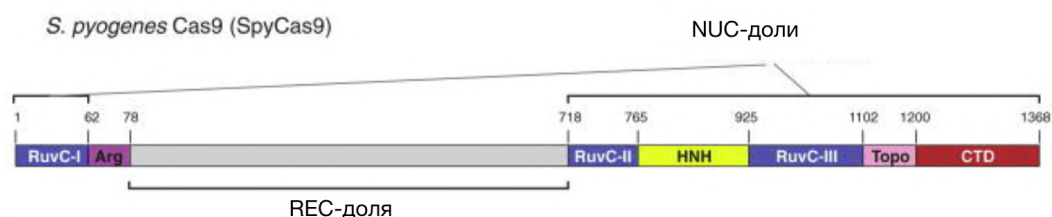


Рисунок 20 – Доменная организация Cas9 *S. pyogenes*

Источник: (Jinek М. и др., 2014) с изменениями. Примечание: NUC-доли отвечают за каталитическую активность белка, REC-доля распознает целевой участок ДНК.

1.5.2 Технологии CRISPR/dCas9 для регуляции транскрипции и эпигеномного редактирования

Для расширения спектра выполняемых задач были разработаны белки dCas (dead cas, мёртвый cas-белок), имеющие мутацию в каталитических центрах. Такой белок по-прежнему узнаёт целевые участки ДНК и связывается с ними, но не вносит разрывов (Bikard D. и др., 2013). Такая форма белка может быть использована в качестве адресного модуля, к которому добавляют домены белков-эффекторов, что позволяет реализовывать функции транскрипционной репрессии/активации или заданной ферментативной активности (Qi L.S. и др., 2013; Gilbert L.A. и др., 2013). Фьюжн-белки, включающие dCas и ферменты, меняющие локальные метки на гистонах (Hilton I.B. и др., 2015) и ДНК (Stepper P. и др., 2017) активно применяются в экспериментальных системах для точечного изменения статуса хроматина без повреждения ДНК. В практических задачах биоинженерии особенно широко используются dCas9, его доменная организация представлена на рисунке 21. Как было описано в разделе 1.5.1, в каталитической активности наиболее важны HNH-домен и домены RuvC. Мутации в этих фрагментах белка приводят к потере каталитической активности белка, а именно

мутации D10A (замена аспарагина на аланин), и H840 (гистидин на аланин) (Tian X. et al., 2019; Bikard D. и др., 2013), что отображено на рисунке 21.

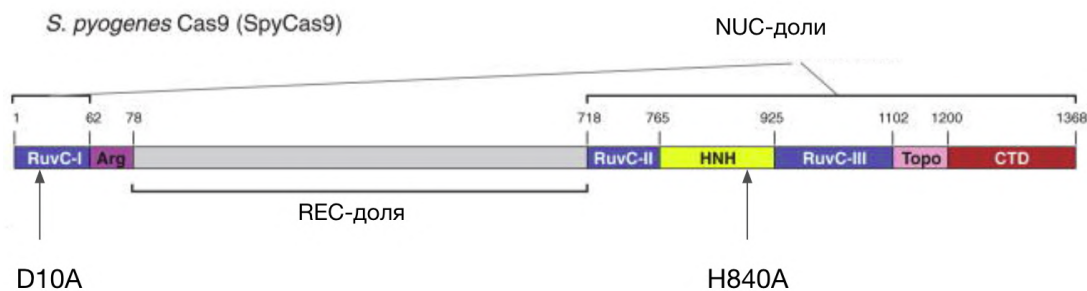


Рисунок 21 – Доменная организация dCas9 *S. pyogenes*

Источник: (Jinek M. и др., 2014) с изменениями Примечание: Стрелками указаны мутации, приводящие к инактивации каталитической функции Cas9: D10A замена аспарагина на аланин, H840 гистидин на аланин.

Такая двойная мутация модифицирует белок из нуклеазы в универсальный ДНК-связывающий модуль, который используют в составе фьюжн-конструкций для адресной доставки белков-эффекторов для решения актуальных задач биоинженерии (Brocken D.J.W., Tark-Dame M., Dame R.T., 2018; Hilton I.B. и др., 2015).

Актуальной проблемой редактирования хроматинизированного генома является ограниченная доступность целевых участков ДНК для действия Cas-редакторов, что существенно снижает эффективность и точность геномного редактирования *in vivo*. Ключевым фактором этой недоступности служит упаковка ДНК в нуклеосомы, где двойная спираль плотно обвита вокруг гистонового октамера и структурно «спрятана» от внешних факторов. Нуклеосома выступает барьером для Cas-комплексов как физически (за счёт стерического препятствия и ограничения доступа к сайту распознавания), так и динамически: локальные флуктуации и временные разворачивания ДНК на нуклеосоме происходят редко и недостаточно долго, чтобы обеспечить стабильное связывание и дальнейшую активность Cas-фермента. В результате участки ДНК, расположенные в центральных областях нуклеосомного витка или в плотно упакованных хроматиновых доменах, редко подвергаются эффективному редактированию, что делает понимание и преодоление нуклеосомного барьера особенно важным для развития более надёжных методов геномного редактирования. Преодоление этого барьера требует разработки новых подходов, направленных на временное «раскрытие» хроматина или повышение способности Cas-редакторов проникать в плотные участки генома. В этом контексте

исследование влияния ремодирующих агентов таких как PARP1 и p53, на структуру хроматина и взаимодействие с ферментами, регулирующими его доступность, приобретает особую актуальность. Понимание механизмов, позволяющих повысить проницаемость хроматина для инструментов редактирования, может стать ключом к более точному и эффективному геномному инжинирингу.

1.6. Заключение к литературному обзору

Анализ современной литературы свидетельствует, что классическая роль PARP1 как сенсора повреждений ДНК и центрального регулятора репарации изучена достаточно хорошо. В то же время накопленные за последние годы данные убедительно показывают, что PARP1 обладает пионерподобной активностью: он способен связываться с неповреждённой нуклеосомной ДНК, инициировать локальные перестройки хроматина и создавать платформу для связывания регуляторных белков, включая транскрипционный фактор p53. Однако молекулярные механизмы этой неканонической функции остаются практически неохарактеризованными. Особенно фрагментарно изучены события, происходящие непосредственно на уровне нуклеосомы – базовой единицы хроматина. Неизвестно, как PARP1 взаимодействует с нуклеосомами разного состава и каким образом на эту функцию влияет замена канонического гистона на вариантный H2A.Z, который в составе нуклеосом соответствует открытому, функционально активному состоянию хроматина. Неизученным остаётся и реализация пионерной функции PARP1 в условиях более компактизированного (закрытого) хроматина, формирование которого опосредовано линкерными гистонами, в частности H1.0. Важно также изучить, способен ли PARP1 кооперироваться или конкурировать с p53 при связывании с нуклеосомами, и как характер этих взаимодействий зависит от структуры гистонового октамера. Отсутствие таких фундаментальных данных препятствует не только пониманию роли PARP1 в регуляции транскрипции и репарации, но и использованию его пионерной активности в прикладных целях, в частности для обеспечения доступа систем геномного и эпигеномного редактирования (CRISPR/dCas) к плотно упакованным участкам хроматина.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Реактивы, коммерческие наборы, плазмиды

1. Плазмиды pTZ51 603-42A (содержит НПП 603), pDS1-601 (содержит НПП 601), pGemTeasy 603-42A-R16 (содержит НПП 603-42A с сайтом связывания R16, любезно предоставлена Бондаренко Е.А.), pET-27b(+)-p53 DBD (любезно предоставлена Бондаренко Е.А.), pET-28-PARP1 (любезно предоставлена Коровиной А.Н), Addgene Pmj841(dCas9). Плазмиды, содержащие гистоновые белки любезно предоставлены Афониным Д.А.: pET-3a-hN2A, pET-3a-hN2B, pET-3d-hN3, pET-3a-hN4, pET-3a-hN2A.Z TL.

2. Коммерческий набор для очистки ДНК PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Россия), коммерческий набор для выделения плазмиды QIAprep Spin Miniprep Kit(250) (Qiagen,США), набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей(Евроген, Россия), Хемилюминесцентный субстрат для пероксидазы хрена SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, США).

3. Никелевая колонка для аффинной хроматографии HiTrap Chelating (5 мл, Cytiva, США), HiTrap Q HP (5 мл, Cytiva, США), HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva, США) Amicon Ultra MWCO 100 кДа (Sigma-Aldrich, США), PVDF-мембраны (Bio-Rad, США).

4. Агароза (Helicon, Россия), акриламид (Gibco, США), бис-акриламид (Amresco, США), Trizma Base (Sigma, США), ЭДТА (AppliChem, Испания), Дитиотреитол (Sigma, США), Nonidet P-40 (NP40, Sigma, США), β-меркаптоэтанол (ICN Biomedicals Ltd., США), Глицин (Helicon, Россия), Додецилсульфат натрия (SDS, Sigma, США), Уксусная кислота ледяная CH₃COOH (Химмед, Россия), Vasto-tryptone (BD Biosciences-US, США), acto-yeast (BD Biosciences-US, США), NaCl (CODEX Panreac, Испания) Агар (BD Biosciences-US, США), Этанол (ОАО РЕАХИМ, Россия), Фенол (Sigma aldrich, США) , Ацетат натрия – NaOAc (Sigma aldrich, США), бутанол (ОАО РЕХИМ, Россия), Taq-ДНК-полимераза (Евроген, Россия), dNTP (Евроген, Россия), Раствор MgCl₂ 25 мМ (Promega, США), dNTP смесь нуклеотидтрифосфатов для ПЦР 10 мМ каждого (Евроген, Россия), буфер для ПЦР 10x (Евроген, Россия), Коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США), антитела к полимерам АДФ-рибозы (моноклональные: клон 10H, ab14459, Abcam, США), пепстатин А (PanReac AppliChem, Германия), ТСЕР (Servicebio, Китай), Хлорид цинка – ZnCl₂ (Labochem, Германия), бензамидин (Solarbio, Китай), смесь ингибиторов

протеаз (сOmplete Mini, EDTA-free, Roche, Швейцария), IPTG (Suzhou Yacoo Science, Китай), Ресвератрол (Merck, Германия), β -Никотинамид аденин динуклеотид гидрат (НАД⁺, Sigma-Aldrich, США), Антитела Anti-Mouse IgG (H+L) козы, поликлональные, конъюгированные с HRP (ABclonal, Китай), Bis-Tris (Amresco, США), L-лизин HCL – Lys-HCl (PanReac AppliChem), Bis-Tris (abcr, Германия), MOPS (Pallav, Индия), PMSF (Amresco, США), SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific), NaOH (Sigma-Aldrich, США), бычий сывороточный альбумин – BSA (Sigma Aldrich, США) , глицерин (Panreac, Испания), KCl (Sigma Aldrich, США), DTT (Sigma Aldrich)

2.2 Буферы

2.2.1 Буферы для получения нуклеосом

Таблица 1 – Состав диализных буферов для проведения реконституции нуклеосом

Молярность NaCl	5M NaCl (мл)	1M TrisHCl, pH 7.5 (мл)	NP40 20% (мл)	0,5M ЭДТА(мл)	14,3M β -меркапто-этанол (мкл)	Mili-Q	Время диализа
2M	100	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	1 час
1.5M	75	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	1 час
1M	50	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	1 час
0.75M	37,5	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	1 час
0.5M	25	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	2,5 часа
0.01M	0,5	2,5	1,25	0,1	87	до 250 мл	ночь

Источник: составлено автором

Электродный буфер HE (HEPES ЭДТА) для препаративного электрофореза:
10 mM HEPES-NaOH pH 8,0; 0,2 mM ЭДТА.

Буфер HE/BSA (HEPES ЭДТА/BSA) для препаративной очистки нуклеосом из полиакриламидного геля: 10 mM HEPES-NaOH pH 8,0; 0,2 mM ЭДТА, 200 мкг/мл BSA.

2.2.2 Буферы для получения гистонового октамера

10× SA-буфер: 400 мМ NaOAc (pH 5,2), 10 мМ ЭДТА (pH 8,0), 100 мМ Lys-HCl.

SAU200: 40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 6 М мочевины, 200 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол.

SAU600: 40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 6 М мочевины, 600 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол

Лизисный буфер: 40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 7–7,5 М мочевины, 200 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, ингибиторы протеаз (таблетка Roche Complete, 1 мМ PMSF, 5 мкг/мл пепстатин А).

Буфер для рефолдинга: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 2 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанол.

Буфер для анфолдинга: 7–7,5 М гуанидин-HCl, 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 10 мМ DTT.

2.2.3 Буферы для получения PARP1

Ресуспенсирующий буфер для клеток: 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP, 10 мМ бензамид;

Коктейль ингибиторов протеаз (1:100), 0,5 мкг/мл лейупептин, 0,7 мкг/мл пепстатин А, 0,5 мкг/мл антипаин, 0,5 мкг/мл апротинин, 1 мМ бензамидин, 1 мМ PMSF;

Буфер уравнивания Ni-колонки: 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP;

Лизирующий буфер: 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP 0,1 % NP-40 + ингибиторы протеаз

Буфер Low salt для Ni-колонки: 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP 20 мМ имидазола

Буфер High salt для Ni-колонки: 25 мМ HEPES pH 8,0, 1 М NaCl, 0,5 мМ TCEP 20 мМ имидазола

Элюирующий буфер для Ni-колонки: 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP 250 мМ имидазола

Буфер «No salt» для гепариновой колонки: 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ TCEP;

Буфер А для гепариновой колонки (буфер А): 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, 200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ TCEP;

Буфер В для гепариновой колонки (буфер В): 50 мМ Tris-HCl pH 7,0, 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ТСЕР;

Буфер для гель-фильтрации: 25 мМ HEPES pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ТСЕР;

Буфер для хранения белка 2× сток буфера для хранения: 40 мМ HEPES pH 8,0, 300 мМ NaCl, 0,2 мМ ТСЕР, 80 % глицерина, 0,3 мМ ZnCl₂;

2.2.4 Буферы для получения p53DBD

Буфер А: 20 мМ цитрат натрия pH 6,1, 100 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол.

Буфер Б: 20 мМ цитрат натрия pH 6,1, 1 М NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол.

Буфер для лизиса клеток: 20 мМ цитрат натрия pH 6,1, 100 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ DTT.

Буфер для хранения p53: 20 мМ цитрат натрия pH 6,1, 100 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 10% глицерин.

2.2.5 Буферы для dCas9

Лизисный буфер / буфер для эквilibрации: 20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 5% (об./об.) глицерин, 20 мМ имидазол, перед лизисом добавляли ингибиторы протеаз (1 таблетка на 50 мл, PMSF 1 мМ, пепстатин А 1:1000 по объёму, бензамидин 1 мМ, ТСЕР 0,5 мМ).

Буфер для промывки I: 20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 5% глицерин, 25 мМ имидазол.

Буфер для промывки II: 20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 5% глицерин, 50 мМ имидазол.

Буфер для промывки III (элюирующий буфер): 20 мМ HEPES pH 7,5, 300 мМ NaCl, 5% глицерин, 250 мМ имидазол.

Буфер хранения dCas9: 20 мМ HEPES pH 7,5, 150–200 мМ KCl, 10% глицерин, 1 мМ ТСЕР.

2.2.6 Реакционные буферы для формирования комплексов с нуклеосомами

Реакционный буфер для формирования комплексов нуклеосома - PARP1

“ТВ150” – 20 мМ Tris-HCl 150 мМ KCl 5мМ MgCl₂ 1 мМ β-меркаптоэтанол.

Реакционный буфер для формирования комплексов нуклеосома - р53

ТВ 40 – 20мМ Tris-HCl 40 мМ KCl 5мМ MgCl₂ 1мМ β-меркаптоэтанол

2.2.7 Буферы для проведения вестерн-блоттинга

10× буфер MOPS/SDS для электрофореза Bis-Tris-гелей: 1 М MOPS, 0,5 М Tris-основание, 0,35 М SDS, 10 мМ ЭДТА (динатриевая соль), рН 7,7 (рабочий 1× буфер получают разведением 1:10).

Буфер для переноса: 0,1 М MOPS, 50 мМ Tris-основание, 35 мМ SDS, 1 мМ ЭДТА, 20% (об./об.) этанол, рН 7,7.

PBS-T: фосфатно-солевой буфер (PBS), 0,05–0,1% Твин-20

Буфер PBS-T: фосфатно-солевой буфер (PBS), 0,05–0,1% (об./об.) Твин-20.

Блокирующий раствор: PBS-T, 5% (мас./об.) обезжиренного сухого молока.

Раствор для инкубации со стрептавидин-HRP: 1× PBS-T, 1% (мас./об.) обезжиренного сухого молока, стрептавидин-HRP в разведении 1:5000–1:10000.

Буфер PBS для промывки: фосфатно-солевой буфер без детергента.

2.3 Оборудование

Аналитические весы Discovery (Ohaus Corporation, США), Спектрофотометр Nanodrop 2000с, UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США), Система для получения воды высокой степени очистки MilliQ Synergy UV (Merck Millipore, США), Система детекции флуоресценции Typhoon Trio (Cytiva, США), Amersham ImageQuant 800 (Cytiva, США), Настольный термостат ThermoStat plus (Eppendorf, Германия), Настольная центрифуга с охлаждением 5415R (Eppendorf, Германия), Источник питания HV (Bio-Rad Laboratories, США), Лабораторные весы Scout II (Ohaus Corporation, США), рН-метр Sartorius Professional Meter PP-25-P11 (Sartorius), Камеры для электрофоретического разделения Mini-Sub Cell GT, Mini-PROTEAN Tetra Cell, Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad Laboratories, США), Программируемый термостат Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США), Система видеодокументирования ChemiDoc XRS Plus, LSM710-confocor3 (Zeiss, Германия), Электропоратор (VTX, США), Хроматограф (GE, Healthcare), ДНК-амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США), Флуориметр Qbit3, Вихревой смеситель для пробирок (vortex mixer, Thermo Scientific), Магнитные мешалки MSH-20A (Isotemp, США), Микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия).

2.4 Обозначения нуклеосом и праймеров

В работе использовали нуклеосом позиционирующую последовательность 603 Widom (Widom J., 1992), а также её модифицированный, в котором участок был заменен на сайт связывания p53 (CDKN1A): GAACATGTCCCAACATGTTG (рисунок 22) (Sasse-Dwight S., Gralla J.D., 1990). С целью выявления вклада нуклеотидной последовательности в реализацию эффектов исследуемых белков в экспериментах использовали последовательность 601 Widom (Lowary P.T., 1998). Схематическое расположение пары флуоресцентных меток, введенных в состав нуклеосом, представлено на рисунке 14. Нуклеосомы P2, M2, D2, R16 10-10, 18-18 содержат матричную ДНК (147 п.н) и два линкера длиной 20 п.н. Нуклеосомы 25-25 содержат матричную ДНК (147 п.н.) и два линкера длиной 40 п.н, нуклеосомы M0 - содержат только матричную ДНК без линкеров

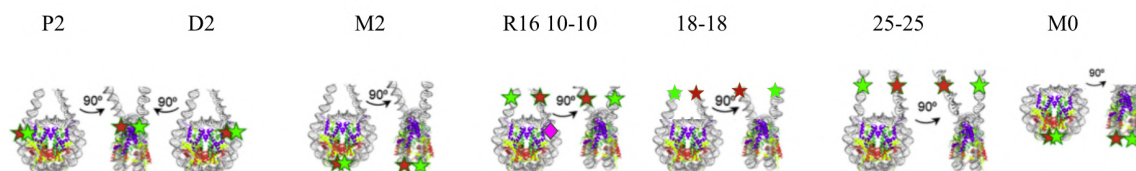


Рисунок 22 – Схематическое изображение расположения меток в разных типах нуклеосом, используемых в работе

Источник: составлено автором. Примечание: P2 – нуклеосомы, содержащие флуоресцентную пару меток в проксимальной области +13/+91; D2 – нуклеосомы, содержащие флуоресцентную пару меток в дистальной области +57/+13; M2 – нуклеосомы, содержащие флуоресцентную пару меток в медиальной области (+35/+112); R16 10-10 нуклеосомы, содержащие последовательность, включающую сайт связывания p53 (обозначен ромбом цвета маджента) и метки в линкерной области, находящиеся на расстоянии 10 нуклеотидов от входа; 18-18 и 25-25 – нуклеосомы, с метками в линкерной области, находящиеся на расстоянии 18 и 25 нуклеотидов от входа, соответственно. M0 – нуклеосомы, без линкеров, содержащие флуоресцентную пару меток в медиальной области.

Полные нуклеотидные последовательности праймеров для синтеза матричной ДНК:

Последовательность 603 42A:

Положения меток M2:

Forward_Me20Cy5_42

5'-

CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCG[Cy5-dT]CTCTC-3'

Reverse_Me20Cy3_42

5'-

GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCC[Cy3-dT]CTTTC-3'

Положения меток P2:

Forward_Pr20Cy3_42 5'-CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGT-3'

Reverse_Pr20Cy5_42

5'-

GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3'

Положения меток D2

Forward_Di20Cy5_42

5'-

CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGC[Cy3-dT]TAGGC-3'

Reverse_Di20Cy5_42

5'-

GAACCATGATGGGCACTGGGTACCCCAGGGACT[Cy5-dT]GAAGTAATAAGGAC-3'

Положения меток 25-25

Reverse_TspR_T1Cy3 - 5'-ACACggCgCACTgCC[Cy3-dT]ACCCAAACgACACCggCACgAg-3'

Forward_EcoRI_T1Cy5 5'TAAggCgAATTCAC[Cy5-dT]ACTTTCTggCAAgAAAATgAgCT-3'

Положения меток 18-18

Reverse_spR_T8Cy3 - 5'-ACACggCgCACTgCCAACCCAA[Cy3-dT]CgACACCggCACgAg-3'

Forward_EcoRI_T8Cy5 - 5'TAAggCgAATTCACAАСТTTTTT[Cy5-dT]gCAAgAAAATgAgCT-3'

Для положения меток 10-10, с сайтом связывания R16

F-LN20-Cy3, 5'-CAAgCgACAC[Cy3-dT]ggCACTgggCCggTTCgCgCgCCCgCCTTCCgTgTgTTgTCgTCTCTCgggCgT-3'

Reverse-R16_20-Cy5,

5'-gAACCATgAT[Cy5-
dT]ggCACTgggCCCCAgCAACATgTTgggACATgTTCggAgggCCTCTTTC-3'

Последовательность 601:

Положения M2

601_M2_reverse:

CgAACCATgATgCCggATCCCCTggAgAATCCCggTgCCgAggCCgCTCAATTgg[
Cy3-dT]CgTAgAC

601_M2_forward:

AAgCgACACCggCACTgggATAggATgTATATATgTgACACgTgCCTggAgACT[C
y5-dT]gggAg

**Последовательности для нуклеосом, использованных в экспериментах с
dCas9 (601 Widom):**

601_prox_forward:

CAAgCgACACTggCACTgggATAggATTTATA[Cy3-dT]ATgTg

601_prox_reverse:

gAACCATgATTCCggATCCCCTggAgAATCCCTgTgCCgAggCCgCTCAATTggT
TgTAgACAgCTCTAgCACCGC[Cy5-dT]TAAAC

Последовательности РНК:

tracr-RNA-Cas9:

AGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAACAACUUGAAAAAGUGGCA
CCGAGUCGGUGCUU

601_spacer_dyad_9: CCCCCGCGTTTTAACCGCCAGUUUAAGAGCUAUGCU

2.5 Получение гистоновых октамеров

Гистоновые октамеры были получены в лаборатории В.М. Студитского под руководством Коровиной А.Н. при участии автора.

2.5.1 Получение отдельных гистонов: H2A, H2A.Z, H2B, H3, H4

Экспрессия рекомбинантных гистонов

Гистоны человека (H2A, H2B, H3.1, H3.3, H4, H2A.Z) экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3), либо в Rosetta 2 pLysS (DE3) при наличии редких кодонов. Клетки выращивали в среде LB или Dynamite (12 г/л триптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 6,3 мл/л глицерина, 28 мМ КН₂РO₄, 71 мМ К₂НРO₄, 0,5% глюкоза, 1,62 мМ MgSO₄) с

антибиотиком. Индукцию проводили при $OD_{600} = 0,8-1,0$ добавлением IPTG до конечной концентрации 0,2–1 мМ и инкубацией 1,5–4 ч при 37°C. Клетки осаждали (3900 g, 20–30 мин, 4°C), промывали PBS и замораживали при –80°C.

Лизис клеток и выделение гистонов

Осадки клеток ресуспендировали в лизисном буфере (40–60 мл на 6 л культуры). Лизис проводили ультразвуком (амплитуда 100%, импульсы 30 с/60 с пауза, эффективное время 15 мин, контроль охлаждения), дополнительно – френч-прессом (2–3 цикла при 1500 psi). Лизаты центрифугировали (41 000 g, 1 ч, 4°C) и фильтровали через мембрану 0,45 мкм (PVDF с префильтром из стекловолокна).

Ионообменная хроматография

Осветленный лизат последовательно наносили на HiTrap Q FF (5 мл) и HiTrap SP FF (5 мл), уравновешенные SAU200, со скоростью 1 мл/мин. Колонки промывали 25 мл SAU200 (40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 6 М мочевины, 200 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол); элюцию проводили линейным градиентом NaCl от SAU200 (40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 6 М мочевины, 200 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол) к SAU600 (40 мМ NaOAc (pH 5,2), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ Lys-HCl, 6 М мочевины, 600 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол) за 50 мин, поток 4 мл/мин). Фракции анализировали методом SDS-ПААГ (15–18%), содержащие гистоны объединяли, концентрировали ультрафильтрацией (Amicon, 10 кДа MWCO, 5000 g, 4°C) и диализовали против деионизованной воды (3 × 2 л, 4°C). Для гистонов, содержащих цистеин (H3), в воду добавляли 2 мМ β-меркаптоэтанол. Гистоны лиофилизовали и хранили при –80°C.

2.5.2 Получение гистонового октамера

Рефолдинг и сборка октамеров

Лиюфилизованные H2A, H2B, H3 и H4 растворяли в буфере для анфолдинга (2–4 мг/мл), смешивали в массовом соотношении 1,5:1,5:1:1 и доводили до 1 мг/мл. Смесь инкубировали при 20°C в течение 30 мин и проводили диализ (MWCO 6–8 кДа) против буфера для рефолдинга (3 × 2 л, 4°C, ночные диализы на втором и третьем этапе). Осадки удаляли центрифугированием (20 000 g, 15 мин, 4°C).

Гель-фильтрация

Смесь гистонов функционировали на колонке Superdex 200 10/300 GL (Cytiva), уравновешенной буфером для рефолдинга (0,3 мл/мин; фракции по 0,5 мл). Фракции,

содержащие октамеры, объединяли и концентрировали (Amicon, 10 кДа MWCO). Концентрацию рассчитывали спектрофотометрически ($\epsilon_{280} = 48\ 845\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, $M_r = 108\ 544\ \text{Da}$) и анализировали электрофоретически в SDS-ПААГ (Рис. 23). Образцы доводили до 2–6 мг/мл, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

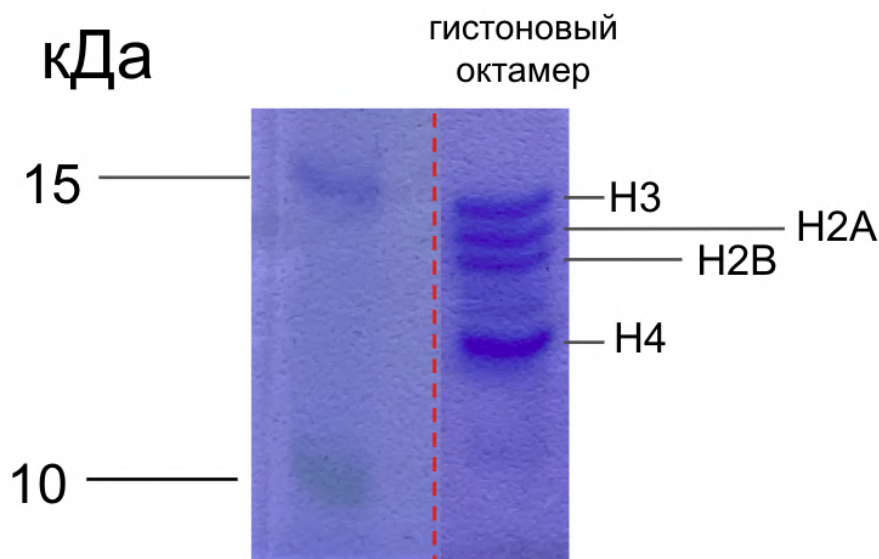


Рисунок 23 – Электрофорез рекомбинантных гистонов октамера человека

Источник: получено автором. Примечание: SDS-ПААГ (15%) дорожки: маркер молекулярной массы (M) и очищенного рекомбинантного октамера гистонов человека.

2.6.3 Линкерный гистон H1.0

Рекомбинантный линкерный гистон H1.0 *Xenopus laevis* был любезно предоставлен проф. Y. Bai (NCI, NIH, США). При проведении электрофореза в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ) линкерный гистон H1.0 мигрировал как белок с более высокой молекулярной массой, чем расчетная (Рис. 24). Такая аномальная подвижность объясняется неравномерным связыванием додецил сульфата натрия с белком в связи с высокой долей основных аминокислот в С-концевом домене H1.0 (Ivic N., Bilokapic S., Halic M., 2017).

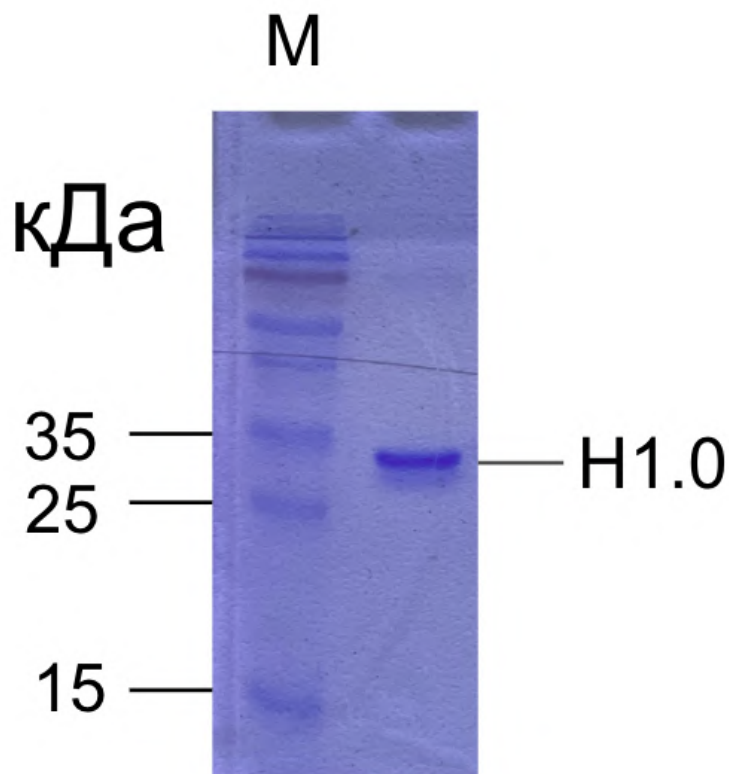


Рисунок 24 – Гель-электрофорез рекомбинантного H1.0 *Xenopus laevis*

Источник: получено автором. Примечание: SDS-ПААГ (15%) дорожки: маркер молекулярной массы (M) и очищенного рекомбинантного гистона H1.0 *Xenopus laevis*.

2.5.4 Получение донорного хроматина

Препарат хроматина, обедненный линкерным гистоном, получали из эритроцитов цыплят по методике, описанной ранее (Gaykalova D.A. et al., 2009) в лаборатории под руководством профессора В. М. Студитского.

2.6 Получение PARP1 человека

Плазмидная конструкция pET-28, содержащая ДНК-последовательность, кодирующую полноразмерный PARP1 человека была любезно предоставлена к.х.н. Коровиной А.Н. Плазмиду трансформировали в экспрессионный штамм *E.coli* Rosetta и растили на среде LB-агар, содержащей канамицин 50 мкг/мл. Далее инокулировали единичную колонию в среду LB с добавлением антибиотика канамицина 50 мкг/мл. Далее предкультуру добавили в соотношении 1:100 в среду LB, содержащую канамицин 50 мкг/мл и 10 mM бензамид (для ингибирования активности PARP1). Культуру клеток поместили на орбитальный шейкер при 180 rpm и 37°C до достижения оптической

плотности OD₆₀₀~0,5-0,8. Для контроля экспрессии белков до индукции отобрали 1 мл клеток и осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, осадок поместили на -20°C. Далее клетки охлаждали до 4°C, добавляли 100 мкМ ZnCl₂ и 0,2 мМ IPTG. Индукцию проводили при 16°C в течение 18 часов при rpm 180. На следующий день отобрали 1 мл клеточной культуры для контроля индукции, осаждали методом центрифугирования, осадок подготавливали для анализа SDS-ПААГ. Основную часть клеток центрифугировали при 4°C в течение 30 минут на 3200 об/мин. Осадок ресуспендировали в охлажденном буфере (25 мл/1 л культур; 25 мМ HEPES pH 8,0, 500 мМ NaCl, 0,5 мМ TCEP, 10 мМ бензамид). Лизис клеток проводили с использованием френч-пресса. Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием (1 ч. 20 000 g, 4°C), супернатант фильтровали через мембрану (MWCO 0,22 мкм), супернатант использовали для аффинной хроматографии. Для хроматографии использовали колонку HiTrap Chelating, заряженную Ni²⁺. Колонку уравнивали буфером для уравнивания, затем наносили клеточный лизат при скорости потока 2мл/мин. После нанесения материала колонку последовательно промывали буферами low salt (5 объемов), high salt (5 объемов) и снова low salt (10 объемов). Это устраняло неспецифически связанные белки перед элюцией PARP1 с гистидиновым тагом элюирующем буфером. Фракции элюата анализировали методом SDS-ПААГ. Далее фракции, содержащие целевой белок разбавляли буфером “no salt” и доводили концентрацию NaCl до 200 мМ. Раствор наносили на гепариновую колонку (HiTrap Q) при скорости потока 1 мл/мин. Колонку промывали буфером А, затем элюировали белок градиентом NaCl от 200 мМ до 1 М в течение 100 минут. Фракции, содержащие PARP1 по анализу в 10% SDS-ПААГ. Заключительный этап очистки проводили методом гель-фильтрация с использованием колонки HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, уравновешенную буфером для гель-фильтрации. Полученные ранее фракции, содержащие PARP1 концентрировали с использованием ультрафильтрационных концентраторов Amicon Ultra (MWCO 50 кДа) при 4°C до объема 0,7 мл и наносили на колонку со скоростью потока 0,3 мл/мин. Элюцию контролировали по поглощению при 280 нм и фракции, соответствующие целевому белку анализировали методом SDS-ПААГ (Рис. 25). К полученному белку добавляли буфер для хранения, содержащий 40% глицерина.

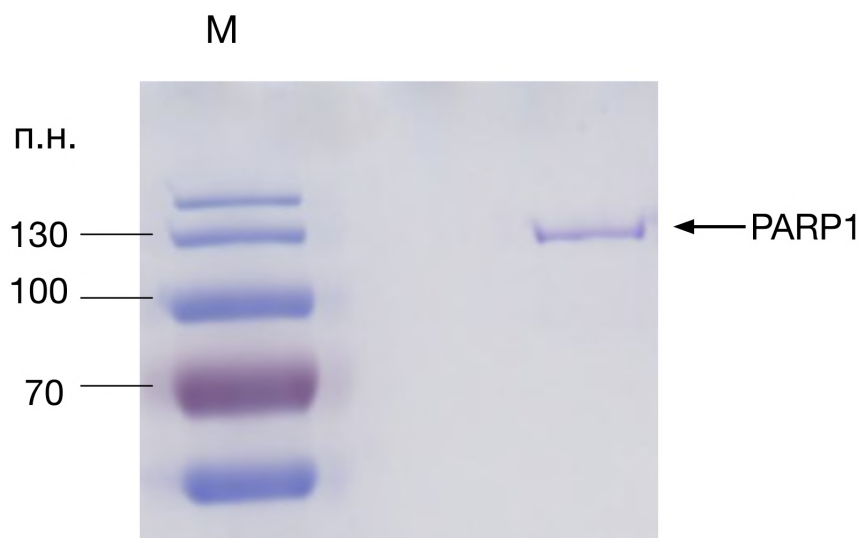


Рисунок 25 – Электрофорез рекомбинантного PARP1

Источник: получено автором. Примечание: SDS-ПААГ (10%) дорожки: маркер размера белка (M) и рекомбинантный PARP1 человека.

2.7 Получение и очистка p53DBD человека

Плазмидная конструкция pET-27b, содержащая ДНК-последовательность, кодирующую ДНК-связывающий домен человека p53 (аминокислотные остатки 94-293, p53DBD) была любезно предоставлена к.б.н. Бондаренко Е.А. Конструкция была трансформирована в штамм *E.coli* BL21(DE3) для последующей экспрессии белка. Далее одиночную колонию со свежей чашки (<4 суток) инокулировали в 100 мл среды LB, содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали при 37°C при 180 rpm для поддержания аэрации. Далее в 1 литр LB-канамицин добавляли предкультуру в соотношении 1:100 и инкубировали при 37°C на орбитальном шейкере при 180 rpm до OD600~0,4-0,6. До индукции отбирали 1 мл клеточной культуры, осаждали центрифугированием, удаляли супернатант и замораживали осадок на -20 для последующего анализа в SDS-ПААГ (контрольное измерение). Охлажденную культуру клеток индуцировали добавлением 0,5 mM IPTG в присутствии 100 мкМ ZnCl₂ и инкубировали ночь при 20 на орбитальном шейкере при 180 rpm.

На следующий день отбирали 1 мл образца, осаждали центрифугированием и осадок использовали для проверки качества индукции с помощью SDS-ПААГ. Оставшиеся клетки осаждали центрифугированием (30 минут, 3700 g, 4°C), ресуспендировали охлажденным лизирующим буфером (20 mM цитрат натрия pH 6,1, 100

мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ DTT) из расчета 1:3 (объем осадка:объем буфера). В суспензию добавляли смесь ингибиторов протеаз (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche; 1 таблетка на 50 мл буфера) и ингибитор сериновых протеаз PMSF (фенилметилсульфонилфторид) до концентрации 1мМ). Клетки лизировали с использованием френч пресса (3 прохода (при 4°C), центрифугировали при 3700 об/мин, супернатант фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.

Очистку p53DBD проводили методом ионообменной хроматографии на колонке HiTrap (5 мл). Колонку последовательно промывали 5 объемами буфера А (20 мМ цитрат натрия рН 6,1, 100 мМ NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол) для удаления консервирующего раствора, далее промывали 5 объемами буфера Б (20 мМ цитрат натрия рН 6,1, 1 М NaCl, 10 мкМ ZnCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол), после чего уравнивали 20 объемами буфера А. Образец наносили на колонку со скоростью 2,5 мл/мин, не связавшийся белок промывали не менее 5 объемами буфера А. Элюцию p53DBD проводили градиентом ионной силы от 0,1М NaCl до 1М NaCl (буферы А и Б) при общем объеме градиента 100 мл, скоростью 2,5 мл/мин и объеме фракции 2,5 мл). Колонку регенерировали 5 объемами буфера Б, далее промывали 10 объемами буфера А. Полученные фракции, а также образцы до и после индукции анализировали в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (Рис. 26).

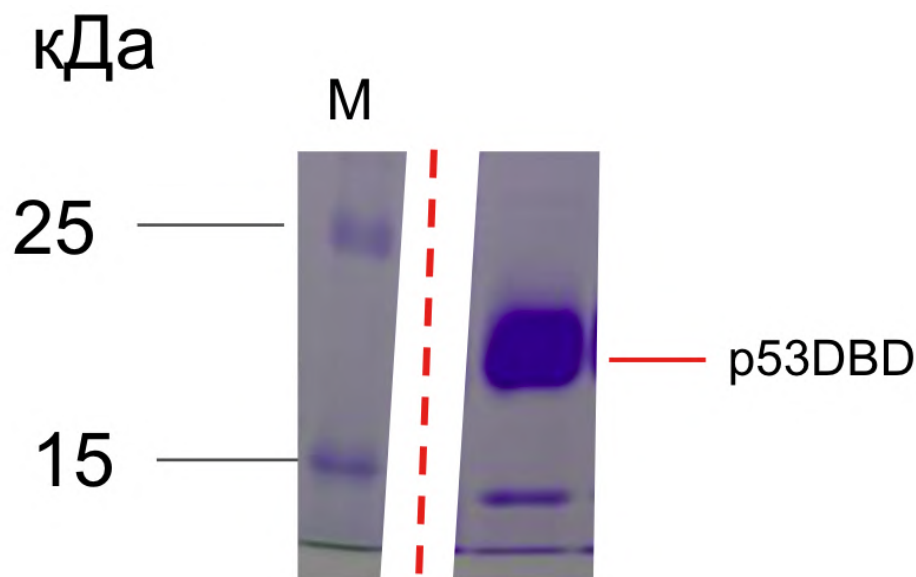


Рисунок 26 – Электрофорез p53DBD после очистки на ионообменной колонке (HiTrap Q HP (5 мл, Cytiva, США)

Источник: получено автором. Примечание: SDS-ПААГ (12%) дорожки: маркер размера белка (M) рекомбинантного ДНК-связывающего домена и p53 (p53DBD) после ионообменной хроматографии

2.8 Получение и очистка dCas9

Очищенный рекомбинантный dCas9 *Streptococcus pyogenes* был любезно предоставлен Мариловцевой Е.В. Плазмида, кодирующая dCas9 была получена из коллекции Addgene Pmj841. Конструкцию трансформировали в штамм *E.coli* BL21(DE3) и растили на среде LB-агар, содержащей канамицин 50 мкг/мл. Одиночную колонию инокулировали в 100 мл LB, содержащей глюкозу 0,04% канамицин (50 мкг/мл) и инкубировали ночь при 180 rpm на орбитальном шейкере при 30°C. На следующий день предкультуру добавляли в LB-канамицин (50 мкг/мл) в соотношении 1:100 и инкубировали при 34°C на 180 rpm на орбитальном шейкере до оптической плотности OD600 ~0,6-0,8. Далее отбирали 1 мл культуры и центрифугировали при максимальных оборотах настольной центрифуги, осадок помещали на -20°C. Клетки охлаждали до 4°C и индуцировали экспрессию добавлением IPTG до конечной концентрации 0,25 mM и инкубировали при 16°C в течение ночи. На следующий день отбирали 1 мл клеток и осаждали центрифугированием, осадок помещали на -20°C для дальнейшего анализа

эффективности индукции. Основной объем клеток осаждали центрифугированием при 3000 об/мин и 4°C в течение 30 минут. Осадок промывали охлажденным лизисным буфером (50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% глицерин, 20 mM имидазол) и добавляли смесь ингибиторов протеаз (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche; 1 таблетка на 50 мл буфера, пепстатин А 1:1000 по объёму, бензамидин 1 mM, ТСЕР 0,5 mM), а также ингибитор сериновых протеаз PMSF до концентрации 1mM. Клетки лизировали с использованием френч пресса (3 прохода при 4°C), центрифугировали при 3700 об/мин, супернатант фильтровали через мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.

Очистку dCas9 проводили методом Ni-аффинной хроматографии. Никиле-содержащую колонку последовательно промывали 5 объемами буфера для эквilibрации колонки (20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% глицерин, 20 mM имидазол). Фильтрованный лизат наносили на колонку при скорости потока 2,5 мл/мин, что обеспечивало эффективное связывание dCas9, содержащего гистидиновый таг. Далее колонку промывали 5 объемами буфера I (20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% глицерин, 25 mM имидазол), далее 5 объемами буфера II до снижения оптической плотности элюата до уровня фона. Элюцию проводили с использованием буфера III (20 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 5% глицерин, 250 mM имидазол), установленный объем фракций 2,5 мл. Колонку регенерировали 5 объемами буфера Б, далее промывали 10 объемами буфера А. Полученные фракции, а также образцы до и после индукции анализировали в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (Рис. 27). Фракции, содержащие целевой белок объединяли и концентрировали, используя ультрафильтрацию (Amicon Ultra MWCO 100 кДа). В качестве буфера для хранения использовали 20 mM HEPES, pH 7,5, 150–200 mM KCl, 10 % глицерина, 1mM ТСЕР. Полученный препарат хранили при -80°C в буфере хранения.

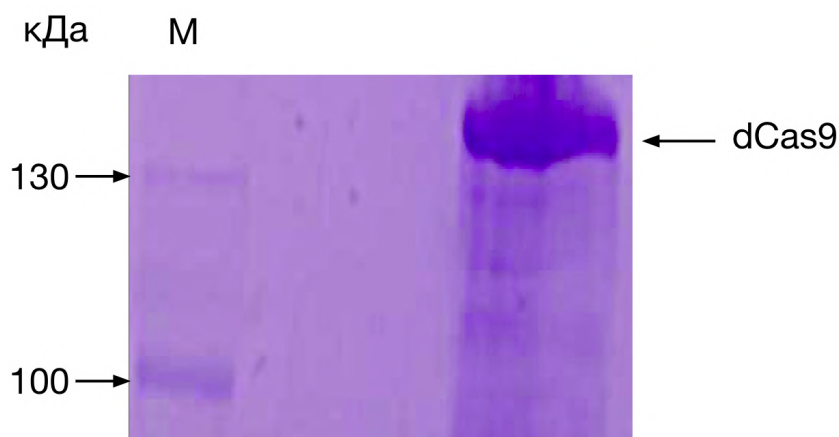


Рисунок 27 – Электрофорез рекомбинантного dCas9

Источник: получено автором. Примечание: SDS-ПААГ (10%) дорожки: маркер размера белка (M) и рекомбинантный dCas9.

Гидовые РНК (*tracr-RNA* и *cr-RNA*) синтезировали и очищали в коммерческой компании Синтол, Россия. Для получения sgRNA, используемых для позиционирования dCas на конкретный участок ДНК, препараты РНК эквимольно смешивали в буфере 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM ЭДТА и проводили отжиг в амплификаторе при 95°C в течение 5 минут, далее по заданной программе образец охлаждался на 1°C каждую последующую минуту до 4°C.

2.9 Получение позиционированных нуклеосом

В работе использовали разработанную в лаборатории последовательность s603-42A, полученную на основе классической последовательности 603 Widom (Kulaeva O.I. и др., 2009; Lowary P.T., 1998):

CCCGGTTTCGCGCGCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGAGCTTCTAAG
TACGCTTAGCGACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGATGT
TGAAAGAGGCCCTCCGTCCTTATTACTTCAAGTCCCTGGGGT (выделенные
нуклеотиды отражают замену исходных аденинов).

2.9.1 Трансформация плазмидной ДНК в клетки *E.coli*

Для приготовления жидкой питательной среды использовали LB Broth Miller, который растворяли дистиллированной водой согласно инструкции производителя и стерилизовали в течение 20 мин при 121°C. Полученную среду хранили при комнатной температуре до востребования. После охлаждения до комнатной температуры в среду

добавляли стерильный раствор ампицилина до конечной концентрации 100 мкг/мл. Твердую среду готовили аналогично с добавлением агара до конечной концентрации 3%. После охлаждения до 40°C в среду добавляли ампициллин до конечной концентрации 100 мкг/мл и разливали по 10 мл в чашки петри и оставляли до застывания. Готовые чашки хранили при +4°C до востребования в течение месяца.

Трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* XL 10 Gold плазмидой pTZ51 603-42A проводили стандартным методом с тепловым шоком. К обработанным клеткам добавляли среду LB и инкубировали в течение часа на ротаторе при 37°C. Далее клетки наносили на среду LB-агар, содержащую селективный антибиотик, и инкубировали при 37°C в термостате в течение 12-16 часов. На следующий день отдельную колонию инокулировали в 5 мл среды LB-ампициллин и помещали на ротатор на 12 часов при 37°C. Выделение плазмиды из бактериальной культуры проводили с использованием QIAprep Spin Miniprep Kit(250) (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя.

2.9.2 Амплификация матрицы с помощью ПЦР для последующей реконституции хроматина

Для получения флуоресцентной ДНК матрицы использовали метод ПЦР с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов.

В качестве матриц ДНК использовали плазмиды с различными нуклеосом позиционирующими последовательностями: pTZ51 603-42A, pDS1-601, pGemTeasy 603-42A-R16. В целом, длина матричной ДНК для нуклеосом с двумя линкерами по 20 п.н. составляла 187 п.н, с линкерами 40 п.н. - длина составляла 227 п.н.

Для синтеза использовали программу для ПЦР (таблица 2) с применением стандартных рабочих концентраций компонентов реакционной смеси (10x Taq buffer, 50x dNTP и др), а также флуоресцентно меченные олигонуклеотиды с конечной концентрацией 0,2 мкМ, режим амплификации представлен в таблице 2.

Таблица 2. Параметры температурного цикла для ПЦР синтеза нуклеосомных матриц (35 циклов).

	Температура, С°	Время, сек
Начальная денатурация	95.0	120
Основной цикл	94.0	10
	63.0	20
	72.0	20
Финальная элонгация	72	300

Источник: составлено автором.

2.10.3 Очистка ПЦР продукта

Очистку осуществляли с помощью Clean up standart kit (Евроген, Россия), в соответствии инструкциями производителей. Концентрацию матрицы с флуоресцентными метками Су5 и Су3 определяли электрофоретически с помощью 4% нативного ПААГ в 0,5x TBE (Рис. 28) и с использованием NanoDrop.

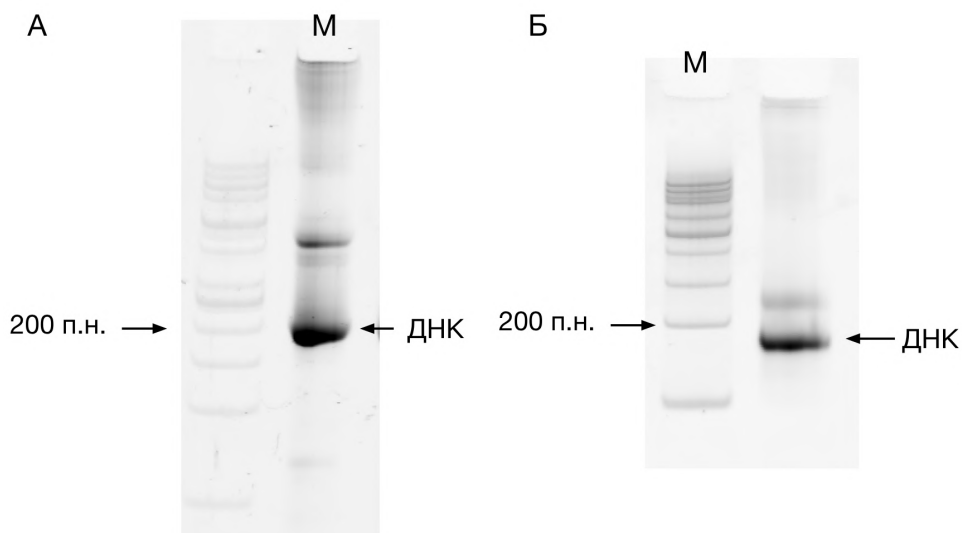


Рисунок 28 – Электрофорез очищенных мононуклеосом

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4%-ный нативный ПААГ) А ПЦР – продукта после реакции и маркера длины ДНК (GeneRuler 50 b.p.) Б – очищенного ПЦР продукта и маркера длины ДНК (GeneRuler 100 b.p.), изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Су3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

2.9.4 Реконституция нуклеосом гистоновым октамером

Для реконституции подготавливали раствор из стоковых буферов (таблица 1). Нуклеосомы, собранные с использованием рекомбинантных гистонов получали при использовании растворов 1-6 (таблица 1). К раствору 1 (таблица 1, 25 мкл) добавляли ДНК (2000 нг) и гистоновый октамер (канонический или H2A.Z-содержащий) в соотношении 1:1, объем доводили Milli-Q до 50 мкл, соответствующих объему диализной ячейки.

Нуклеосомы, получаемые с использованием донорного хроматина получали при использовании во время диализа растворов 3-6 (таблица 1). К раствору 3 добавляли ДНК (2000 нг) и донорный хроматин в соотношении 1:1.1, объем доводили Milli-Q до 50 мкл, соответствующих объему диализной ячейки.

Многоступенчатый диализ проводили в буферах по таблице (таблица 3):

Таблица 3. Время проведения диализа

Буфер	Время, часы
Диализный буфер 2 М	1
Диализный буфер 1,5 М	1
Диализный буфер 1М	1
Диализный буфер 0,75М	1
Диализный буфер 0,5М	2,5
Диализный буфер 0,01М	ночь

Источник: составлено автором.

2.9.5 Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле в нативных условиях

Анализ качества сборки нуклеосом проводили с помощью электрофоретического разделения проб в полиакриламидном геле при минимизации попадания света в камеру для избежания фотоповреждения флуорофоров Су3/Су5. В таком случае использовали 4,5% ПААГ с соотношением акриламида к бисакриламиду 39:1, разделение проводили в буфере 0,5x HEPES-ЭДТА (10 mM HEPES-NaOH pH 8,0; 0,2 mM ЭДТА) при 4°C.

2.9.6 Очистка нуклеосом

Очистку нуклеосом проводили электрофоретически с использованием двухкомпонентного геля. Для повышения механической стабильности нижней границы геля и обеспечения равномерной миграции продукта, а также для предотвращения выхода нуклеосом за пределы геля, использовали уплотняющий слой 10% ПААГ на основе буфера HEPES-ЭДТА. Основной слой разделяющего геля использовали 4% ПААГ на основе буфера HEPES-ЭДТА и использовали гребенку с широкими лунками, которые способны вместить до 60 мкл образца с учетом утяжелителя (40% сахара, конечная концентрация в лунке 10%). Далее проводили предварительный электрофорез без нанесения проб в течение 2 часов, что обеспечивало более эффективное разделение при

миграции образцов. С помощью конфокального сканера Turphoon (Cytiva определяли положение нуклеосом для дальнейшего механического извлечения из геля участка, содержащего целевой продукт. Полученный фрагмент геля измельчали и добавляли NE-BSA в соотношении 1:1,1 (масса геля:объем буфера) и инкубировали ночь на +4°C. На следующий день добавляли 0,5 от массы геля и центрифугировали при +4°C в течение 3 минут. Раствор отбирали с поверхности геля в пробирки low adhesion и хранили при +4°C. Полученные нуклеосомы характеризовали в нативном ПААГ 0,5 x TBE (Рис. 29).

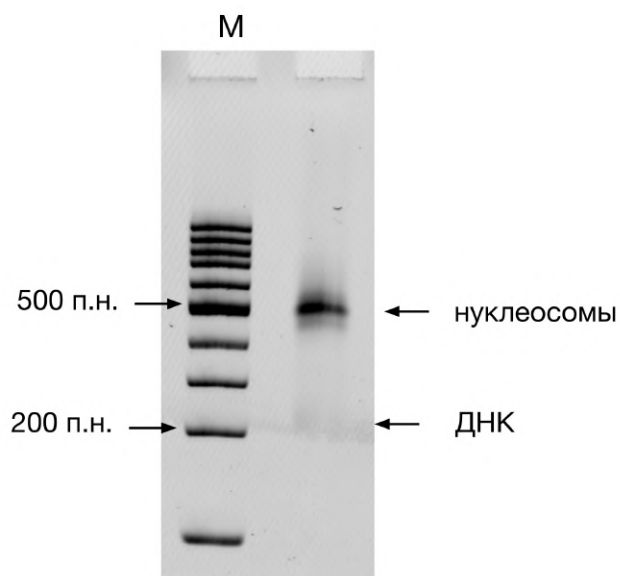


Рисунок 29 – Электрофорез очищенных мононуклеосом

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4%-ный нативный ПААГ) дорожки: маркер длины ДНК (GeneRuler 100 b.p.) и очищенные нуклеосомы, изображение получено на установке Amersham Turphoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Су3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

2.10 Подготовка белок-нуклеосомных комплексов

2.10.1 Получение комплексов нуклеосома PARP1

Комплексы нуклеосома-PARP1 получали в буфере ТВ 150 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM β-меркаптоэтанол) при комнатной температуре. Для этого использовали 1-2 нМ (для spFRET) или 3-4 нМ (для EMSA) нуклеосом и смешивали с PARP1 до заданной конечной концентрации белка и инкубировали в течение 30 минут, минимизируя воздействие света для исключения фотодеградации флуоресцентных меток

Cy3/Cy5. Далее проба была готова к изучению методом EMSA или изучению методом spFRET.

При анализе каталитической активности PARP1, после формирования комплекса PARP1- нуклеосома в течение 15 минут, добавляли 100 мкМ НАД⁺ и инкубировали еще 30 минут, Далее проводили анализ продуктов реакции одним из методов.

2.10.2 Получение комплексов нуклеосома-p53DBD

Комплексы нуклеосома-p53DBD получали в буфере TB40 (0,25x). Для этого проводили предварительную инкубацию p53DBD с компетиторным агентом (poly(dI:dC)/poly(I:C)) в течение 5 минут при комнатной температуре. После этого к смеси добавляли 1-2 нМ (для spFRET) или 3-4 нМ (для EMSA) нуклеосом и инкубировали дополнительно 20 минут при комнатной температуре, минимизируя воздействие света для исключения фотодеградация флуоресцентных меток Cy3/Cy5. В случае последующего добавления PARP1, его вносили в предварительно инкубировали смесь и продолжали инкубировать в течение 20 минут при комнатной температуре.

2.10.3 Получение комплексов нуклеосома-H1.0

Для получения хроматосом (комплексов нуклеосомы с линкерным гистоном) 1-2 нМ (для spFRET) или 3-4 нМ (для EMSA) нуклеосом нкубировали в присутствии H1.0 в буфере TB 150 (или TB40 0,25x для последующего анализа с p53DBD) в течение 20 минут при комнатной температуре и минимизации попадания света. Готовый образец анализировали методами EMSA/spFRET, а также в экспериментах с последовательным добавлением нескольких белков добавляли PARP1 или p53DBD и инкубировали в соответствии описанной ранее методике.

2.10.4 Получение комплексов нуклеосома-dCas9-PARP1

Комплексы dCas9-нуклеосома получали в буфере 1xCas (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1% глицерол, 1 mM DTT). К предварительно проинкубированным комплексам dCas9:sgRNA (в эквимольном соотношении) при 37°C добавляли 1-2 нМ (для spFRET) или 3-4 нМ (для EMSA) нуклеосомы и инкубировали при 37°C в течение 2 часов при перемешивании на виброшейкере. Для изучения действия PARP1 на доступность нуклеосомы к dCas9, заранее готовили комплекс нуклеосома-PARP1 при описанных выше условиях и буфере 1xCas, далее комплекс помещали к

предварительно проинкубированные комплексы dCas9:sgRNA и инкубировали по описанной ранее методике. Готовые образцы помещали на гель для изучения методом EMSA.

2.11 EMSA (electrophoretic mobility shift assay) – изучение электрофоретической подвижности в геле.

Образование комплексов с изучаемыми белками исследовали по изменению их электрофоретической подвижности в неденатурирующем, нативном 4% ПААГ геле. Для исследования комплексов с PARP1, а также PARP1/dCas9 использовали соотношение акриламид-бисакриламид 59:1. В качестве электродного буфера использовали 0,2x TBE. Для лучшего разделения комплексов в геле проводили предварительный электрофорез до снижения напряжения до 4 мА/стекло Mini-Protean (BioRad). Перед нанесением в гель проводили инкубацию нуклеосом концентрацией 3-4 нМ в буфере ТВ 150 в течение 30 минут на +25°C. Электрофорез проводили в течение 1,5 часа. С помощью установки Turphoon (Cytiva, США) сканировали гель с высокой интенсивностью и определяли положение комплексов по флуоресценции меток Cy3 и Cy5. Используемые каналы Cy2: возбуждение 488 нм, эмиссионный фильтр 525BP20 (диапазон пропускания 515-535 нм), для Cy3: возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20 (диапазон пропускания 560-580 нм), Cy5: возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30 (диапазон пропускания 655-685 нм); Для регистрации FRET в парах Cy3-Cy5 образцы сканировали в донорном (Cy3) и акцепторном (Cy5) каналах – таким образом получали (bulk FRET). В образец с GeneRuler 100 bp добавляли SYBR Green I (Thermo Fisher), который возбуждали в канале Cy2 и Cy3 при сканировании.

2.12 Измерение spFRET (single particle Forster resonance energy transfer) раствора нуклеосом

Для регистрации spFRET использовали микроскоп LSM710-confocor3 (Zeiss, Германия). spFRET-микроскопия реализуется путем измерения эффективности FRET от одиночных нуклеосом, свободно диффундирующих в растворе. Статистический анализ полученных данных проводился в специальных программах (GraphPad Prism, FRETTY) с получением профилей распределения частиц от эффективности FRET нуклеосом (Kudryashova K.S. и др., 2015). Возможность применения метода spFRET микроскопии

обеспечена путем ковалентной пришивки к ДНК-матрице двух флуорофоров, цианового 3 (Cy3) и цианового 5 (Cy5), которые представляют собой донор и акцептор для реализации эффекта FRET (Buning R., Noort J. van, 2010; Choy J.S., Lee T.-H., 2012). Изменение эффективности FRET при исследовании нуклеосом, меченных в коровой области, отражает изменение расстояния между Cy3 и Cy5, которое может быть вызвано структурными перестройками соседних витков ДНК, такими как смещение ДНК в соседних витках, отворачивание части витка от гистонового кора, образование петель, восстановление ДНК-гистоновых взаимодействий (Buning R., Noort J. van, 2010; Koormans W.J.A. et al., 2007). Изменение величины FRET при исследовании нуклеосом, меченных в линкерной области, отражает изменение расстояния между Cy3 и Cy5, вызванное структурными перестройками линкерной ДНК, такими как потеря или восстановление контактов между ДНК и гистонами в области входа/выхода ДНК из нуклеосомы, изгибание линкерной ДНК при взаимодействии с белковыми факторами. Альтернативные варианты флуоресцентного мечения позволяют выявить и изучить структурные перестройки, происходящие в трех областях коровой области нуклеосомы и в различных участках линкерной ДНК.

Эффективность FRET (E) рассчитывали по формуле (1):

$$E = \frac{I(Cy5) - 0.19 \times I(Cy3)}{I(Cy5) + 0.81 \times I(Cy3)}, \quad (1)$$

где 0,19 и 0,81 – коэффициенты частичного перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5;

I – интенсивность флуоресценции в канале детектора.

2.13 Анализ синтеза полимеров АДФ-рибозы методом Вестерн блот

Реакционные смеси для анализа продуктов поли(АДФ-рибозил)ирования после активации PARP1 нуклеосомами в присутствии НАД⁺ (см. выше описание условий) инкубировали в соответствии с описанными ранее методиками и проводили разделение в SDS-ПААГ при 120 В до разделения белков по молекулярной массе.

Далее полученный гель, а также PVDF-мембраны инкубировали в охлажденном буфере для переноса в течение 15 минут. Далее гель совмещали с мембраной и осуществляли перенос белков методом влажного электрофоретического переноса при силе тока 350 мА в течение 2 часов при температуре 4 °С. После этого мембрану переносили в блокирующий раствор и инкубировали в течение 1 часа при постоянном

мягком покачивании. Для детекции поли(АДФ-рибозы) мембрану инкубировали с моноклональными антителами мыши к поли(АДФ-рибозу) (анти-PAR, клон 10H, ab14459, Abcam, США), разведёнными 1:10000 в блокирующем растворе в течение 2 часов при постоянном покачивании. Далее мембрану промывали в блокирующем растворе без добавления антител дважды по 10 минут при комнатной температуре и постоянном покачивании. Полученную мембрану инкубировали в течение ночи при +4°C в блокирующем растворе с добавлением антител anti-mouse-HRP (ABclonal, Китай, конъюгата с пероксидазой хрена) в разведении 1:5000. Далее мембрану промывали PBS-T дважды и дополнительно промывали PBS (без добавления детергента).

Сигнал визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата для пероксидазы (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) в соответствии с протоколом от производителя. Мембрану инкубировали со смесью двух рабочих растворов в соотношении 1:1 и инкубировали в течение 2 минут с ограничением доступа света. Далее сигнал регистрировали на системе для хемилюминесцентной детекции (ChemiDoc XRS Plus, Bio-Rad).

2.14 Регистрация спектров поглощения ресвератрола

Спектры поглощения ресвератрола (RSV, 0,1-10 мкМ) измеряли в водном растворе, содержащем 0,25% диметилсульфоксида с помощью NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific, США) в спектральном диапазоне 250-400 нм. Спектры зарегистрированы в двух независимых измерениях и усредняли.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Влияние PARP1 на структуру нуклеосом

3.1.1 PARP1 связывается с нуклеосомами и образует три типа комплексов

PARP1 способен связываться с одно- и двухцепочечными разрывами ДНК (Ali A.A.E. et al., 2012), кроме этого, он связывается с нуклеосомами, меняя архитектуру хроматина (Muthurajan U.M. et al., 2014), но точные детали этого механизма не ясны. В рамках данного этапа работы использовали препараты мононуклеосом, содержащих нуклеосом-позиционирующую последовательность Widom 603 и октамер гистонов, полученный из хроматина цыплят *Gallus gallus*. Исследование методом EMSA анализа в нативных условиях показали, что PARP1 способен связываться с нуклеосомами в стехиометрии 1:3 (нуклеосома:PARP1) (Рис.28). Для уточнения стехиометрического состава комплексов нуклеосом с PARP1 анализировали флуоресцентные сигналы отдельных комплексов на геле и сопоставляли их с флуоресценцией свободных нуклеосом. Было обнаружено сходство частотных распределений этих интенсивностей, что указывает на то, что три полосы, наблюдаемые в геле EMSA, наиболее вероятно соответствуют комплексам одной нуклеосомы с несколькими молекулами PARP1 (Maluchenko N.V. и др., 2021; Koshkina D. и др., 2025). Аналогично, анализируя изображение гель-электрофореза (Рис. 30) можно наблюдать последовательное формирование комплексов по мере увеличения концентрации PARP1. При 5 нМ наблюдается образование первого комплекса нуклеосома-PARP1, при 10 нМ – второго, при 20 нМ – третьего. Предположительно, присоединение двух молекул PARP1 происходит по концам линкерной ДНК, которые распознаются PARP1 как двухцепочечные разрывы ДНК (Langelier M.-F. et al., 2011; Ali A.A.E. et al., 2012; Langelier M.-F. et al., 2012), а присоединение третьей молекулы может происходить в области диады (Koshkina D. и др., 2025).

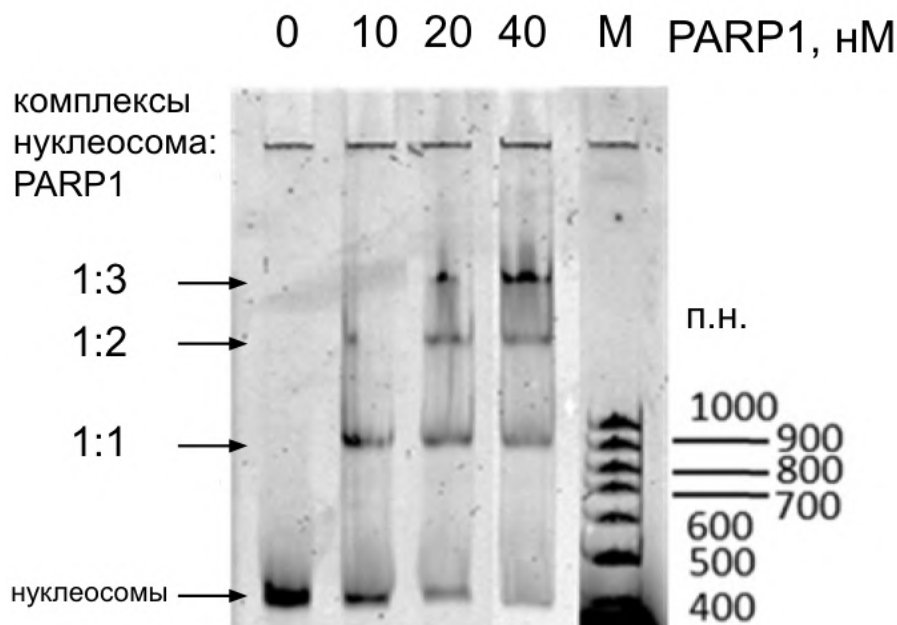


Рисунок 30 – PARP1 формирует комплексы с нуклеосомами в стехиометрии 3:1

Источник: из авторского исследования (Koshkina D. и др., 2025). Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома–PARP1 при различных концентрациях PARP1, изображение получено на установке Amersham Turphoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

3.1.2 PARP1 изменяет конформацию нуклеосом в линкерной и коровой областях

В продолжение исследования, описанного в разделе 3.1.1, в следующей серии экспериментов использовали нуклеосомы со следующими положениями пар флуоресцентных меток: проксимальное P2 (+13/+91), медиальное (+35/1+112), дистальное D2 (+57/+135) и линкерное (18-18).

С целью выявления структурных перестроек нуклеосом, обусловленных взаимодействием с PARP1, p53 и H1 как ключевой использовался метод spFRET. Данный подход основан на регистрации безызлучательной передачи энергии между флуорофорами (донором и акцептором), которая становится возможной при их взаимном сближении на дистанцию, не превышающую величину R_0 — так называемый ферстеровский радиус, зависящий от спектральных характеристик применяемой пары красителей. Для экспериментов была выбрана пара Cy3/Cy5, обладающая радиусом Ферстера 5.5 ± 0.3 нм (Roy R., Hohng S., Ha T., 2008). Такой выбор продиктован тем, что рабочий диапазон данного метода (2.5 – 10 нм) перекрывает масштабы структурных

перестроек, характерных для нуклеосом. Это дает возможность получать количественные данные о переходах между упорядоченной (компактной) и разупорядоченной (релаксированной) структурными формами нуклеосом.

В работе флуорофоры Су3 и Су5 вводились в соседние витки ДНК нуклеосомы. В процессе формирования нуклеосомы, когда ДНК оборачивается вокруг гистонового октамера, молекулы Су3 и Су5 оказываются на расстоянии, достаточном для возникновения высокоэффективного резонансного переноса энергии. Локализация меток в позиции P2 была выбрана с учетом неодинаковой подвижности отдельных зон нуклеосомы. Остаток 91 нуклеотида начиная от входа в нуклеосомную ДНК локализован в области плотного связывания ДНК с гистонами, что гарантирует надежную фиксацию акцепторной метки Су5 и позволяет рассматривать её как статичный якорь. В то же время, донор Су3, внесенный в положении 13 нуклеотида, попадает во фланкирующий участок. Данная область характеризуется высокой лабильностью («дыханием») вследствие менее прочного связывания ДНК с гистонами. Следовательно, регистрируемый FRET-сигнал от нуклеосом P2 отражает подвижность пограничной зоны и дает возможность фиксировать изменения, возникающие при откручивании ДНК более чем на 25 пар нуклеотидов (Buning R., Noort J. van, 2010; Phelps C. et al., 2013; Sunami T. et al., 2025).

Выбор позиций 35 и 112 пар нуклеотидов для внедрения меток обусловлен необходимостью контроля за сохранением целостности нуклеосомы. Донорная метка Су3 на 35 паре оснований размещена на значительном удалении от края ДНК (в пределах второго витка суперспирали), что минимизирует влияние быстрых конформационных переходов краевых участков. Акцептор Су5 в позиции 112 п.н. также зафиксирован на значительном удалении от другого края ДНК. Падение эффективности FRET при данном расположении меток будет однозначно указывать на модификации в очень отдаленных от входа сегментах коровой части нуклеосомы. Для оценки изменений, происходящих на «выходе» из нуклеосомной ДНК использовали пару D2 (+57/+135). Позиция +57 находится внутри коровой части нуклеосомы (второй суперспиральный виток) в зоне прочных ДНК-гистоновых контактов, что позволяет использовать метку в этом сайте как стабильный репер. Позиция +135 локализована на дистальном витке в области выхода ДНК, характеризующейся определенной подвижностью вследствие «дыхания» другого пограничного района нуклеосомы; здесь инициируется раскрытие структуры при внешних воздействиях. Для оценки последствий структурных изменений во внешней ДНК,

примыкающей к зоне входа/выхода нуклеосомы, флуорофоры Cy3 и Cy5 закрепляли на линкерных участках за пределами нуклеосомы – на соседних спиралях, на удалении 10 пар оснований от границы нуклеосом-позиционирующей последовательности (18-18).

Согласно данным spFRET анализа (Рис. 31) интактные нуклеосомы, содержащие метки в коровой области (M2, P2, D2) характеризуются наличием двух субпопуляций частиц в профиле распределения по эффективности FRET (E_{PR}). Коэффициент E_{PR} – это величина эффективности FRET без коррекции на квантовые выходы флуоресцентных меток и на чувствительность системы детекции в разных диапазонах длин волн. Основной пик профиля E_{PR} нуклеосом, содержащих метки в коровой области, располагается в области высоких значений E_{PR} (>0.7) и соответствует плотно упакованным нуклеосомам, тогда как минорный, расположенный в области низких (~ 0) значений E_{PR} , отражает частично развернутые нуклеосомы, а также свободную ДНК. Для нуклеосом, содержащих метки в линкерной области, характерен иной профиль распределения E_{PR} : основная субпопуляция таких нуклеосом здесь располагается в области низких значений E_{PR} (~ 0), а минорная в области средних значений E_{PR} (~ 0.4). Связывание первой молекулы PARP1 (при концентрации ~ 10 нМ) вызывает слабые структурные изменения нуклеосомы, добавление второй и третьей молекул (20–40 нМ) приводит к более значительным перестройкам: сближению линкерных областей и существенной реорганизации коровой части, затрагивающей нуклеосомную ДНК по всей длине.

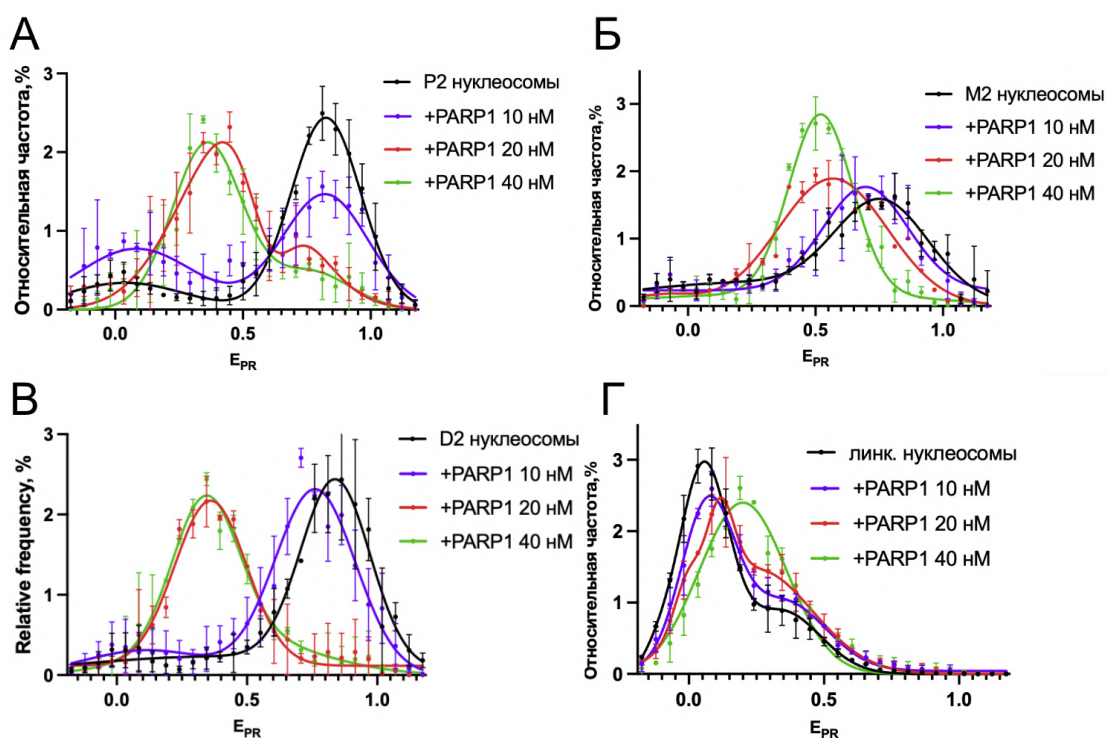


Рисунок 31 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом, собранных на донорном хроматине

Источник: получено автором. Примечание: А–Г Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Нуклеосомы, содержали Су3/Су5 метки в положениях: (А) P2 +13/+91, (Б) M2 +35/+112, (В) D2 +57/+135, (Г) линк (-18/-18).

В целом, полученные данные в сопоставлении с литературой указывают, что две молекулы PARP1, связываясь с концами ДНК через цинковые пальцы (скорее всего, по механизму распознавания двунитевых разрывов (Ali A.A.E. et al., 2012)), незначительно меняют структуру нуклеосомы. Третья же молекула, которая, вероятно, по данным литературы, взаимодействует с диадой нуклеосомы (Langelier M.-F. et al., 2011) и вызывает основные структурные перестройки нуклеосомной ДНК. Таким образом, изменения в укладке ДНК в коровой области происходит на протяжении всей длины нуклеосомной ДНК.

Наши результаты, полученные в условиях, приближенных к физиологическим, подтверждают гипотезу о том, что третья молекула PARP1, взаимодействуя непосредственно с кором нуклеосомы, а не по концам, инициирует глобальные конформационные изменения, охватывающие всю длину нуклеосомной ДНК. Это

позволяет рассматривать PARP1 как белок с пионерными свойствами, способный открывать хроматиновую структуру для последующего связывания других факторов репарации и транскрипции

3.1.3 Реорганизующий (“пионерподобный”) эффект PARP1 не зависит от последовательности ДНК и наличия линкерной ДНК.

Посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов имеют существенное значение для хроматин-ассоциированных белков. Они регулируют структуру хроматина и его биологические функции за счет модуляции электростатических взаимодействий между ДНК и гистонами (Tolsma T.O., Hansen J.C., 2019). Комбинации модификаций (таких как, ацетилирование, метилирование, фосфорилирование) могут приводить как к локальной, так и к деконденсации хроматиновых участков, что в свою очередь модулирует доступность ДНК для транскрипционных факторов и репарационного аппарата клетки (Clayton C., Hotz H.R., 1996). В данной серии экспериментов использовали рекомбинантный октамер гистонов человека, лишенный ПТМ, чтобы проверить, сохраняет ли PARP1 сходный тип реорганизующий эффект на нуклеосому.

Нуклеосомы, собранные на рекомбинантном гистоновом октамере человека, содержали метки в медиальной области нуклеосомы. При последовательном добавлении к ним 10 и 40 нМ PARP1 наблюдается поэтапное образование трех комплексов нуклеосома–PARP1 (Рис. 32Б), аналогично тому, что это было показано в разделе 3.1.2 для нуклеосом, полученных на хроматине *Gallus gallus* (Рис. 31 Б). Кроме того, для обеих концентраций отмечается изменение профиля E_{PR} (Рис. 32 А). Профили интактных нуклеосом претерпевают изменения при добавлении белка: уже при 10 нМ возникает новое состояние, характеризующееся двумя субпопуляциями нуклеосом. Основная остается в области высокой эффективности E_{PR} , а минорная возникает в области средней эффективности E_{PR} (~0,4). Повышение концентрации белка переводит профиль нуклеосом в единое состояние, соответствующее наличию трех комплексов на электрофореграмме (Рис. 32 Б) Полученные данные согласуются с ранее описанными результатами (Рис. 30, 31) демонстрируя аналогичный паттерн образования комплексов и реорганизации нуклеосомного кора.

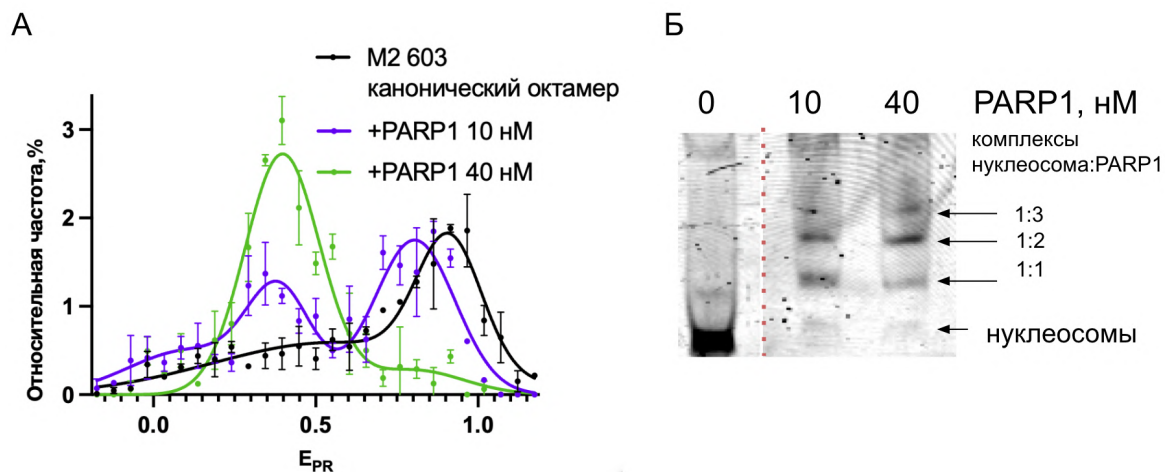


Рисунок 32 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом без посттрансляционных модификаций в гистоновом октамере

Источник: получено автором. Примечание: А – частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Б – электрофореграмма (4%-ный нативный ПААГ) комплексов нуклеосома–PARP1, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30).

Для оценки влияния ДНК-последовательности на PARP1-зависимую реорганизацию были использованы нуклеосомы, полученные на НПП 601 Widom. Эта последовательность характеризуется несколько повышенной стабильностью по сравнению с 603 Widom за счет более высокого сродства ДНК-матрицы к гистоновому октамеру (Chen R.-W. и др., 2025; Lowary P.T., 1998; Armeev G.A. et al., 2025).

В этой серии экспериментов нуклеосомы также содержали рекомбинантный гистоновый октамер человека и метки в медиальной области. Аналогично предыдущим исследованиям (Рис. 31 А-Г), первый комплекс нуклеосома–PARP1 возникал при 10 нМ PARP1 и демонстрировал аналогичные, но более выраженные структурные изменения (Рис. 33 А). Повышение концентрации PARP1 до 40 нМ приводило к формированию трех комплексов нуклеосома–PARP1 (рис 33 Б) и возникновению единого состояния частотных распределений (Рис. 33 А). Таким образом, связывание PARP1 инициирует структурную реорганизацию нуклеосомы, сопровождающуюся изменением конформационной организации и перераспределением взаимодействий между гистонами и ДНК вне зависимости от последовательности ДНК.

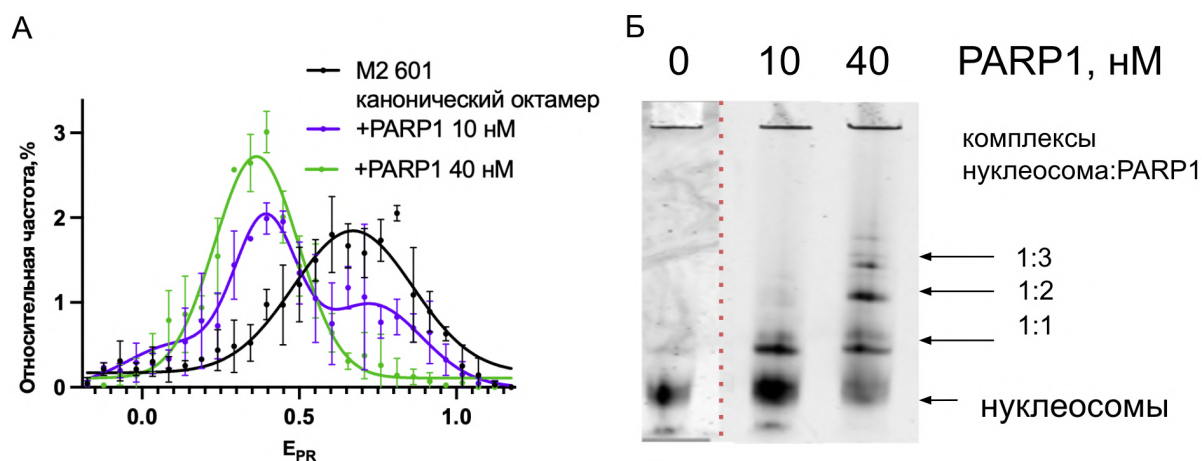


Рисунок 33 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом, полученных на НПП Widom 601

Источник: получено автором. Примечание: А – частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Б – электрофореграмма (4%-ный нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-PARP1, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30).

Для проверки, зависит ли наблюдаемый эффект от наличия линкерной области подготовили нуклеосомы на основе НПП 603 Widom без линкерных участков. В нуклеосомах длиной 147 п.н. метки расположили в медиальном положении (+35/+112). Наблюдаемый паттерн реорганизации коровой области остался неизменным: при низких концентрациях PARP1 формировалось состояние, характеризующееся неполным переходом основной субпопуляции в измененное состояние (Рис. 34 А). При повышении концентрации возникал профиль, характеризующийся наличием одного пика в области среднего E_{PR} (~0,4). Однако, для достижения такого эффекта потребовалось несколько повысить концентрацию белка до 50 нМ (на нуклеосомах, содержащих линкерную область, эффект достигался уже при 40 нМ). Кроме того, анализ электрофоретической подвижности в геле показал, что стехиометрия, наблюдаемая в комплексах нуклеосома-PARP1 при 50 нМ, составляет 1:2, что отличается от наблюдаемой ранее стехиометрии 1:3. Вероятно, в связи со стерическим затруднением связанным с ограниченностью области, доступной для связывания PARP1, наиболее предпочтительными сайтами посадки PARP1 являются концевые участки нуклеосомной ДНК.

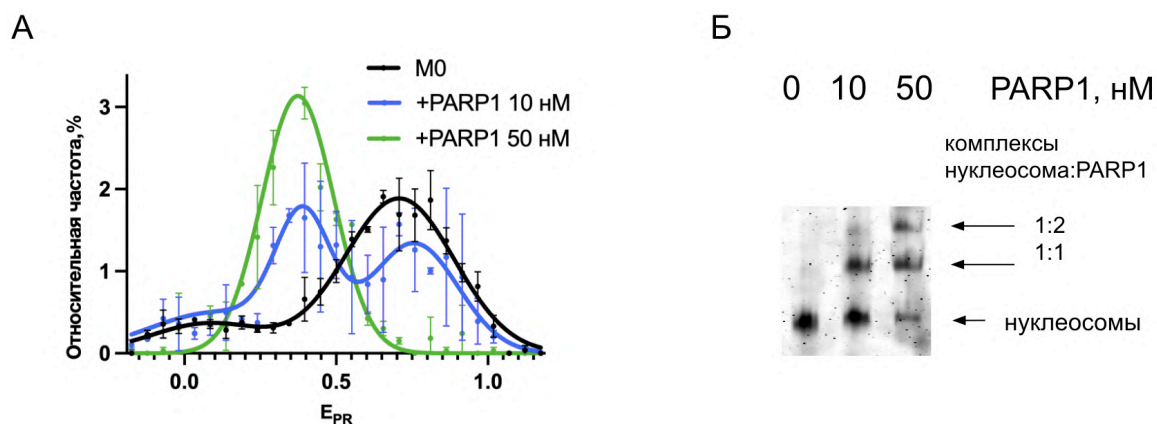


Рисунок 34 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом без линкерных участков

Источник: получено автором. Примечание: А – частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Б – электрофореграмма (4%-ный нативный ПААГ) комплексов нуклеосома–PARP1, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30).

3.1.3 Обратимая реорганизация хроматина PARP1: роль авто-поли(АДФ-рибозил)ирования

Ферментативная активность PARP1 возникает при распознавании белком в ответ на различные повреждения ДНК. В качестве субстрата PARP1 использует никотинамиддинуклеотид (НАД⁺), выстраивая полимерные цепи АДФ-рибозы, модифицируя многие белки-мишени, включая сам PARP1 (автомодификация). Этот процесс поли(АДФ-рибозил)ирование мобилизует факторы репарации, рекрутируя их к местам повреждения (Langelier M.-F. et al., 2012). При этом, АДФ-рибозилированный PARP1 диссоциирует от места связывания с ДНК.

Как было показано ранее, при добавлении 40 нМ PARP1 к нуклеосомам, содержащим рекомбинантный гистоновый октамер, происходит образование комплексов, сопровождаемое конформационными изменениями в нуклеосоме (Рис. 35 А). При последующем добавлении НАД⁺ в концентрации 100 мкМ происходит образование полимеров АДФ-рибозы (Рис. 35 В) на PARP1. Поли-АДФ-рибозные цепи могут быть разной длины (от нескольких до сотен остатков) и степени разветвления, поэтому молекулы PARP1 приобретают гетерогенный набор молекулярных масс. В результате на вестерн-блоттинге это визуализируется не в виде одной узкой полосы, а в виде «смазанного» (размытого) сигнала — так называемого «шмира», который отражает

распределение молекул с разной степенью модификации. Автомоdifикация PARP1 сопровождается диссоциацией PARP1 и возвращением нуклеосом в исходное состояние (Рис. 35 Б). spFRET анализ также демонстрирует диссоциацию PARP1 от нуклеосомы как возвращение частиц в состояние, профиль которого в значительной степени совпадает с профилем интактных нуклеосом (Рис. 35 А).

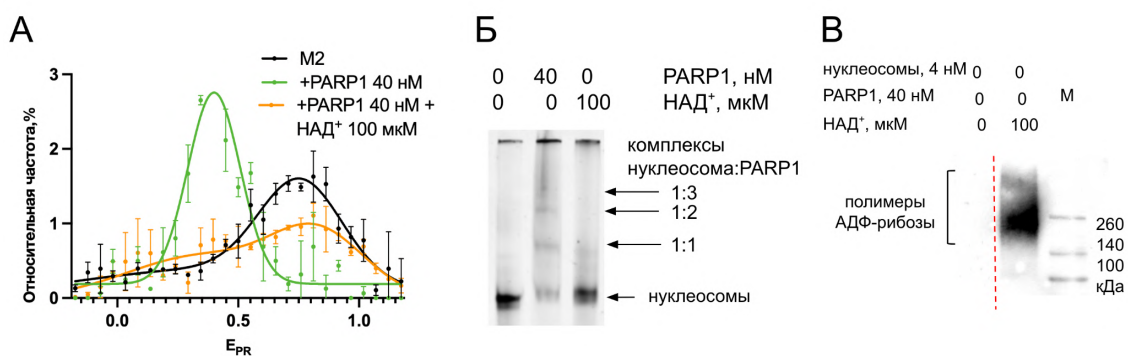


Рисунок 35 – Обратимая PARP1-зависимая реорганизация нуклеосом под действием НАД⁺

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET для нуклеосом, содержащих метки в положении +35/+112. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) интактных нуклеосом, комплекса нуклеосома–PARP1, обработанного НАД⁺, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30), В – Вестерн-блот с антителами к поли(АДФ-рибозе).

Полученные данные (раздел 3.1) позволяют заключить, что PARP1 является универсальным регулятором структуры хроматина: он модифицирует нуклеосомы вне зависимости от последовательности ДНК, наличия линкерных участков, и в отсутствие посттрансляционных модификаций гистонов. Обратимость достигается за счет отрицательной обратной связи, опосредованной НАД⁺-зависимой автомоdifикацией PARP1.

3.2 Взаимодействие PARP1 с нуклеосомами в различных структурных состояниях хроматина

Для исследований взаимодействия PARP1 с нуклеосомами в разных структурных контекстах хроматина, два функционально различных состояния было сконструировано *in vitro*: конденсированное, «закрытое» состояние, имитируемое добавлением линкерного гистона H1.0, который способствует компактизации хроматина (Clausell J. и др., 2009; Xiao B. и др., 2012); и деконденсированное, «открытое» состояние, характерное для промоторов и активных генов, которое моделировали путем включения в нуклеосому вариантного гистона H2A.Z (Cole L. и др., 2021).

3.2.1 Взаимодействие PARP1 с H1.0-содержащими хроматосомами

Учитывая реорганизирующее влияние PARP1 на структуру нуклеосом, возникает вопрос, будет ли наблюдаться похожий эффект на более высоком уровне организации хроматина – хроматосомах. Известно, что наличие линкерного гистона H1 типа является характерным и необходимым структурным компонентом для формирования и поддержания конденсированного, транскрипционно менее активного состояния хроматина (Hergeth S.P., Schneider R., 2015; Akbari E., Burge N.L., Poirier M.G., 2025). В присутствии H1.0 хроматин становится более плотно организован и менее доступен ряду факторов (Fyodorov D.V. и др., 2018). Ряд пионерных факторов могут не просто взаимодействовать с хроматосомами, но и удалять линкерный гистон, открывая доступ хроматину (Barral A., Zaret K.S., 2024). Так, FoxA конкурирует за связывание с H1.0 и вытесняет его из хроматосомы (Barral A., Zaret K.S., 2024; Iwafuchi-Doi M. и др., 2016).

В экспериментах по изучению регуляторной функции PARP1 по отношению к H1.0 хроматосомам использовали нуклеосомные конструкции с флуорофорами, введенными в линкерную область ДНК на фиксированном удалении от границы нуклеосомы: на расстоянии 18 нуклеотидов для нуклеосом с линкерами длиной 20 пар оснований и на расстоянии 25 нуклеотидов для нуклеосом с линкерами длиной 40 пар оснований. Профиль интактных нуклеосом меченных в линкерной области представляет собой две субпопуляции: основная расположена в области низкой эффективности $E_{PR} \sim 0$, минорная – в области $E_{PR} \sim 0,4$ (Рис. 36 А, Б). При добавлении H1.0 наблюдается сближение меток до единого состояния со значением $E_{PR} = 0,4$, что можно интерпретировать как сближение линкерных участков. При добавлении 40 нМ PARP1 также происходит сближение линкерных регионов с образованием единого состояния

нуклеосом, однако в значении $E_{PR}=0,2$, что свидетельствует об иной степени компактизации по сравнению с комплексом с H1.0. Таким образом, формирование комплексов нуклеосома–H1.0 и нуклеосома–PARP1 можно дифференцировать по различным сдвигам пиков E_{PR} . Такой паттерн характерен как для нуклеосом, содержащих линкерные регионы длиной как 20 пар оснований, так и 40 пар оснований.

Добавление PARP1 к H1.0-содержащей хроматосоме с длиной линкеров 20 пар оснований приводит к вытеснению линкерного гистона (Рис. 36 А), что визуализируется как изменение значения E_{PR} от показателя $\sim 0,1$, характерного для хроматосом, до $\sim 0,43$, характерного для комплекса нуклеосома-PARP1. То, что профиль FRET становится идентичным профилю комплекса нуклеосома–PARP1 свидетельствует о вытеснении линкерного гистона H1.0 белком PARP1. Таким образом, результаты демонстрируют, что PARP1 обладает свойствами пионерного фактора, способного связываться с компактизованным хроматином и модулировать его структуру, потенциально облегчая взаимодействие с ним других регуляторных белков.

Однако, при использовании нуклеосом, содержащих удлиненные линкерные регионы (40 пар оснований), обнаруживается, что в таких условиях PARP1 не способен вытеснить линкерный гистон (Рис. 36 Б). Более того, даже повышение концентрации PARP1 до 200 нМ не приводит к вытеснению H1.0. Вероятно, это связано с более эффективным связыванием H1.0 с более длинным линкерным участком ДНК через неструктурированный С-терминальный домен гистона (Burge N.L. et al., 2022).

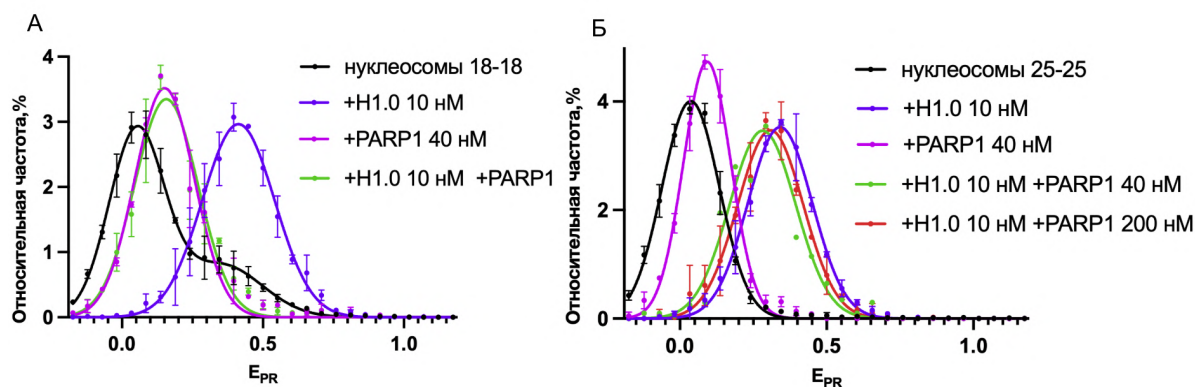


Рисунок 36 – PARP1 связывается с Н1 и может конкурировать с гистоном Н1 за связывание с нуклеосомой

Источник: из авторского исследования (Koshkina D. и др., 2025). Примечание: А – Анализ комплексов Н1.0 с нуклеосомами 18-18 с помощью spFRET-микроскопии и конкуренция между Н1.0 и PARP1 за связывание с нуклеосомами. Б – Анализ комплексов Н1.0 с нуклеосомами 25-25 с помощью spFRET-микроскопии и конкуренция между Н1.0 и PARP1 за связывание с нуклеосомами.

Полученные данные раскрывают структурный принцип регуляции пионерной функции PARP1 в контексте доменной организации хроматина. Показано, что конкуренция PARP1 с линкерным гистоном Н1.0, протекающая независимо от каталитической активности белка, зависит от длины линкерной ДНК. Этот параметр выступает в роли молекулярного переключателя, определяющего, в каких хроматиновых зонах PARP1 может реорганизовать нуклеосому. В участках с короткими линкерами (например, в компактном гетерохроматине) PARP1 способен вытеснить Н1.0 и открывать структуру. В зонах с длинными линкерами доступ PARP1 к нуклеосоме остается заблокированным Н1.0 и для вытеснения линкерного гистона нуждается в поли(АДФ-рибозил)ировании самого Н1.

3.2.2 Взаимодействие PARP1 с H2A.Z-содержащими нуклеосомами

Включение вариантного гистона H2A.Z в состав октамера, в свою очередь, использовалось для моделирования деконденсированного, транскрипционно активного состояния хроматина, поскольку гистон H2A.Z является эволюционно консервативным вариантом канонического гистона H2A (Zlatanova J., Thakar A., 2008; Burge N.L. et al., 2022) и ассоциирован с регуляторными элементами генома, а именно промоторами (Raisner R.M. и др., 2005; Brunelle M. и др., 2015), энхансерами [31]), и с участками начала

(Long H. et al., 2020) репликации и репарации ДНК (Raisner R.M. и др., 2005; Xu Y. и др., 2012; Long H. et al., 2020). Кроме того, H2A.Z-содержащие нуклеосомы характеризуются повышенной подвижностью нуклеосомной ДНК и сниженным энергетическим барьером для её отворачивания, что в свою очередь приводит к увеличению доступности нуклеосомной ДНК (Lewis T.S. и др., 2021).

В данной серии экспериментов были подготовлены нуклеосомы, содержащие рекомбинантные гистоны человека, включая H2A.Z, и пару флуоресцентных меток, расположенных в медиальной области (M2 +35/+112). На рисунке 37 А представлены профили распределения таких нуклеосом: черным представлены интактные нуклеосомы, зеленым - в комплексе с PARP1, красным - с добавлением НАД⁺ к комплексу PARP1/нуклеосома в концентрации 100 мкМ. При концентрации PARP1 40 нМ нуклеосомы с вариантом гистона H2A.Z переходят в единое конформационное состояние с низким значением E_{PR} (~0.25), что указывает на значительную структурную перестройку при связывании PARP1. Данное значение существенно ниже, чем у нуклеосом с каноническим октамером (~0.4), что свидетельствует о более выраженных изменениях в H2AZ нуклеосомах. Добавление 100 мкМ НАД⁺ в значительной степени восстанавливает исходную структуру. Корреляция с данными EMSA анализа подтверждает, что нуклеосомы, содержащие H2A.Z, образуют комплексы с PARP1 более эффективно по сравнению с каноническими (рис. 37 Б). В целом, это указывает на роль PARP1 в распознавании и поддержании дестабилизированных регуляторных доменов хроматина, облегчая при этом доступ других факторов транскрипции ДНК.

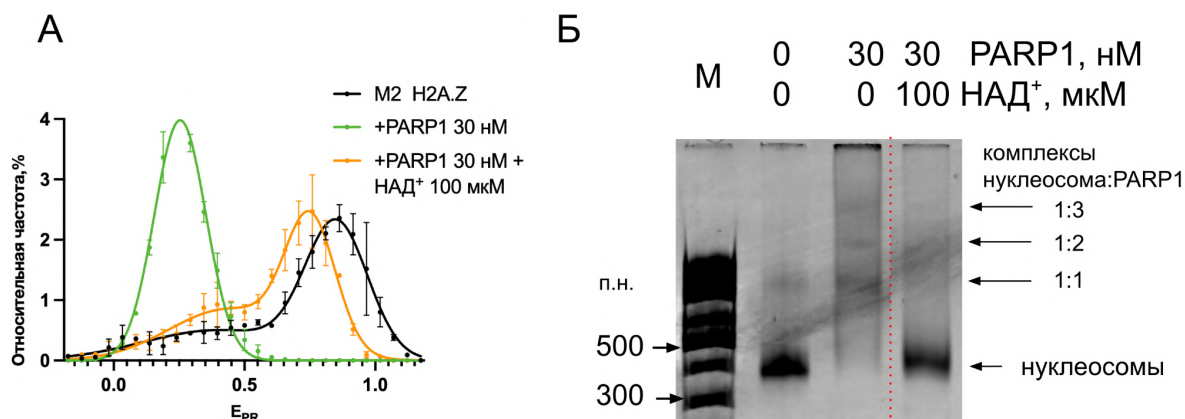


Рисунок 37 – Влияние PARP1 на структуру H2A.Z-содержащих нуклеосом

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом, содержащих метки в положении M2 +35/+112, по эффективности FRET в присутствии PARP1 и НАД⁺. Б – 4 % нативный ПААГ комплексов нуклеосома PARP1 в отсутствии и присутствии НАД⁺, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Важным результатом является обнаружение повышенной чувствительности H2A.Z-нуклеосом к действию PARP1. Показано, что PARP1 демонстрирует более высокое сродство и вызывает выраженные конформационные перестройки в таких нуклеосомах. Эти данные не только подтверждают роль H2A.Z в дестабилизации регуляторных доменов, но и указывают на возможность их синергического взаимодействия: PARP1 может выступать пионерным фактором, который «подготавливает» обогащенные H2A.Z промоторы для эффективного рекрутирования и стабилизации других белков, например, p53.

3.3 Изучение характера взаимодействия PARP1 и регуляторных белков p53 и dCas с нуклеосомами.

Обнаруженная нами роль PARP1 в перестройке хроматина формирует базу для последующего анализа значимости этого процесса в рамках клеточного метаболизма, а также для определения возможности его применения в биоинженерных подходах. В качестве модельных сценариев для верификации пионероподобной активности PARP1 были выбраны эндогенный фактор транскрипции p53 и система CRISPR/dCas9, используемая как эпигенетический редактор (Horlbeck M.A. и др.; Sahu G. и др., 2010).

Выбор p53 обусловлен его ключевой ролью в клеточном ответе на стресс и необходимостью преодоления нуклеосомного барьера для активации генов-мишеней, что делает его идеальной моделью для изучения физиологической релевантности PARP1-зависимой реорганизации хроматина. Использование же системы CRISPR/dCas9, лишенной ферментативной активности, позволяет в минимальной, искусственной системе оценить, является ли роль PARP1 в обеспечении доступности ДНК универсальной и необходимой для связывания любых факторов, включая синтетические конструкции. Совокупность этих двух подходов – физиологического и синтетического – позволяет комплексно охарактеризовать роль PARP1 как потенциального пионерного фактора и оценить перспективы использования этого механизма в биоинженерных целях.

3.3.1 Влияние p53 на структуру нуклеосом в различных структурных состояниях

Белок p53 в основном связывается с сайтами связывания, представляющими собой промоторы генов, задействованных в остановке клеточного цикла и апоптозе (Chen J., 2016), в том числе, находящимися в области нуклеосомной ДНК. Для серии экспериментов, направленных на исследование взаимодействия p53 с нуклеосомами, были подготовлены нуклеосомы, содержащие такой сайт связывания, присутствующий на промоторе гена p21(CDKN1A), кодирующего ингибитор циклин-зависимой киназы 1A, которая играет ключевую роль в ответе на клеточный стресс и повреждения ДНК (Cazzalini O. и др., 2010). Чтобы минимизировать влияние регуляторных доменов и сконцентрироваться на анализе взаимодействия белка p53 с нуклеосомной ДНК, в работе использовали ДНК-связывающий домен p53 (p53DBD), а не полноразмерный белок.

Предварительные эксперименты на свободной ДНК с НПП, используемой для оценки влияния p53 на структуру нуклеосом, показали, что p53DBD формирует специфичный комплекс, сохраняющийся в присутствии неспецифического конкурента poly(dI:dC), что подтверждает корректность выбранной последовательности и условий проведения связывания (Рис. 38).

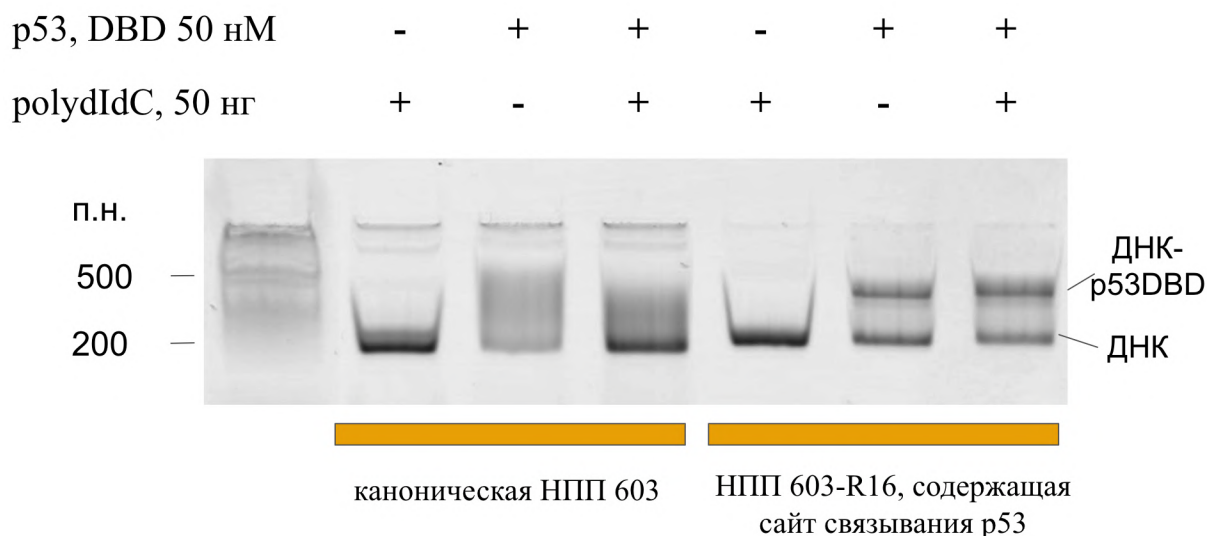


Рисунок 38 – Наличие участка специфического связывания p53 в НПП приводит к увеличению доли специфического комплекса p53DBD-ДНК по сравнению с НПП без сайта связывания

Источник: получено автором. Примечание: Показаны электрофоретические профили канонической НПП 603 и НПП 603-R16, содержащей сайт связывания p53: при добавлении p53DBD (50 нМ) в отсутствие и присутствии poly(dI:dC), изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Ранее в исследованиях было показано, что p53 способен отгибать нуклеосомную ДНК (Nishimura M. и др., 2022) при расположении сайта связывания в линкерной области. В связи с этим важно выяснить, какие изменения в динамике ДНК возникают при перемещении сайта связывания в менее доступную область нуклеосомы. Для этого сконструировали НПП, содержащую сайт связывания p53 в области входа/выхода коровой области нуклеосомы таким образом, чтобы центр мотива взаимодействовал с гистоновым октамером, тем самым стерически затрудняя взаимодействия с p53 (Sahu G. и др., 2010). В связи с ожидаемой динамикой в линкерной области нуклеосомы, метки были расположены на расстоянии 10 пн от границы нуклеосомной ДНК (R16 10-10) в линкерной области. Для повышения специфичности связывания p53DBD был использован конкурент poly(dI:dC) (Thermo Fisher scientific) (Larouche K. et al., 1996), синтетический двухцепочечный чередующийся сополимер дезоксиинозина и дезоксицитидина (по данным сайта производителя длина в среднем 1200-3000 пар оснований), широко применяемый как модель неспецифической двухцепочечной ДНК.

Сайт связывания, локализованный в коровой части нуклеосомы, оказывается стерически экранирован, что осложняет взаимодействие p53DBD с нуклеосомой (Sahu G. и др., 2010). Тем не менее, p53DBD способен связываться с нуклеосомой, содержащей специфический сайт связывания в коровой области, тогда как нуклеосомы, не содержащие такого сайта (полученные с использованием канонической 603 Widom НПП) не взаимодействуют с p53DBD (Рис. 39).

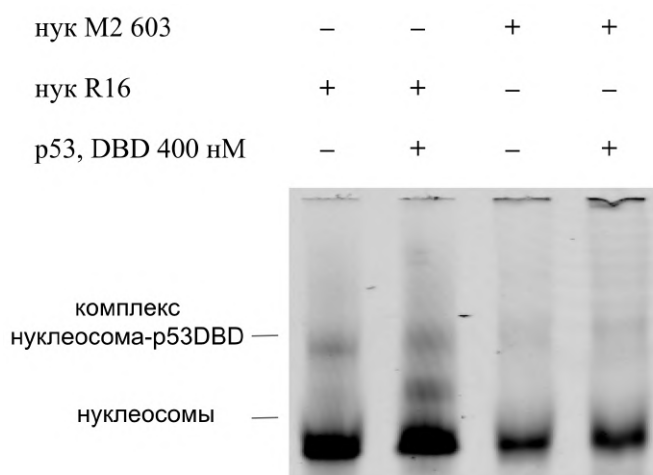


Рисунок 39 – Влияние наличия сайта связывания на формирование комплекса нуклеосома-p53DBD

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом, полученных с использованием канонической НПП 603 и 603-R16 в комплексе с p53DBD, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30).

При проведении исследований методом spFRET профиль интактных нуклеосом, содержащих метки в линкерной области представлен двумя субпопуляциями: основная располагается в области низких значений E_{PR} (~ 0), минорная – в области средних значений E_{PR} ($\sim 0,5$). При добавлении 600-800 нМ p53DBD происходит частичный переход профиля интактных нуклеосом в область более низких значений E_{PR} (~ 0), соответствующую расхождению флуорофоров (Рис. 40 А). При повышении концентрации p53 до 1200 нМ возникает полный переход нуклеосом в дестабилизированное состояние, при котором линкерные участки отдалены друг от друга. Методом EMSA анализа показано, что при концентрации p53DBD 800 нМ регистрируется образование комплексов, а при 1200 нМ происходит полный переход нуклеосом в связанное с p53DBD однородное состояние (Рис. 40 Б).

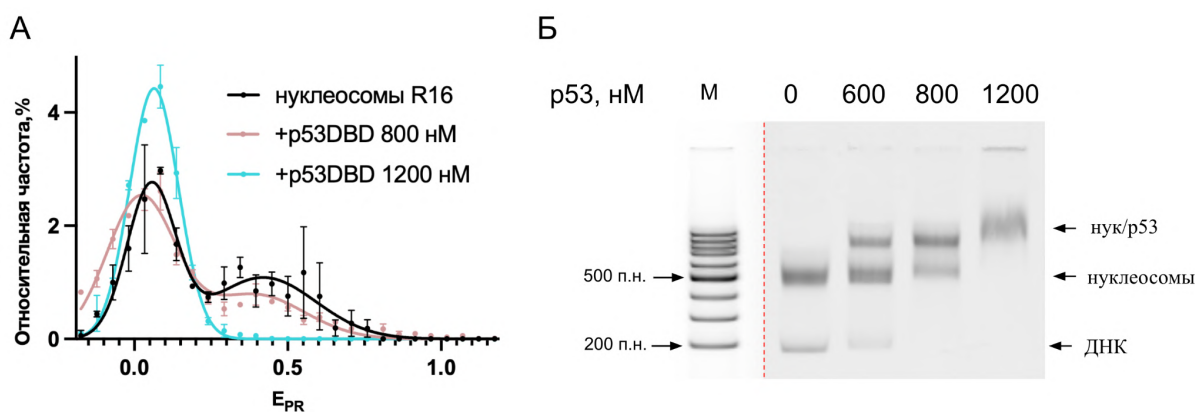


Рисунок 40 – p53 вызывает расхождение участков линкерной ДНК нуклеосомы

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии p53DBD. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-p53DBD, изображение получено на установке Amersham Turphoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy2 (возбуждение 488 нм, эмиссионный фильтр 525BP20).

В целом, полученные данные, вместе с литературными сведениями, указывают на то, что для индукции перестроек в нуклеосоме под действием p53 необходима его повышенная концентрация. Подобный концентрационно-зависимый характер взаимодействий согласуется с данными, которые свидетельствуют о различном типе ответа клетки (апоптоз/остановка клеточного цикла) в зависимости от уровня экспрессии p53 в клетке (Kracikova M. et al., 2013). Более того, необходимость столь высокой концентрации p53DBD для формирования устойчивого однородного комплекса, может быть связано со стерическими ограничениями: в представленной модели (НПП 603-R16) имитируется сайт связывания, характеризующийся как проапоптотический, активация которого должна происходить преимущественно при критических повреждениях ДНК. Стоит подчеркнуть, что такое расположение сайта, несмотря на низкую доступность, остается потенциально доступным для взаимодействия с p53, однако требует более высоких концентраций белка для эффективного связывания.

Поскольку нуклеосомы в клетке находятся в динамическом равновесии между более компактным и деконденсированным состояниями, следующий этап работы был направлен на выяснение, сохраняет ли p53 реорганизирующую активность в условиях повышенной компактизации. Способность p53 связываться с конденсированным хроматином была продемонстрирована в экспериментах с H1.0-содержащими

нуклеосомами. Было показано, что при добавлении высоких концентраций p53DBD (1200 нМ) формируется тройной комплекс нуклеосома-N1.0-p53DBD (Рис. 41 Б). При этом p53 вызывает в линкерной ДНК характерные конформационные изменения (Рис. 41 А), наблюдаемые при его связывании с нуклеосомами без N1.0, что указывает на сохранение его реорганизующей, пионерной активности даже в условиях повышенной компактизации.

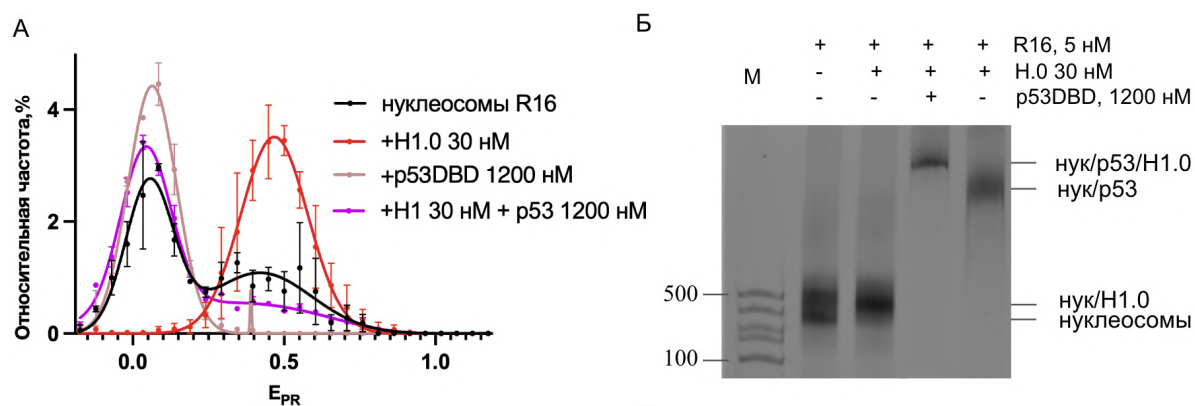


Рисунок 41 – p53 вызывает конформационную перестройку хроматосом

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии N1.0 и p53DBD. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-p53 и нуклеосома-p53DBD/N1.0, изображения получены на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Напротив, менее компактизированный хроматин, ассоциированный с активной транскрипцией, репликацией и репарацией ДНК, как правило, обогащен вариантными гистонами (Martire S., Banaszynski L.A., 2020) и активирующими эпигенетическими метками (Bannister A.J., Kouzarides T., 2011). Кроме того, в литературе показано, что p53 активно взаимодействует с участками генома, обогащенными H2A.Z, которые часто располагаются в областях промоторов целевых генов p53 (Dong F. и др., 2016). Поэтому в данной работе активный хроматин представлен нуклеосомами, содержащим гистон H2A.Z (Giaimo B.D. и др., 2019) в составе гистонного октамера, который заменял канонический H2A.

В исследовании показано, что нуклеосомы, содержащие вариантный гистон H2A.Z, обладают повышенной чувствительностью к p53DBD. Для перехода половины нуклеосом в стабильный комплекс достаточно 400 нМ p53, тогда как нуклеосомам с каноническими гистонами для достижения того же уровня требуется 800 нМ (Рис. 42 Б).

При этом по данным spFRET в H2A.Z-содержащих нуклеосомах p53DBD вызывал полномасштабную реорганизацию линкерной области ДНК (Рис. 42 А).

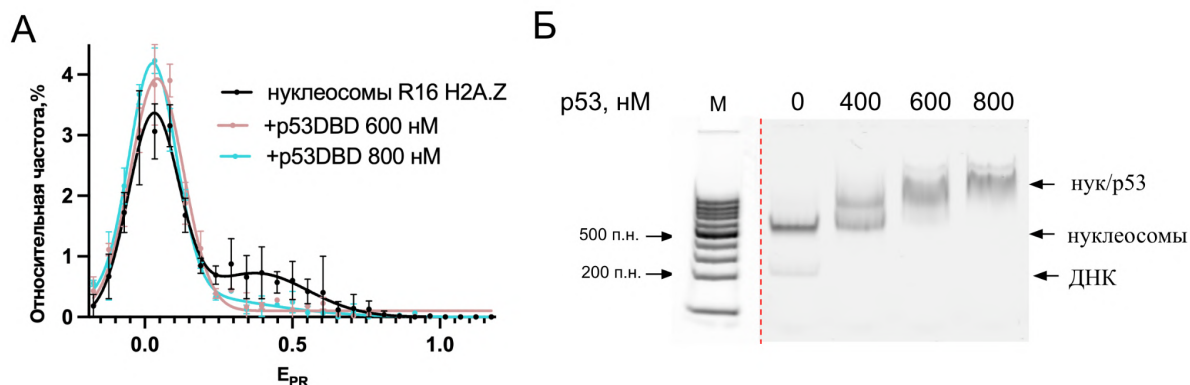


Рисунок 42 – p53DBD реорганизует линкерную область H2A.Z-содержащих нуклеосом при пониженных концентрациях

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения H2A.Z-содержащих нуклеосом по эффективности FRET в присутствии p53DBD. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов H2A.Z-содержащих нуклеосом-p53DBD, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy2 (возбуждение 488 нм, эмиссионный фильтр 525BP20).

Полученные данные позволяют заключить, что p53DBD имеет свойства, характерные для пионерного фактора, однако полная реорганизация хроматина на нуклеосомном уровне возможна лишь при относительно высоких концентрациях белка. Замена канонического варианта гистона на H2A.Z приводит к повышению эффективности образования комплекса нуклеосома-p53: полный переход нуклеосом в комплекс наблюдается при 800 нМ p53, тогда как для нуклеосом, содержащих канонический гистон H2A это значение 1200 нМ.

3.3.2 Совместное влияние p53 и PARP1 на нуклеосомы

В работе показано, что PARP1 и p53 по отдельности проявляют пионерные свойства, в разной степени реорганизуя нуклеосому. Известно, что ряд факторов действуют кооперативно при взаимодействии с труднодоступными участками хроматина. Из литературы известно, что SOX2 и OCT4 взаимно усиливают друг при связывании с хроматином, а PARP1 способствует облегчению присоединения SOX2 к нуклеосоме (Liu Z., Kraus W.L., 2017). Также показано, что PARP1 и p53 в клетке многокомпонентно

взаимодействуют: PARP1 способен связываться как непосредственно с p53, так и поли(АДФ-рибозил)ировать белок (Fischbach A. et al., 2018). Кроме того, PARP1 модифицирует эффективность p53-зависимого ответа на повреждение ДНК (S W. et al., 2003; Valenzuela M.T. и др., 2002). Вместе с тем остается невыясненным, проявляют ли PARP1 и p53 кооперативность при реорганизации нуклеосомы и как их взаимодействие сказывается на структуре хроматина.

В разделе 3.1.2 продемонстрировано, что PARP1 реорганизует нуклеосомы независимо от последовательности ДНК. Чтобы убедиться, что этот вывод справедлив и для нуклеосомы, содержащей сайт связывания p53 (той же, что использовалась в экспериментах с p53), был проведен дополнительный контрольный эксперимент с PARP1. Здесь были использованы нуклеосомы с каноническим гистоновым октамером и симметричными метками в линкерной области, находящихся на отдалении 18 нуклеотидов. Профиль данных нуклеосом (Рис. 43) несколько отличается от 603 R16 (10-10) профилем E_{PR} в следствие различия в положении меток относительно друг друга, однако, паттерн, характерный для нуклеосом, содержащих метки в линкерной области сохраняется: основная субпопуляция располагается в области $E_{PR} \sim 0$, а минорная в области $E_{PR} \sim 0,4$. Аналогичным оказывается и характер изменений в линкерной области: и для нуклеосом, полученных на 603 и для нуклеосом, полученных на R16-603, видно, что при добавлении PARP1 в концентрации 40 нМ возникает сближение линкерных регионов.

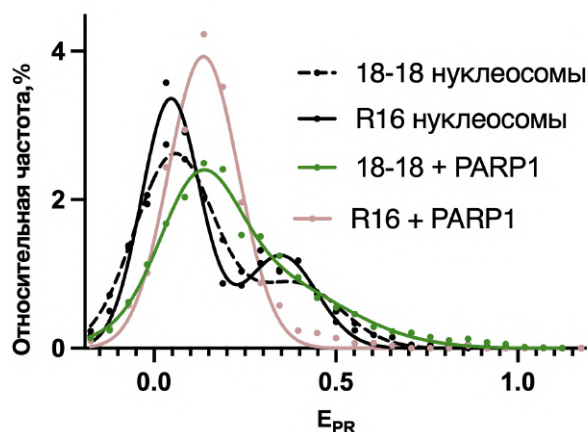


Рисунок 43 – PARP1 вызывает перестройки в линкерной области нуклеосом, полученных как для канонической 603 последовательности, так и 603-R16

Источник: получено автором. Примечание: Частотные распределения нуклеосом, полученных на последовательности 603 и 603-R16 в отсутствие и присутствии PARP1 40 нМ.

Для корректного анализа влияния PARP1 и p53DBD на структуру нуклеосом необходимо минимизировать неспецифические взаимодействия этих белков с нуклеосомной ДНК, поэтому был проведён подбор соответствующих конкурентных агентов.

Использование конкурентор poly(dI:dC) (Larouche K. et al., 1996), позволило повысить специфичность связывания p53DBD – в отличие от неспецифических высокомолекулярных комплексов, формирующихся в его отсутствие, при добавлении конкурента наблюдались единичные комплексы (Рис. 44). Методом spFRET (Рис. 44) показано, что в отсутствие конкурентор формируются преимущественно неспецифические высокомолекулярные комплексы, что отражается как широкий профиль, смещённый в область низкого E_{PR} . При добавлении ранее используемого конкурентор poly(dI:dC) и p53DBD (1200 нМ) наблюдается расхождение флуорофоров, расположенных в линкерной области. Однако, в связи с тем, что PARP1 имеет высокую аффинность к двухцепочечной ДНК (Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A., 2017), добавление poly(dI:dC) к PARP1 и нуклеосомам вызывает агрегацию (Рис. 44 Б), что делает использование poly(dI:dC) невозможным для изучения одновременного действия этих белков на нуклеосомы.

При выборе в качестве конкуренторного агента иной природы poly(I:C), который выступает в роли синтетического аналога двухцепочечной РНК, (синтетический полимер двух кислот: полиинозиновой (poly(I)) и полицитидиловой (poly(C))) удаётся повысить специфичность комплексов p53DBD с нуклеосомой (Рис. 44 А). При этом poly(I:C) не нарушает характер связывания PARP1 с нуклеосомой, что делает этот конкурентор подходящим для изучения совместного влияния PARP1 и p53DBD на структуру нуклеосом (Рис. 44 Б).

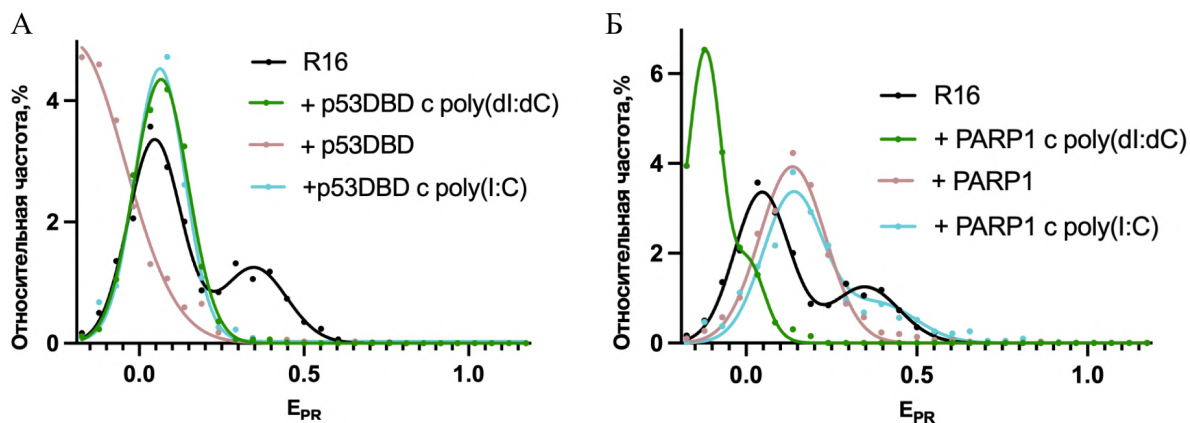


Рисунок 44 – Взаимодействие p53 и PARP1 с нуклеосомами в присутствии конкурентов разной природы

Источник: получено автором. Примечание: Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET для интактных нуклеосом и нуклеосом, связанных с p53DBD (А) или PARP1 (Б) в присутствии poly(dI:dC), poly(I:C) и в отсутствие конкурентов.

Одновременное взаимодействие p53 (1200 нМ) и PARP1 (40 нМ) с нуклеосомами приводит к образованию отдельных комплексов с каждым из белков (Рис. 45 Б, В). На частотном распределении по эффективности FRET это отражается проявлением единственного широкого пика с максимумом, расположенным между значениями, характерными для отдельным комплексам с p53 и PARP1, что по-видимому отражает суперпозицию двух конформационных состояний, но не формирование устойчивого тройного комплекса (Рис. 45 А). Этот эффект также отражен на рисунке 45 В (bulk FRET): при раздельном добавлении PARP1 и p53DBD к нуклеосомам, комплексы имеют различные цветовые характеристики (оранжевый для комплексов нуклеосома-PARP1, зеленый для комплексов нуклеосома-p53DBD), которые сохраняются при совместном нанесении, что указывает на отсутствие принципиально нового типа комплекса. Однако, регистрируемые сигналы полос комплексов становятся более размытыми (наиболее выразительно показано на рисунке 45 Б), что свидетельствует об усилении динамики или гетерогенности состояний нуклеосом без проявления принципиально нового типа комплекса.

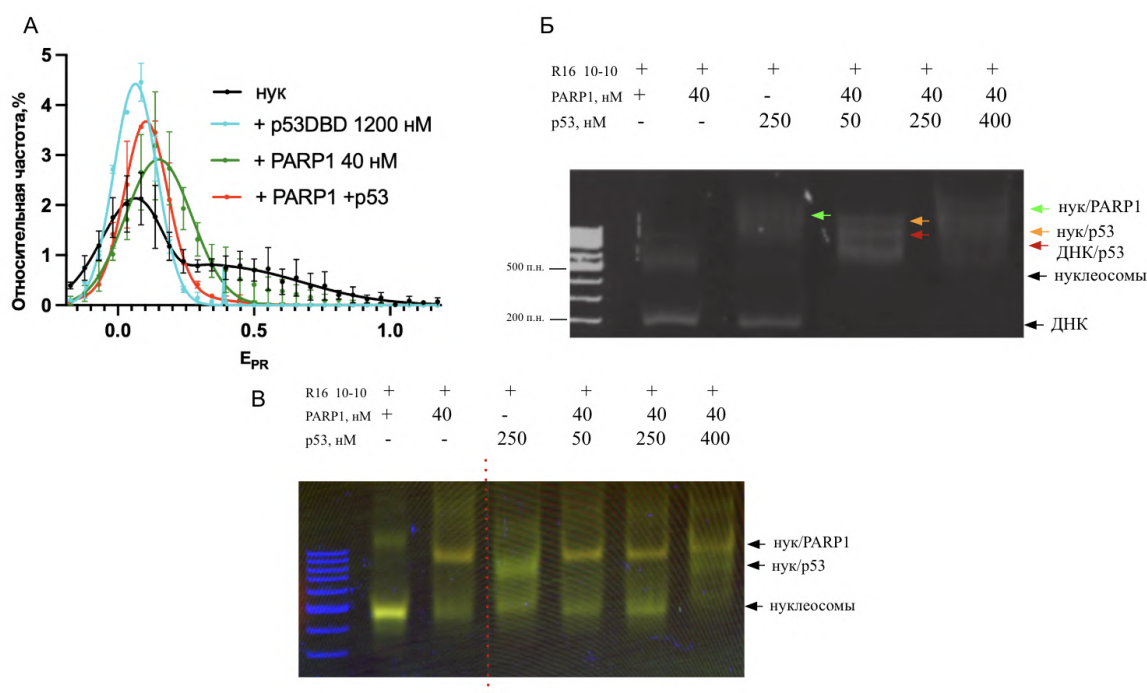


Рисунок 45 – Совместное влияние p53 и PARP1 на структуру нуклеосом

Источник: составлено автором на основе полученных данных и авторского исследования (Koshkina D.O. и др., 2025). Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии p53DBD и PARP1. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома/p53DBD/PARP1, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20). В – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-p53DBD-PARP1, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20), Cy2 (возбуждение 488 нм, эмиссионный фильтр 525BP20), FRET (возбуждение 488 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Ряд исследований показывает, что поли(АДФ-рибоза) и/или PARP1 взаимодействуют не только с С-концевым доменом p53, но и с участками в его ДНК-связывающем домене. В ДНК-связывающем домене описано два сайта поли(АДФ-рибозил)ирования, меняющие ДНК-связывающие свойства белка: аминокислоты 153-178 и 231-253 (Krüger A. и др., 2019; Malanga M., 1998; Fischbach A. et al., 2018). Исходя из этого, в данной работе была поставлена задача оценить, влияет ли ферментативная активности PARP1 на связывание p53DBD с нуклеосомой.

Добавление субстрата НАД⁺ к комплексу нуклеосома-PARP1 приводит к ожидаемому авто-поли(АДФ-рибозил)ированию и диссоциации PARP1 (Рис. 46 дорожка 5). В реакционном растворе, в котором присутствуют нуклеосомы, PARP1 и p53DBD, добавление НАД⁺ вызывает диссоциацию PARP1, тогда как p53DBD остается связанной с нуклеосомой (рис 46, дорожка 7). Под действием ферментативной активности PARP1 высокомолекулярные комплексы, исходно присутствовавшие в пробе с нуклеосомами и PARP1, полностью диссоциируют. В результате на геле наблюдаются преимущественно интактные нуклеосомы и лишь следовые количества агрегатов. Однако, на дорожке, содержащей смесь нуклеосом, PARP1, p53DBD и НАД⁺, наблюдается возникновение высокомолекулярных комплексов (агрегатов), не способных мигрировать в гель при одновременном снижении интенсивности полосы, соответствующей комплексу нуклеосома-p53DBD. Это позволяет предположить, что часть комплексов нуклеосома-p53DBD перераспределяется в состав агрегированных форм, возникающих после активации PARP1 и накопления поли(АДФ-рибозы).

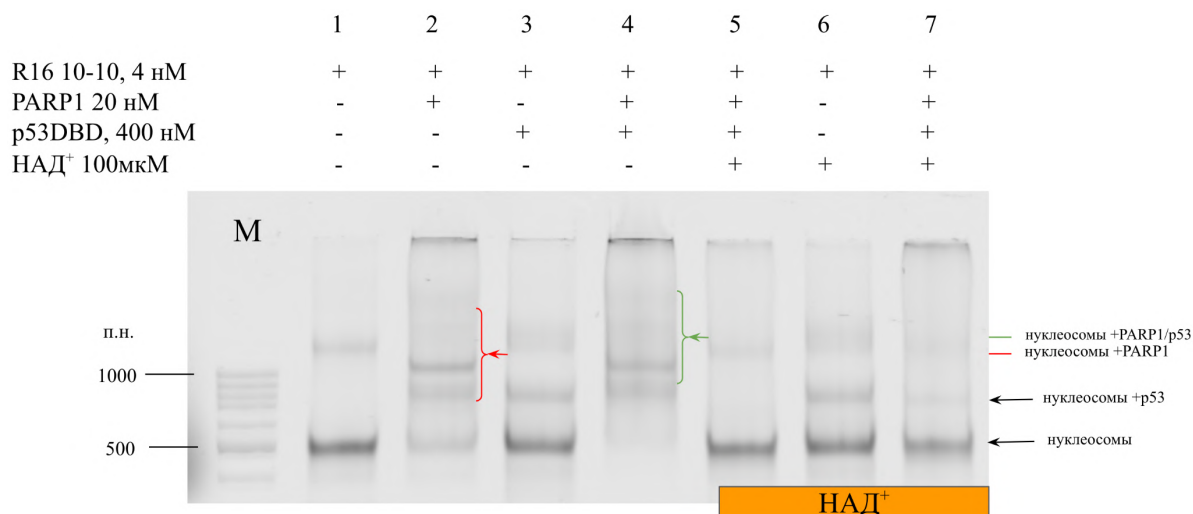


Рисунок 46 – PARP1 не вызывает диссоциацию p53DBD от нуклеосомы с каноническими гистонами

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом с белками PARP1 и p53DBD до и после обработки НАД⁺, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Данные вестерн-блоттинга с использованием антител к поли(АДФ-рибозе) показали, что в условиях эксперимента поли(АДФ-рибозил)ированию подвергается исключительно PARP1 (Рис. 47), тогда как модификации p53DBD не детектируется. Такой профиль модификации предполагает, что PARP1 и p53DBD образуют отдельные комплексы с нуклеосомой и активированный PARP1 не оказывается в достаточной пространственной близости к p53DBD для эффективного переноса поли(АДФ-рибозы). Даже если предположить, что p53DBD может частично ассоциировать с комплексом нуклеосома-PARP1-поли(АДФ-рибоза) с помощью электростатических взаимодействий с отрицательно заряженной поли(АДФ-рибозой), результаты EMSA показывают, что после добавления НАД⁺, значимая доля p53DBD остаётся в комплексе с нуклеосомами. Это указывает на то, что p53DBD преимущественно стабилизирует прямые контакты с нуклеосомной ДНК, а возможные дополнительные контакты с полимером АДФ-рибозы не сопровождается диссоциацией от нуклеосомы.

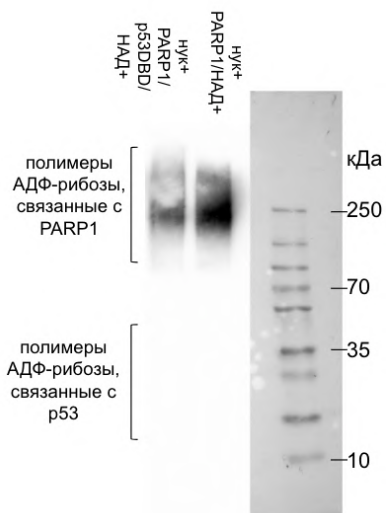


Рисунок 47 – PARP1 не модифицирует p53DBD в присутствии нуклеосомы с каноническими гистонами

Источник: получено автором. Примечание: Вестерн-блот с использованием антител к полимерам АДФ-рибозы.

Таким образом, можно заключить, что p53DBD и PARP1 взаимодействуют с нуклеосомами преимущественно независимо друг от друга, а поли(АДФ-рибозил)ирование затрагивает только PARP1 и не сопровождается вытеснением p53DBD с нуклеосомы.

Замена канонического гистона H2A на его вариантную форму H2A.Z изменяет характер комплексообразования p53 и PARP1 с нуклеосомой (Рис. 48). При их совместном взаимодействии с нуклеосомой возникает тройной комплекс нуклеосома-PARP1-p53DBD, который частично распадается при добавлении в реакционную смесь 100 мкМ НАД⁺ и последующей инкубации в течение 30 минут. Поли(АДФ-рибозил)ирование вызывает диссоциацию PARP1 от нуклеосомы, однако p53 остается связанным с нуклеосомной ДНК.

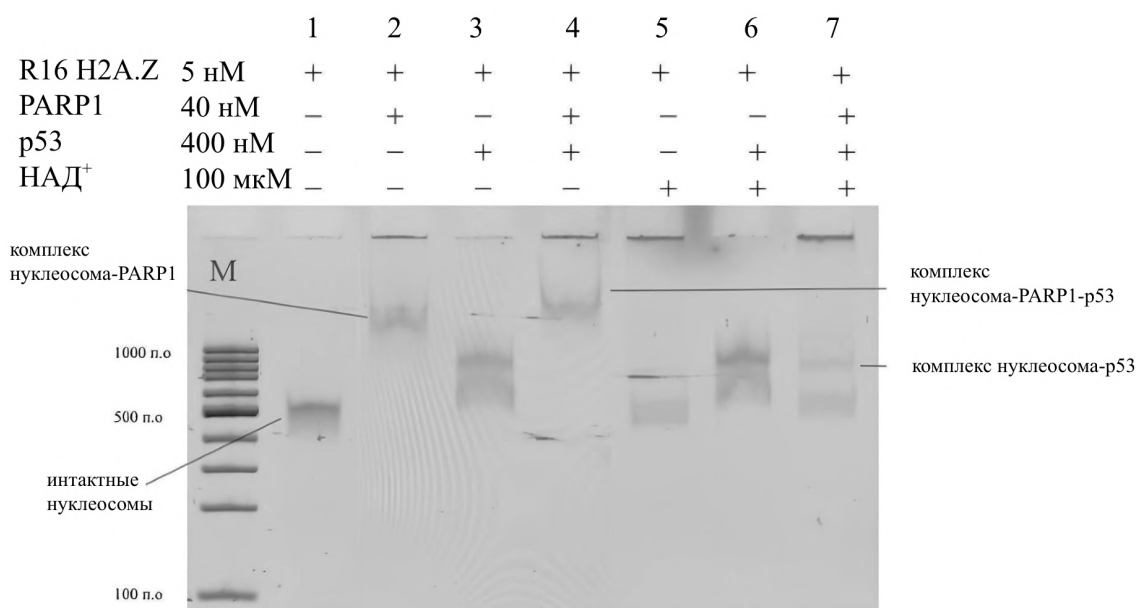


Рисунок 48 – p53 и PARP1 формируют мультимолекулярный комплекс с H2A.Z-содержащими нуклеосомами

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов H2A.Z-содержащих нуклеосом с белками PARP1 и p53DBD в присутствии и отсутствии НАД⁺, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Образование тройного комплекса H2A.Z-нуклеосомы с PARP1 и p53DBD свидетельствует о том, что вариант гистона H2A.Z создает конформацию нуклеосомы, благоприятствующую одновременному связыванию обоих белков. Это может указывать на кооперативный характер их рекрутирования и/или отсутствие конкуренции за сайты связывания, что является необходимым условием для последующей PARP1-зависимой регуляции p53 на хроматине.

3.3.3 Влияние PARP1-зависимой реорганизации нуклеосомы на эффективность комплексообразования с dCas

В качестве платформы для адресного воздействия на нуклеосомную ДНК использовали систему CRISPR/dCas9, представляющую собой каталитически инактивированный вариант нуклеазы Cas9, который с помощью направляющих РНК специфически связывается с заданными участками генома без внесения разрывов ДНК. В качестве мишени была выбрана область диады нуклеосомы 601 Widom, для чего

использовали sgRNA, комплементарную последовательности в коровой части нуклеосомы. Такая конфигурация моделирует задачу, когда целевой сайт расположен в зоне максимального контакта ДНК с гистоновым октамером и, согласно литературным данным, должен быть стерически недоступен для связывания Cas9/dCas9 (Horlbeck M.A. и др.). В соответствии с этим, при инкубации нуклеосом (по протоколу, описанному в разделе 2.9) с dCas9/sgRNA (400 нМ) направленным в область диады, образование комплекса нуклеосома-dCas9 не детектируется в условиях нативного геля (Рис. 49). Это согласуется с представлением о нуклеосоме, как о прямом физическом барьере для доступа CRISPR-эффекторов к ДНК.

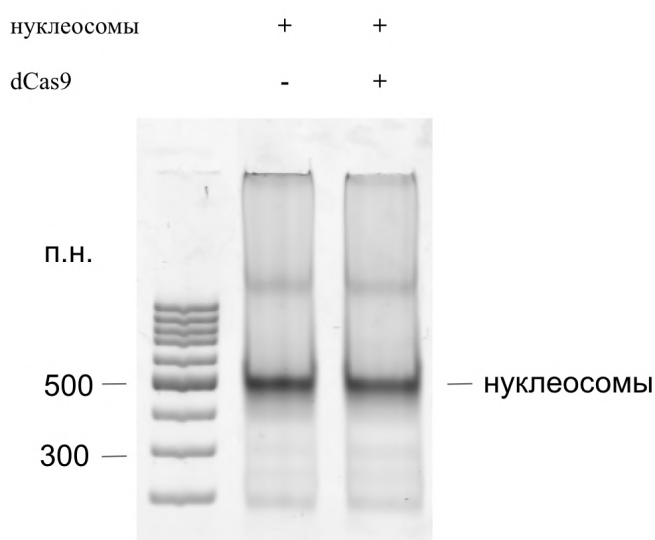


Рисунок 49 – dCas9 не способен связываться с нуклеосомой в присутствии sgRNA, направленной на диаду

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом с dCas9:sgRNA (400 нМ), направленный в области диады нуклеосомы, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Однако, при прединкубации нуклеосом с PARP1 и последующем добавлении dCas9 в концентрации 300 нМ происходит исчезновение полосы нуклеосома-PARP1, что можно интерпретировать как возникновение высокомолекулярного комплекса с белком dCas9. Это свидетельствует о том, что предварительное связывание нуклеосомы с PARP1 снимает стерический барьер и делает ранее скрытый участок ДНК доступным для эффективного связывания с dCas9 (Рис. 50).

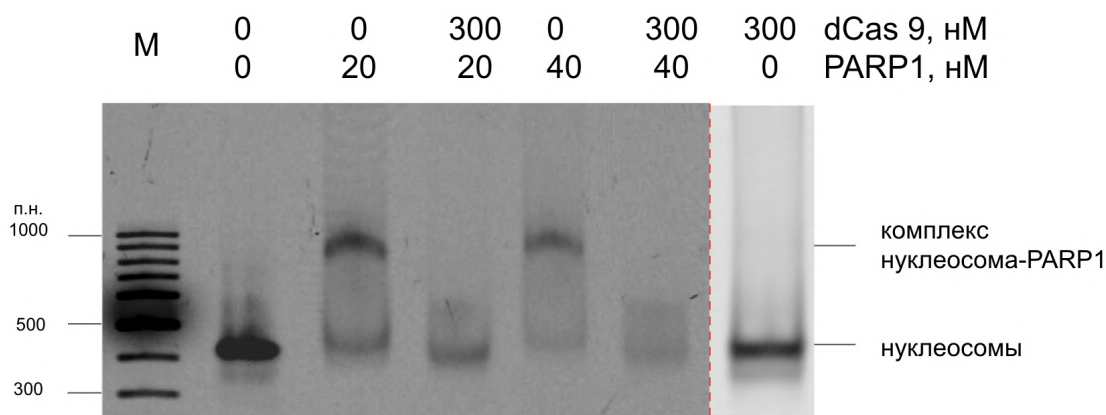


Рисунок 50 – Влияние PARP1 на связывание комплекса dCas9:sgRNA с нуклеосомой

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом с PARP1 (20 и 40 нМ) и/или dCas9:sgRNA (400 нМ), направленный в области диады, изображение получено на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Полученные данные подтверждают, что при рекрутировании PARP1 на нуклеосомы белок проявляет пионерные свойства, переводя нуклеосомы в более доступное для различных ДНК-связывающих факторов состояние. В совокупности полученные данные расширяют представление о роли PARP1 в организации хроматина: помимо участия в репарации (Zong C. et al.; Ко Н.Л., Ren E.C., 2012) и транскрипционной регуляции (Zong W. et al., 2022), он также способен выступать в качестве функционального аналога пионерного фактора, способного реорганизовывать нуклеосому по всей длине ДНК и подготавливать её к работе других регуляторов хроматина. Это позволяет рассматривать PARP1 как перспективный функциональный модуль для основанных на dCas платформ генного и эпигенетического редактирования. PARP1 в данной конструкции позволяет нацеливать платформы на более конденсированные участки хроматина. Это открывает перспективу для его практического применения в прикладных задачах биоинженерии в качестве пионерного фактора для систем, основанных на dCas белках и разработанных для генетической и эпигенетической регуляции генома (Gilbert L.A. и др., 2014; Hilton I.B. и др., 2015; Nuñez J.K. и др., 2021; Tadić V. и др., 2019). Уже существующие системы, такие как dCas9-p300m (Hilton I.B. и др., 2015) dCas9-DNMT3A и dCas9-KRAB (Xie N. и др., 2018)

эффективно используются для активации или подавления транскрипции за счёт локальных эпигенетических модификаций в промоторных и энхансерных областях. Эти конструкции реализуют ацетилирование гистонов, внесение ДНК-метиляции или рекрутирования репрессорных комплексов, что приводит к изменению транскрипционной активности целевых генов. Однако, такие платформы обычно используются в участках хроматина, где целевые участки уже доступны для связывания с dCas9 (Horlbeck M.A. и др.), что ограничивает их эффективность в областях, с высокой нуклеосомной плотностью (Verkuijl S.A., Rots M.G., 2019). Включение PARP1 в модульные платформы на основе dCas может обеспечивать целенаправленное изменение эпигенетического состояния ранее инертных участков хроматина за счёт последовательного сочетания функционала раскрытия нуклеосомы и рекрутирования выбранных эпигенетических эффекторов в составе единого dCas9-конструкта. Это делает PARP1 перспективным потенциальным кандидатом для будущих терапевтических и биотехнологических приложений.

3.4 Молекулярные механизмы действия синтетических ингибиторов (олапариб, талазапариб и велипариб) на ДНК-связывающую и ферментативную активность PARP1

Для исследований были выбраны клинические одобренные ингибиторы PARP, относящихся к наиболее изученным и применяемым в практике - олапариб (Olaparib) (Tutt A.N.J. et al., 2021; Robson M. и др., 2017) и талазапариб (Talazoparib) (Litton J.K. и др., 2018), а также перспективный велипариб (Veliparib) (Hussain M., 2012; Kummur S., 2012; Diéras V. и др., 2020; Loibl S. и др., 2018), который на данный момент используется преимущественно в доклинических и ранних клинических испытаниях. Выбранные соединения отличаются по химической структуре и по способу влияния на каталитическую активность белков PARP, а также по способности вызывать эффект захвата ("траппинга"). Траппинг представляет собой механизм, при котором ингибитор, связываясь PARP1, предотвращает его высвобождения из комплекса с ДНК (Murai J. и др., 2012). В результате PARP1 остается "запертым" на хроматине, что приводит к образованию цитотоксических комплексов, блокирующих репликацию и транскрипцию. Способность к траппингу существенно различается среди клинических ингибиторов: талазапариб проявляет наибольшую активность, тогда как велипариб — наименьшую (Hopkins T.A. и др., 2019; Murai J. и др., 2012). Траппинг PARP1 в хроматине в клетках считается основным механизмом терапевтического действия PARPi. Однако вопрос о

том, как реализуется этот процесс на уровне нуклеосом — фундаментальных единиц хроматина — до сих пор открыт. Для решения этой задачи мы изучили траппинг охарактеризованных PARP1 *in vitro* с использованием модельных нуклеосомных мишеней.

При концентрациях Олапариба от 0.1 до 10 мкМ, PARP1 связывается с нуклеосомами, сохраняя характерную стехиометрию 1:3 (нуклеосома:PARP1) (Рис. 51 А, Б). В присутствии субстрата НАД⁺ ингибирующая активность олапариба наблюдается при 1 мкМ: начиная с этой концентрации PARP1 практически полностью теряет способность диссоциировать от нуклеосомы, сохраняя ее структурные изменения, то есть проявляется эффект захвата (“траппинга”) на нуклеосомах (Рис. 51 В, Г).

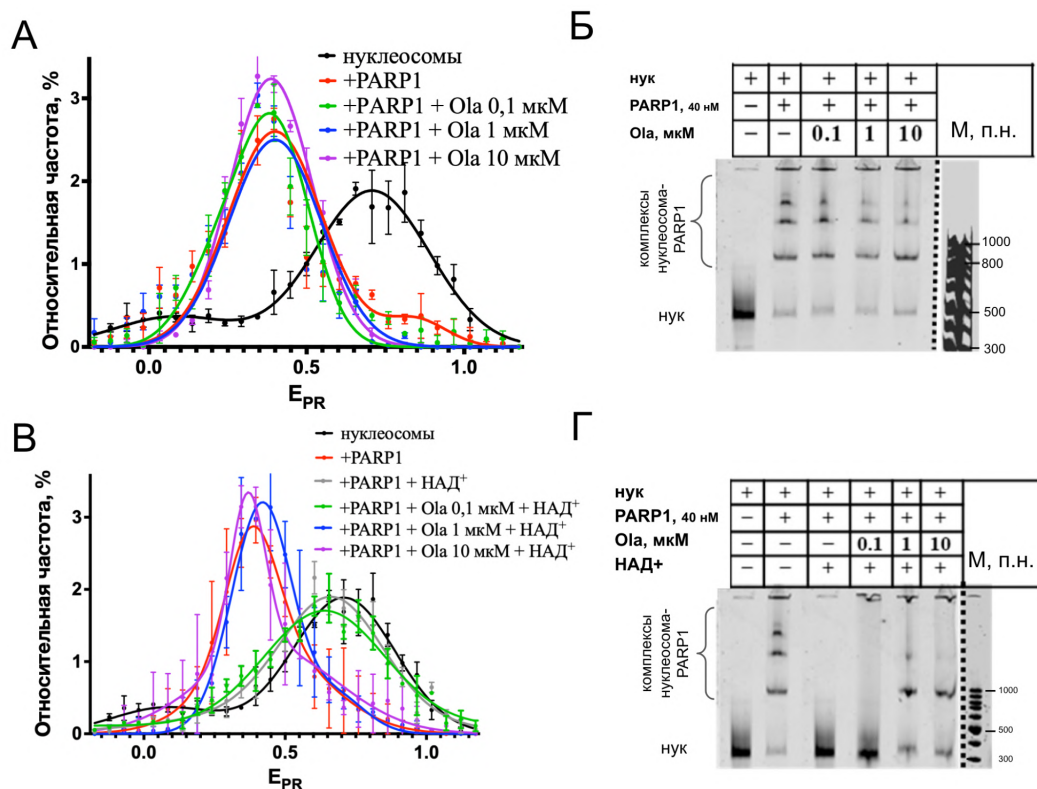


Рисунок 51 – Влияние Олапариба (Ola) на эффективность образование комплексов нуклеосома–PARP1 и ингибирование PARP1

Источник: из авторского исследования (Maluchenko N., 2022). Примечание: А,В – Частотные распределения содержащих нуклеосом по эффективности FRET в присутствии PARP1 и различных комбинаций НАД⁺ и Олапариба. Б,Г – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома/PARP1 при различных комбинациях НАД⁺ и Олапариба, изображения получены на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

В присутствии талазопариба от 0.1 до 10 мкМ PARP1 также эффективно связывается с нуклеосомами (Рис. 52 А, Б). При добавлении субстрата НАД⁺ ингибирующая активность талазопариба наблюдается уже при 0,1 мкМ: PARP1 теряет способность диссоциировать от нуклеосомы, сохраняя ее структурные изменения (эффект траппинга) (Рис. 52 В, Г).

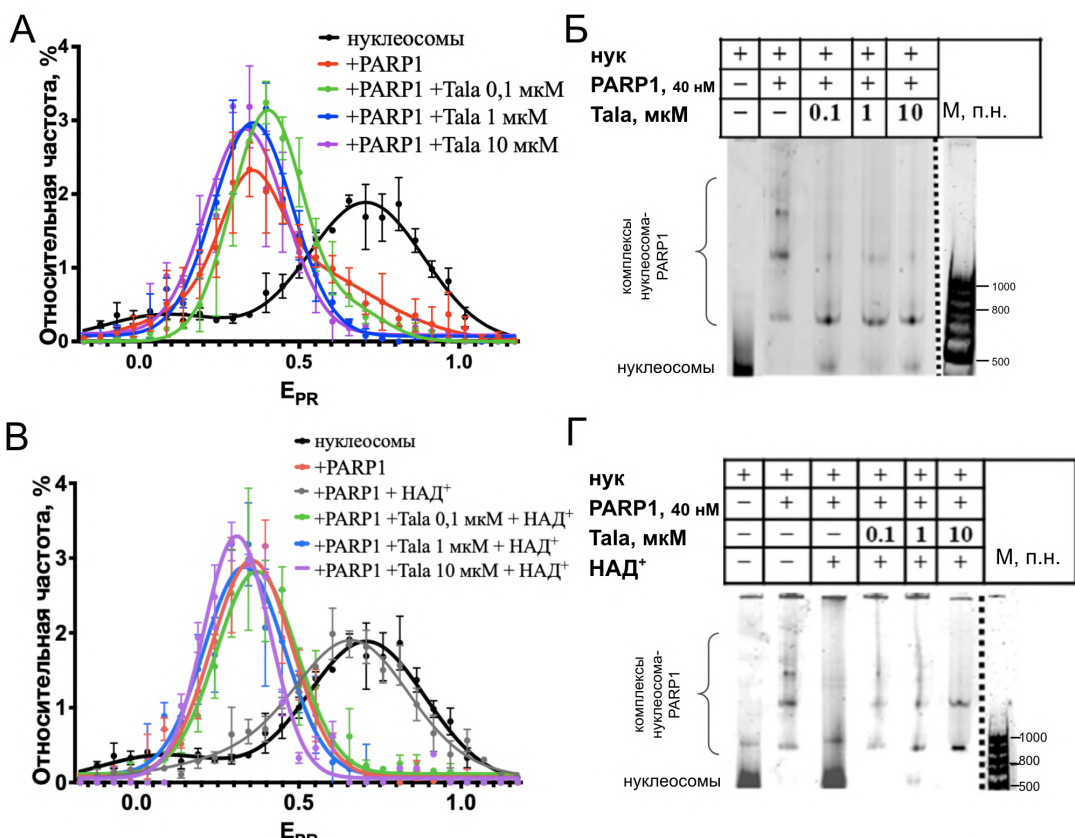


Рисунок 52 – Влияние талазопариба (Tala) на эффективность образования комплексов нуклеосома–PARP1 и ингибирование PARP1

Источник: из авторского исследования (Maluchenko N., 2022). Примечание: А,В – Частотные распределения содержащих нуклеосом по эффективности FRET в присутствии PARP1 и при различных комбинациях НАД⁺ и Талазопариба. Б,Г – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома/PARP1 при различных комбинациях НАД⁺ и Талазопариба, изображения получены на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

В присутствии от 0.1 до 10 мкМ велипариба PARP1 эффективно связывается с нуклеосомами, сохраняя паттерн с характерной стехиометрией 1:3 (нуклеосома:PARP1) (Рис. 53 А, Б). В отличие от талазапариба и олапариба, 10 мкМ велипариба в присутствии 100 мкМ НАД⁺ слабее индуцирует траппинг PARP1 в комплексах с нуклеосомами и значительная часть нуклеосом диссоциирует, что соответствует описываемому в литературе эффекту велипариба на клетках (Рис. 5 В, Г)

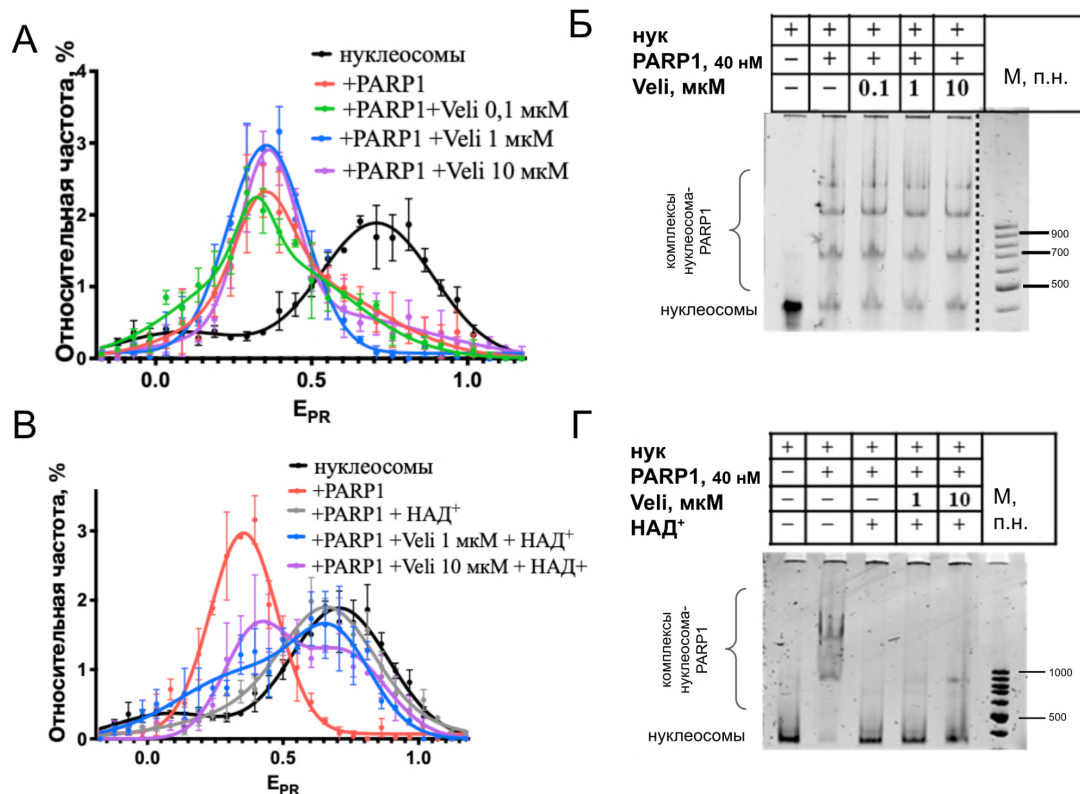


Рисунок 53 – Влияние Велипариба (Veli) на эффективность образование комплексов нуклеосома–PARP1 и ингибирование PARP1

Источник: из авторского исследования (Maluchenko N., 2022). Примечание: А, В – Частотные распределения содержащих нуклеосом по эффективности FRET в присутствии PARP1 и при различных комбинациях НАД⁺ и Велипариба. Б, Г – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома/PARP1 при различных комбинациях НАД⁺ и Велипариба, изображения получены на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

В данной работе для анализа механизма действия PARP1 использовали мононуклеосомы в качестве модельной системы. Показано, что эффективность траппинга, оцененная по степени задержки PARP1 на нуклеосомах, возрастала в ряду: талазопариб > олапариб >> велипариб. Данный порядок совпадает с ранжированием этих соединений по эффективности захвата в клеточных экспериментах (Murai J. et al., 2012). Полученные данные согласуются с ранее предложенными моделями траппинга и подтверждают, что нуклеосомная платформа позволяет дифференцированно оценивать различные аспекты действия ингибиторов: как подавление каталитической активности,

так и способность индуцировать траппинг фермента на хроматине. Преимуществом данного подхода является возможность проводить такую оценку *in vitro*, без использования сложных клеточных систем, что открывает перспективы для оценки молекулярного механизма действия соединений с потенциальной ингибирующей активностью. В рамках данной работы с использованием разработанной системы была изучена способность природного соединения ресвератрола ингибировать PARP1.

3.5 Ингибирующая PARP1 активность ресвератрола

Несмотря на широкое применение синтетических ингибиторов PARP, их использование сопровождается значительным перечнем побочных эффектов, в том числе гематологической токсичностью (анемия, тромбоцитопения, нейтропения), желудочно-кишечными расстройствами (тошнота, рвота, диарея), усталостью и повышение креатинина (Tian X. и др., 2022; LaFargue C.J. et al., 2019). Это обуславливает актуальность поиска новых, менее токсичных соединений, но обладающих эффективной ингибирующей активностью PARP. Для ряда природных полифенолов показана способность ингибировать активность PARP1 (Alqahtani S. и др., 2019; Dal Piaz F. и др., 2015; Geraets L. и др., 2007). Ресвератрол (3,5,4'-тригидроксистерильбен, RSV), входящий в группу полифенолов, обладает противоопухолевой и антиоксидантной активностью, а также влияет на работу ряда ядерных ферментов, включая ДНК-полимеразу α , Топоизомеразу II, ДНК-метилтрансферазу и др (Gatz S.A., Wiesmuller L., 2008; Howitz K.T. и др., 2003; Shaito A. и др., 2020; Zhang L.X. и др., 2021). Кроме того, он способен взаимодействовать с ДНК (Kumar S., Kumar P., Nair M.S., 2021; N'Soukroe-Kossi C.N. и др., 2015; Zhang S. и др., 2011), в том числе нуклеосомной, не вызывая конформационных изменений в нуклеосоме (Maluchenko N. V. A.T.V., Feofanov A. V. S.V.M., 2023). В связи с этим, он представляет интерес как перспективное соединение с потенциалом ингибировать активность PARP1.

Методами spFRET и EMSA анализа (Рис. 54 В, Г) показано, что в присутствии ресвератрола наблюдается ослабление связывания PARP1 с нуклеосомами, а наиболее выраженный эффект фиксируется при 1 мкМ. При активации НАД⁺ каталитической функции PARP1 наблюдается аналогичный паттерн: наиболее эффективный ингибирующий эффект приходится на 1 и 0,1 мкМ ресвератрола (Рис. 54 Б). Такой эффект связан с состоянием ресвератрола в растворе: при высоких концентрациях он агрегирует и ограниченно взаимодействует с нуклеосомами комплексами, а при

разведении он приходит в мономерное состояние и эффективно связывается с нуклеосомами и PARP1 (Рис. 54 А).

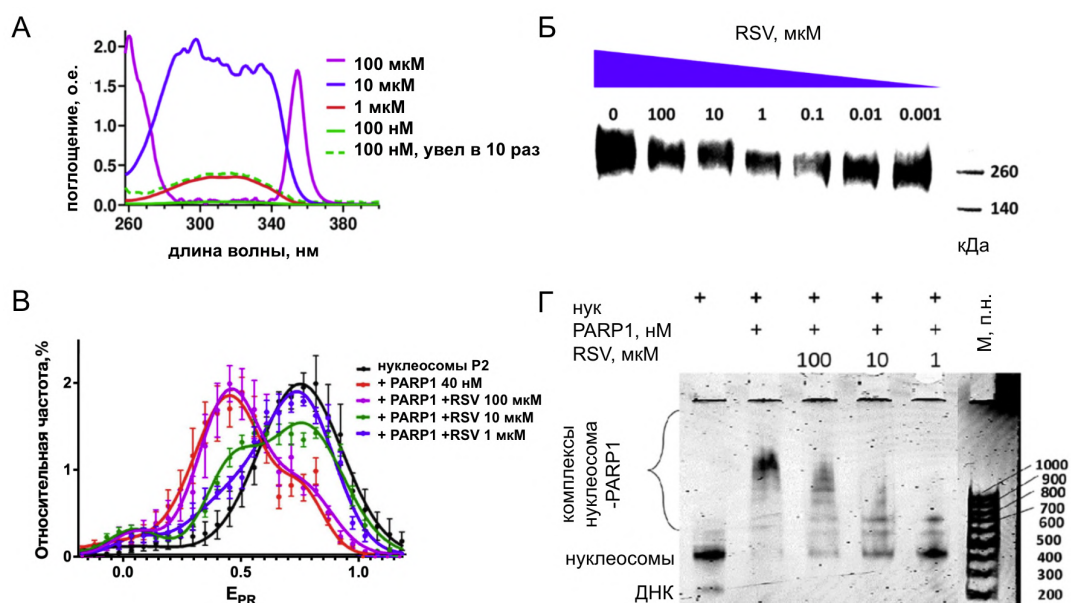


Рисунок 54 – Влияние ресвератрола (RSV) на каталитическую активность и нуклеосом-связывающие свойства PARP1

Источник: из авторского исследования (Koshkina D. et al., 2024). Примечание:

А – спектры поглощения ресвератрола при различных концентрациях (спектр 100 нМ также показан с увеличением интенсивности в 10 раз).

Б – авто-поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 в присутствии убывающих концентраций ресвератрола по данным вестерн-блоттинга

В – Частотные распределения нуклеосом, содержащих метки +13/+91 по эффективности FRET для комплексов нуклеосома-PARP1, в отсутствии PARP1, присутствии и при добавлении ресвератрола;

Г – Электрофореграмма (нативный ПААГ 4%) комплексов PARP1 с нуклеосомами при добавлении ресвератрола, изображения получены на установке Amersham Typhoon (Cytiva) при регистрации флуоресценции в канале Cy5 (возбуждение 635 нм, эмиссионный фильтр 670BP30) и Cy3 (возбуждение 532 нм, эмиссионный фильтр 570BP20).

Интересно, что ингибирование PARP1 ресвератролом сопровождается его связыванием с каталитическим центром фермента и снижением аффинности PARP1 к нуклеосомной ДНК, что указывает на двойной – каталитический и и структурный характер модуляции взаимодействия PARP1 с хроматином.

Таким образом, показано, что ресвератрол является перспективным низкомолекулярным модулятором активности PARP1, способный эффективно ингибировать связывающую и каталитическую способность PARP1 относительно нуклеосом в субмикромольном диапазоне концентраций. Это делает ресвератрол потенциальным прототипом для разработки менее токсичных ингибиторов PARP1 с направленным действием на нуклеосомно-ассоциированные формы фермента.

Заключение

Проведенное комплексное исследование продемонстрировало, что PARP1, помимо известной функции сенсора одно- и двунитевых разрывов ДНК, выполняет важную роль в реорганизации хроматина. Способность PARP1 индуцировать структурные изменения как в коровой части нуклеосомы, так и в линкерной ДНК указывает на реализацию пионероподобного механизма, обеспечивающего доступ к генетической информации. Полученные данные характеризуют PARP1 как универсального регулятора структуры хроматина: его активность не зависит от последовательности и протяженности линкерных участков ДНК, а также наличия посттрансляционных модификаций гистонов. Это обеспечивает динамическую перестройку хроматина на нуклеосомном уровне, позволяя более эффективно контролировать процессы транскрипции и репарации. Обратимость PARP1-индуцированных изменений обеспечивается механизмом отрицательной обратной связи, реализуемым через НАД⁺-зависимую аутомодификацию фермента.

Дополнительные эксперименты подтвердили способность PARP1 конкурировать с линкерным гистоном H1.0 за связывание с нуклеосомой и вызывать структурную реорганизацию нуклеосомы. Эффективность связывания определялась длиной линкерного участка нуклеосомной ДНК, которая выступает критическим параметром, задающий паттерн функционирования PARP1. В более компактизованных участках хроматина, где линкерная ДНК укорочена, PARP1 способен вытеснить H1.0. При увеличении длины линкерной ДНК, H1.0 эффективнее связывается с нуклеосомой и препятствует связыванию PARP1.

Показано, что в условиях открытого хроматина, моделируемого нуклеосомами, содержащими вариантный гистон H2A.Z, PARP1 обладает повышенной аффинностью и формирует стабильные комплексы, включая другие регуляторы хроматина, в частности p53. В таких условиях хроматина формируются комплексы нуклеосома-PARP1-p53, что свидетельствует о кооперативном механизме их действия в транскрипционно активных областях, где PARP1 создает структурные предпосылки для связывания и функционирования пионерных факторов.

В экспериментах с p53 было показано, что его ассоциация с нуклеосомами приводит к реорганизации линкерной области, что характеризует p53 как пионерный фактор. Примечательно, что сайт связывания был расположен в коровой области нуклеосомы, где доступ к ДНК ограничен, что указывает на способность p53

распознавать и модулировать труднодоступные области хроматина. Наблюдаемый эффект зависел от концентрации p53 и проявлялся при избытке белка по отношению к нуклеосомам. Это отражает важную роль концентрационной динамики p53 в регуляции структуры хроматина и поддержании геномной стабильности.

В клетках, содержащих интактный p53 ингибирование PARP1 может оказывать более выраженный противоопухолевый эффект, поскольку p53-зависимые пути ответа на повреждения сохраняются, а время пребывания PARP1 на нуклеосомах увеличивается. В результате сайты связывания p53, локализованные в углубленных участках кора нуклеосомы и чаще всего ассоциированные с проапоптотической активностью, становятся более доступными для взаимодействия с p53, что потенциально может усиливать эффект терапии.

В итоге можно заключить, что белки PARP1 и p53 не только основные участники ответа на стресс, но и участвуют в поддержании пластичности и динамической доступности ДНК для других регуляторных факторов. Эти данные открывают перспективы для для регулирования состояния хроматина и развития соответствующих инновационных терапевтических стратегий, особенно в эпигенетике и биомедицинских исследованиях.

В ходе работы установлено, что PARP1 способен активно модифицировать нуклеосомную структуру, повышая доступ различным регуляторам хроматина, в том числе системе CRISPR/dCas9. Также показано, что конструкторы dCas9/sgRNA, направленные в область диады нуклеосомы, не способны взаимодействовать с этой областью, тогда как нуклеосомы, предварительно обработанные PARP1 становятся доступными для связывания. Это указывает на то, что PARP1 может рассматриваться как универсальный модуль, расширяющий функциональные возможности платформ, основанных на dCas9 за счёт повышения доступности целевых последовательностей, ранее недоступных для действия генетических и эпигенетических редакторов.

В ходе работы разработана и охарактеризована система *in vitro*, позволяющая оценивать молекулярный механизм действия ингибиторов PARP1, а именно влияние вещества на ДНК-связывающую и каталитическую активности PARP1. На примере клинически применяемых ингибиторов (олапариб, талазопариб, велипариб) показано, что при сопоставимой степени подавления каталитической функции, они по-разному воздействуют на стабильность комплексов нуклеосома-PARP1, а также на степень реорганизации нуклеосом. Это указывает на существование молекулярно

различающихся типов ингибирования PARP1. Это демонстрирует, что предложенная нуклеосомная система может быть использована в качестве альтернативы клеточным системам для более точной классификации ингибиторов исходя из молекулярного механизма их действия. Кроме того, такая система может стать платформой для *in vitro*-скрининга новых соединений с определённым профилем действия.

Применение разработанной нуклеосомной платформы позволило установить, что ресвератрол обладает высоким ингибирующим потенциалом в отношении PARP1. В субмикромольном диапазоне концентраций данное соединение ослабляет взаимодействие PARP1 с нуклеосомами и подавляет его ферментативную активность. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования представленной системы для скрининга новых соединений — модуляторов активности PARP1.

Основные результаты и выводы

1. Белок PARP1 универсально реорганизует структуру нуклеосом по всей ДНК: эффект воспроизводится при смене источника гистоновых кор, наборе ПТМ, последовательности матричной ДНК и замене канонических гистонов на варианты.
2. PARP1 способен связываться с H1.0-содержащими хроматосомами и вытеснять линкерный гистон при укороченной длине линкерной ДНК.
3. PARP1 реорганизует H2A.Z-содержащие нуклеосомы эффективнее, чем нуклеосомы с каноническим H2A, что находится в соответствии с представлениями о роли H2A.Z-содержащих нуклеосом в регуляции экспрессии генов.
4. PARP1 повышает доступность нуклеосомной ДНК для dCas в нуклеосомах, содержащих канонический октамер гистонов, и увеличивает эффективность связывания p53 с H2A.Z-содержащими нуклеосомами, модулируя доступ регуляторных белков к хроматину.
5. Совокупность данных свидетельствует об пионерной активности PARP1 и его роли в формировании первичной платформы для регуляторных комплексов;
6. Уточнены молекулярные механизмы действия трёх референсных ингибиторов PARP на нуклеосомном уровне. Траппинг PARP1 является внутренним свойством комплекса нуклеосома-PARP1-ингибитор, что позволяет использовать нуклеосомы в качестве бесклеточной системы скрининга ингибиторов PARP1.

7. Ресвератрол ингибирует каталитическую активность PARP1 на нуклеосомном уровне, связываясь с каталитическим центром и снижает аффинность белка к нуклеосомной ДНК без индукции траппинга, что характеризует его как нетипичный модулятор активности PARP1.

Список используемых сокращений

FRET	Förster resonance energy transfer Фёстеровский резонансный перенос энергии
spFRET	Single-particle FRET перенос энергии между хромофорами в одной частице
bulk FRET	FRET-измерения по средней флуоресценции множества молекул
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПААГ	полиакриламидный гель
НАД⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
НАДН	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
PARP1	Poly(ADP-ribose)polymerase1, поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1
PAR	poly(ADP-ribose), поли(АДФ-рибоза)
PARPi	ингибиторы PARP
Pol II	ДНК-зависимая РНК-полимераза II
DSB	double-strand break разрыв двухцепочечной ДНК
SSB	single-strand break разрыв одноцепочечной ДНК
NHEJ	non-homologous end joining, негомологичное соединение концов ДНК
BER	base excision repair, эксцизионная репарация оснований
HR	homologous recombination (гомологичная рекомбинация)
HRR	homologous recombination repair (репарация путём гомологичной рекомбинации)
HRD	homologous recombination deficiency (дефицит гомологичной рекомбинации)
BRCA	BReast CAncer Gene - ген супрессор опухолей
BRCT	С-концевой домен белка BRCA1
OCT-1	октамер-связывающий транскрипционный фактор 1
SOX2	транскрипционный фактор SRY-box2 (sex-determining region Y-box 2)
TSS	сайт старта транскрипции, нуклеотид +1

H2A.Z	вариантный гистон H2A
H1.0	линкерный гистон варианта H1.0
ZF (1,2, 3)	цинковые пальцы PARP1 (1,2,3)
WGR	домен PARP1, названный по консервативному мотиву: W-триптофан, G-глицин, R-аргинин
LZ-мотив	Leucine Zipper – лейциновая застёжка
p53DBD	DNA-binding domain ДНК-связывающий домен p53
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A ингибитор циклин-зависимой киназы 1A (p21)
p53 BS	binding site сайт связывания p53
TAD	transactivation domain (N-терминальный трансактивационный домен p53)
PRD	proline-rich domain (обогащенный пролином домен p53)
DBD	DNA-binding domain (центральный ДНК-связывающий домен p53)
TET	tetramerization domain (домен тетрамеризации p53)
CTD	C-terminal regulatory domain (С-концевой регуляторный домен p53)
dCas	каталитически неактивная форма Cas нуклеазы
FPLC	fast protein liquid chromatography, быстрая жидкостная хроматография белков
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
(электрофоретический анализ подвижности комплексов)	
SDS	sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия
SDS-ПААГ	электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS, денатурирующие условия
DMCO	диметилсульфоксид
crRNA	короткая направляющая РНК
tracrRNA	trans-activating CRISPR RNA (малая РНК, комплементарная crRNA)
sgRNA	single guide RNA (однонитевая гидовая РНК: слитая tracrRNA и crRNA)

ПФ	пионерный фактор
PAM	протоспейсер-ассоциированный мотив
Stella	белок Stella, кодируется геном DPPA3 (Developmental Pluripotency Associated 3).
Tet1	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (Диоксигеназа метилцитозина TET1 (Ten-eleven translocation 1))
Zfp42	zinc finger protein 42 (цинк-связывающий белок с доменами типа “цинковый палец”)
Nanog	транскрипционный фактор Nanog homeobox
Pou5f1	POU class 5 homeobox 1, кодирует фактор транскрипции Oct4
ATM	ataxia telangiectasia mutated, serine/threonine kinase (серин/треониновая протеинкиназа ATM, мутированная при атаксии-телангиэктазии)
CHEK2	cell cycle checkpoint kinase 2, киназа 2 контрольной точки клеточного цикла, серин-треониновая протеинкиназа CHK2
BARD1	BRCA1-associated RING domain protein 1 (белок 1 с RING-доменом, ассоциированный с BRCA1)
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1 (также FANCI, Fanconi anemia group J)
PALB2	partner and localizer of BRCA2. RAD51C – RAD51 paralog C (RAD51 homolog C)
RAD51D	RAD51 paralog D (RAD51 homolog D, также RAD51 homolog 4)
HER2	human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа)
SIRT1	silent mating type information regulation 2 homolog 1 (sirtuin 1, NAD ⁺ -зависимая деацетилаза)
dNTP	дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (deoxyribonucleoside triphosphates)
H2A, H2B	основные (core) канонические гистоны, образующие

	димеры
H2A.Z	вариантный гистон канонического H2A
H3, H4	основные (core) канонические гистоны, образующие тетрамер

Благодарности

Автор выражает благодарность:

научному руководителю, Малюченко Наталии Валерьевне за обучение, постановку научных задач, обучение методикам, обсуждение полученных результатов, помощь с представлением результатов на конференциях и в публикациях и помощь в подготовке текстов презентаций, докладов и публикаций.

Студитскому Василию Михайловичу за помощь в интерпретации результатов, советы по проведению исследований и возможность работать на кафедре Биоинженерии в группе динамики хроматина.

преподавателям кафедры, у которых имела честь обучаться в период бакалавриата, магистратуры и аспирантуры, за переданные знания, высокий профессионализм и поддержку на всех этапах формирования как исследователя.

сотрудников научной группы В.М. Студитского: Коровину А.К. Герасимову Н.С., Любителева А.В., Гераськину О.В., Бондаренко Е.А., Мариловцеву Е.В., за обучение методикам, расчетам, обработки данных, за помощь в проведении экспериментов и предоставления материалов для их проведения и поддержку в ходе выполнения диссертационной работы.

сотрудников научной группы А.К. Шайтана Армеева Г. А. за обучение биофизическим основам работы с $spFRET$, а также предоставления программного обеспечения для анализа полученных данных.

сотрудникам, студентам и аспирантам кафедры Биоинженерии МГУ имени М.В.Ломоносова за помощь в проведении исследования, обсуждение результатов и поддержку в течение выполнения работы.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2024-539 от 24.04.2024 по теме: «Эпигенетика как основа для разработки новых стратегий лечения болезней».

Список литературы

1. A Phase 1 trial of the PARP inhibitor olaparib (AZD2281) in combination with the anti-angiogenic cediranib (AZD2171) in recurrent epithelial ovarian or triple-negative breast cancer / J. F. Liu, S. M. Tolaney, M. Birrer и др. // *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). – 2013. – Т. 49. – № 14. – С. 2972-2978.
2. A Phase 3 Randomized, Placebo-Controlled Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without the PARP Inhibitor Veliparib (ABT-888) in HER2-Negative Metastatic or Locally Advanced Unresectable BRCA-Associated Breast Cancer. A Phase 3 Randomized, Placebo-controlled Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without Veliparib (ABT-888) in HER2-negative Metastatic or Locally Advanced Unresectable BRCA-associated Breast Cancer / AbbVie. – clinicaltrials.gov, 2025.
3. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1 / Y. Miki, J. Swensen, D. Shattuck-Eidens et al. // *Science*. – 1994. – Vol. 266. – № 5182. – P. 66-71.
4. A brief review of nucleosome structure. / H. J. Cutter AR // *FEBS Lett*. – 2015. – Т. 589. – С. 2914-2922.
5. A phase I study of veliparib in combination with metronomic cyclophosphamide in adults with refractory solid tumors and lymphomas / S. Kummar // *Clin. Cancer Res*. – 2012. – Т. 18. – С. 1726-1734.
6. A practical guide to single-molecule FRET / R. Roy, S. Hohng, T. Ha // *Nat. Methods*. – 2008. – Т. 5. – № 6. – С. 507-16.
7. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity / M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara и др. // *Science*. – 2012. – Т. 337. – № 6096. – С. 816-821.
8. A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1 / E. M. Ruaro, L. Collavin, G. Del Sal и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – Т. 94. – № 9. – С. 4675-4680.
9. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease / R. S. Turner, R. G. Thomas, S. Craft и др. // *Neurology*. – 2015. – Т. 85. – № 16. – С. 1383-1391.
10. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells / J. Widom // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Т. 89. – № 3. – С. 1095-9.
11. A review of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP1) role and its inhibitors bearing pyrazole or indazole core for cancer therapy / I. M. Bastos, S. Rebelo, V. L. M. Silva // *Biochemical Pharmacology*. – 2024. – Vol. 221. – P. 116045.
12. A small-molecule protein-protein interaction inhibitor of PARP1 that targets its BRCT domain / Z. Na // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2015. – Т. 54. – № 8. – С. 2515-2519.
13. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. / P. Bork, K. Hofmann, P. Bucher et al. // *The FASEB Journal*. – 1997. – Vol. 11. – № 1. – P. 68-76.

14. A tale of histone modifications / P. A. Grant // *Genome Biology*. – 2001. – Т. 2. – № 4. – C. reviews0003.1-reviews0003.6.
15. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation / M. F. Langelier, K. M. Servent, E. E. Rogers, J. M. Pascal // *J Biol Chem*. – 2008. – Т. 283. – № 7. – C. 4105-14.
16. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis / M. Kracikova, G. Akiri, A. George et al. // *Cell Death & Differentiation*. – 2013. – Vol. 20. – № 4. – P. 576-588.
17. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. / C. K. Donawho // *Clin. Cancer Res*. – 2007. – Т. 13. – C. 2728-2737.
18. ADP-ribosylation of p53 tumor suppressor protein: mutant but not wild-type p53 is modified / J. Wesierska-Gadek, A. Bugajska-Schretter, C. Cerni // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 1996. – Т. 62. – ADP-ribosylation of p53 tumor suppressor protein. – № 1. – C. 90-101.
19. ADP-ribosyltransferases Parp1 and Parp7 safeguard pluripotency of ES cells / S. J. Roper, S. Chrysanthou, C. E. Senner et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № 14. – P. 8914-8927.
20. Activating the PARP-1 Sensor Component of the Groucho/ TLE1 Corepressor Complex Mediates a CaMKinase II δ -Dependent Neurogenic Gene Activation Pathway / B.-G. Ju, D. Solum, E. J. Song et al. – P. 15.
21. Active-Site Models of Streptococcus pyogenes Cas9 in DNA Cleavage State / H. Tang, H. Yuan, W. Du и др. // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – Т. 8. – C. 653262.
22. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial / S. Loibl, J. O'Shaughnessy, M. Untch и др. // *The Lancet. Oncology*. – 2018. – Т. 19. – Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess). – № 4. – C. 497-509.
23. Adjuvant Olaparib for Patients with BRCA1 - or BRCA2 -Mutated Breast Cancer / A. N. J. Tutt, J. E. Garber, B. Kaufman et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384. – № 25. – P. 2394-2405.
24. Adverse Event Profiles of PARP Inhibitors: Analysis of Spontaneous Reports Submitted to FAERS / X. Tian, L. Chen, D. Gai и др. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Т. 13. – Adverse Event Profiles of PARP Inhibitors. – C. 851246.
25. Alternative Modes of Binding of Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 to Free DNA and Nucleosomes / N. J. Clark, M. Kramer, U. M. Muthurajan, K. Luger // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 39. – P. 32430-32439.
26. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi и др. // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2015. – Т. 13. – № 11. – C. 722-736.
27. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol / T. Meng, D. Xiao, A. Muhammed и др. // *Molecules*. – 2021. – Т. 26. – № 1. – C. 229.

28. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone / U. M. Muthurajan, M. R. D. Hepler, A. R. Hieb et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 35. – P. 12752-12757.
29. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency / Y. Shen, F. L. Rehman, Y. Feng и др. // *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. – 2013. – Т. 19. – № 18. – С. 5003-5015.
30. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. / R. ; C. Roy // *Nat. Rev. Cancer*. – 2011. – Т. 12. – С. 68-78.
31. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer / N. Petrucelli, M. B. Daly, T. Pal. – Текст : электронный // *GeneReviews®* / М. Р. Adam и др. ред. . – Seattle (WA) : University of Washington, Seattle, 1993.
32. BRCA2 Regulates Homologous Recombination in Response to DNA Damage: Implications for Genome Stability and Carcinogenesis / C. Abaji, I. Cousineau, A. Belmaaza // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65. – BRCA2 Regulates Homologous Recombination in Response to DNA Damage. – № 10. – P. 4117-4125.
33. BRCAness revisited / C. J. Lord, A. Ashworth // *Nature Reviews Cancer*. – 2016. – Vol. 16. – № 2. – P. 110-120.
34. Bromodomain biology and drug discovery / N. Zaware, M.-M. Zhou // *Nature structural & molecular biology*. – 2019. – Т. 26. – № 10. – С. 870-879.
35. CENP-A Regulation and Cancer / C. Renaud-Pageot, J.-P. Quivy, M. Lochhead, G. Almouzni // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – Т. 10. – С. 907120.
36. CENP-A nucleosome-a chromatin-embedded pedestal for the centromere: lessons learned from structural biology / A. Ali-Ahmad, N. Sekulić // *Essays in Biochemistry*. – 2020. – Т. 64. – CENP-A nucleosome-a chromatin-embedded pedestal for the centromere. – № 2. – С. 205-221.
37. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau и др. // *Science*. – 2007. – Т. 315. – № 5819. – С. 1709-1712.
38. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes* / A. Le Rhun, A. Escalera-Maurer, M. Bratovič, E. Charpentier // *RNA Biology*. – 2019. – Т. 16. – № 4. – С. 380-389.
39. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity / R. Barrangou, L. A. Marraffini // *Molecular cell*. – 2014. – Т. 54. – CRISPR-Cas systems. – № 2. – С. 234-244.
40. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes / E. V. Koonin, K. S. Makarova // *F1000 Biology Reports*. – 2009. – Т. 1. – CRISPR-Cas. – С. 95.
41. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance / F. Hille, E. Charpentier // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2016. – Т. 371. – CRISPR-Cas. – № 1707. – С. 20150496.
42. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes / L. A. Gilbert, M. H. Larson, L. Morsut и др. // *Cell*. – 2013. – Т. 154. – № 2. – С. 442-451.
43. CRISPR/Cas9 – An evolving biological tool kit for cancer biology and oncology / X. Tian, T. Gu, S. Patel et al. // *npj Precision Oncology*. – 2019. – Vol. 3. – № 1. – P. 8.

44. CRISPR/Cas9-based epigenome editing: An overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity / V. Tadić, G. Josipović, V. Zoldoš, A. Vojta // *Methods*. – 2019. – Тр. 164-165. – CRISPR/Cas9-based epigenome editing. – С. 109-119.
45. Cardioprotection by resveratrol: A human clinical trial in patients with stable coronary artery disease / K. Magyar, R. Halmosi, A. Palfi и др. // *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. – 2012. – Т. 50. – Cardioprotection by resveratrol. – № 3. – С. 179-187.
46. Cas9-catalyzed DNA Cleavage Generates Staggered Ends: Evidence from Molecular Dynamics Simulations / Z. Zuo, J. Liu // *Scientific Reports*. – 2016. – Т. 5. – Cas9-catalyzed DNA Cleavage Generates Staggered Ends. – С. 37584.
47. Catalytic-Independent Functions of PARP-1 Determine Sox2 Pioneer Activity at Intractable Genomic Loci / Z. Liu, W. L. Kraus // *Molecular Cell*. – 2017. – Vol. 65. – № 4. – P. 589-603.e9.
48. Causative Genes of Homologous Recombination Deficiency (HRD)-Related Breast Cancer and Specific Strategies at Present / S. Nakamura, Y. Kojima, S. Takeuchi // *Current Oncology*. – 2025. – Т. 32. – № 2. – С. 90.
49. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM / K. Engeland // *Cell Death and Differentiation*. – 2018. – Т. 25. – Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53. – № 1. – С. 114-132.
50. Chaudhuri, A. Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding / A. Chaudhuri, K. Halder, A. Datta // *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*. – 2022. – Т. 135. – № 2. – С. 367-387.
51. Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression / J. Chen // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – Vol. 6. – № 3. – P. a026104.
52. Choy, J. S. Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution / J. S. Choy, T.-H. Lee // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2012. – Vol. 37. – № 10. – P. 425-435.
53. Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*) / M. I. E. Uusi-Mäkelä, H. R. Barker, C. A. Bäuerlein et al. // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – № 4. – P. e0196238.
54. Chromatin modifications and their function / T. Kouzarides // *Cell*. – 2007. – Т. 128. – № 4. – С. 693-705.
55. Chromatin structure; oligomers of the histones / R. D. Kornberg, J. O. Thomas // *Science (New York, N.Y.)*. – 1974. – Т. 184. – № 4139. – С. 865-868.
56. Chromatin structures condensed by linker histones / B.-R. Zhou, Y. Bai // *Essays in Biochemistry*. – 2019. – Vol. 63. – № 1. – P. 75-87.
57. Clinical PARP inhibitors allosterically induce PARP2 retention on DNA / M.-F. Langelier, X. Lin, S. Zha, J. M. Pascal // *Science Advances*. – 2023. – Т. 9. – № 12. – С. eadf7175.
58. Clinical approaches to overcome PARP inhibitor resistance / Y. Zou, H. Zhang, P. Chen и др. // *Molecular Cancer*. – 2025. – Т. 24. – № 1. – С. 156.

59. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin / M. D. Meneghini, M. Wu, H. D. Madhani // *Cell*. – 2003. – Т. 112. – № 5. – С. 725-736.
60. Coordinated changes in gene expression, H1 variant distribution and genome 3D conformation in response to H1 depletion / N. Serna-Pujol, M. Salinas-Pena, F. Mugianesi et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50. – № 7. – P. 3892-3910.
61. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells / L. A. Boyer, T. I. Lee, M. F. Cole и др. // *Cell*. – 2005. – Т. 122. – № 6. – С. 947-956.
62. Cracking the homologous recombination deficiency code: how to identify responders to PARP inhibitors / L. Paulet, A. Trecourt, A. Leary et al. // *European Journal of Cancer*. – 2022. – Vol. 166. – Cracking the homologous recombination deficiency code. – P. 87-99.
63. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2013. – Т. 1833. – № 12. – С. 3448-3459.
64. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA / H. Nishimasu, F. A. Ran, P. D. Hsu и др. // *Cell*. – 2014. – Т. 156. – № 5. – С. 935-949.
65. Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations / Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich. – Текст : электронный // *Science*. – 1994. – Crystal Structure of a p53 Tumor Suppressor-DNA Complex.
66. Crystal Structures of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA: STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INSIGHTS INTO DNA-DEPENDENT PARP-1 ACTIVITY / M.-F. Langelier, J. L. Planck, S. Roy, J. M. Pascal // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – Crystal Structures of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Zinc Fingers Bound to DNA. – № 12. – P. 10690-10701.
67. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution / K. Luger. – 1997. – Vol. 389. – P. 10.
68. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution / K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond et al. // *Nature*. – 1997. – Vol. 389. – № 6648. – P. 251-260.
69. Crystal structures of heterotypic nucleosomes containing histones H2A.Z and H2A / N. Horikoshi, Y. Arimura, H. Taguchi, H. Kurumizaka // *Open Biology*. – 2016. – Vol. 6. – № 6. – P. 160127.
70. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation / A. J. Pion E. Ullmann GM // *Biochemistry*. – 2005. – Т. 44. – С. 14670-14681.
71. Deciphering the acetylation code of p53 in transcription regulation and tumor suppression / Z. Xia, N. Kon, A. P. Gu и др. // *Oncogene*. – 2022. – Т. 41. – № 22. – С. 3039-3050.
72. Deciphering the dark side of histone ADP-ribosylation: what structural features of damaged nucleosome regulate the activities of PARP1 and PARP2 / T. A. Kurgina, N. A. Moor, M. M. Kutuzov и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – Т. 53. – Deciphering the dark side of histone ADP-ribosylation. – № 17. – С. gkaf864.

73. Definition of a consensus binding site for p53 / W. S. el-Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol и др. // *Nature Genetics*. – 1992. – Т. 1. – № 1. – С. 45-49.
74. Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in pulmonary epithelial cells / L. Geraets, H. J. Moonen, K. Brauers и др. // *J Nutr*. – 2007. – Т. 137. – № 10. – С. 2190-5.
75. Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors / J. Murai, S. N. Huang, B. B. Das и др. // *Cancer research*. – 2012. – Т. 72. – № 21. – С. 5588-5599.
76. Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability / Z. Li, H. Kono. – Text : electronic // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1.
77. Domain C of Human Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Is Important for Enzyme Activity and Contains a Novel Zinc-Ribbon Motif, / Z. Tao, P. Gao, D. W. Hoffman, H. Liu // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – № 21. – P. 5804-5813.
78. Dynamic Changes in Occupancy of Histone Variant H2A.Z during Induced Somatic Cell Reprogramming / F. Dong, Z. Song, J. Yu и др. // *Stem Cells International*. – 2016. – Т. 2016. – С. 3162363.
79. Effects of MacroH2A and H2A.Z on Nucleosome Dynamics as Elucidated by Molecular Dynamics Simulations / S. Bowerman, J. Wereszczynski // *Biophysical Journal*. – 2016. – Т. 110. – № 2. – С. 327-337.
80. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase / P. Stepper, G. Kungulovski, R. Z. Jurkowska и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Т. 45. – № 4. – С. 1703-1713.
81. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function / D. V. Fyodorov, B.-R. Zhou, A. I. Skoultchi, Y. Bai // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2018. – Т. 19. – № 3. – С. 192-206.
82. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space / H. Nishimasu, X. Shi, S. Ishiguro et al. // *Science*. – 2018. – Vol. 361. – № 6408. – P. 1259-1262.
83. Enhanced Cas12a editing in mammalian cells and zebrafish / P. Liu, K. Luk, M. Shin и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47. – № 8. – С. 4169-4180.
84. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease / D. E. Handy, R. Castro, J. Loscalzo // *Circulation*. – 2011. – Т. 123. – Epigenetic Modifications. – № 19. – С. 2145-2156.
85. Epigenetics-targeted drugs: current paradigms and future challenges / W. Dai, X. Qiao, Y. Fang et al. // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2024. – Vol. 9. – Epigenetics-targeted drugs. – № 1. – P. 332.
86. Epigenome Engineering Using dCas Systems for Biomedical Applications and Biotechnology: Current Achievements, Opportunities and Challenges / M. A. Kovalev, N. Y. Mamaeva, N. V. Kristovskiy et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26. – Epigenome Engineering Using dCas Systems for Biomedical Applications and Biotechnology. – № 13. – P. 6371.
87. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers / I. B. Hilton, A. M. D'Ippolito, C. M. Vockley и др. // *Nature Biotechnology*. – 2015. – Т. 33. – № 5. – С. 510-517.

88. Evaluating Parp1 domains as gossypol targets / S. Gross, E. Yu. Kotova, N. V. Maluchenko et al. // *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. – 2016. – Vol. 71. – № 4. – P. 235-239.
89. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems / K. S. Makarova, D. H. Haft, R. Barrangou и др. // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2011. – Т. 9. – № 6. – С. 467-477.
90. Exploring and comparing adverse events between PARP inhibitors / C. J. LaFargue, G. Z. Dal Molin, A. K. Sood, R. L. Coleman // *The Lancet Oncology*. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. e15-e28.
91. Exploring the binding of resveratrol to a promoter DNA sequence d(CCAATTGG)(2) through multispectroscopic, nuclear magnetic resonance and molecular dynamics studies / S. Kumar, P. Kumar, M. S. Nair // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. – 2021. – Т. 252. – С. 119488.
92. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy / G. Kim, G. Ison, A. E. McKee et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – FDA Approval Summary. – № 19. – P. 4257-4261.
93. FRET analysis of the unwrapping of nucleosomal DNA containing a sequence characteristic of the + 1 nucleosome / T. Sunami, D. Luo, S. Sato et al. // *Scientific Reports*. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 2169.
94. Facilitated transcription through the nucleosome at high ionic strength occurs via a histone octamer transfer mechanism / W. Walter, V. M. Studitsky // *J. Biol. Chem*. – 2001. – Т. 276. – № 31. – С. 29104-10.
95. Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells / O. Mortusewicz, J. C. Ame, V. Schreiber, H. Leonhardt // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – Т. 35. – № 22. – С. 7665-75.
96. Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes / M. Fischer // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – № 28. – P. 3943-3956.
97. Frequency and prognostic value of mutations associated with the homologous recombination DNA repair pathway in a large pan cancer cohort / D. R. Principe, M. Narbutis, R. Koch, A. Rana // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 20223.
98. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription / H. L. Ko, E. C. Ren // *Biomolecules*. – 2012. – Т. 2. – № 4. – С. 524-548.
99. Functional analysis of p53 binding under differential stresses / A. J. Krieg, E. M. Hammond, A. J. Giaccia // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Т. 26. – № 19. – С. 7030-7045.
100. Genome Instability and γ H2AX / A. Georgoulis, C. Vorgias, G. Chrousos, E. Rogakou // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18. – № 9. – P. 1979.
101. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation / L. A. Gilbert, M. A. Horlbeck, B. Adamson и др. // *Cell*. – 2014. – Т. 159. – № 3. – С. 647-661.

102. Genome-wide programmable transcriptional memory by CRISPR-based epigenome editing / J. K. Nuñez, J. Chen, G. C. Pommier и др. // *Cell*. – 2021. – Т. 184. – № 9. – С. 2503-2519.e17.
103. Germline Testing and Somatic Tumor Testing for BRCA1/2 Pathogenic Variants in Ovarian Cancer: What Is the Optimal Sequence of Testing? / J. S. Kwon, A. V. Tinker, J. Santos и др. // *JCO precision oncology*. – 2022. – Т. 6. – Germline Testing and Somatic Tumor Testing for BRCA1/2 Pathogenic Variants in Ovarian Cancer. – С. e2200033.
104. Germline and Somatic Mutations in Homologous Recombination Genes Predict Platinum Response and Survival in Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Carcinomas / K. P. Pennington, T. Walsh, M. I. Harrell et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 764-775.
105. Graded enhancement of p53 binding to CREB-binding protein (CBP) by multisite phosphorylation / C. W. Lee, J. C. Ferreon, A. C. M. Ferreon и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Т. 107. – № 45. – С. 19290-19295.
106. H. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1 / D. ; H. Ahel // *Science*. – 2009. – Т. 325. – С. 1240-1243.
107. H1.0 C Terminal Domain Is Integral for Altering Transcription Factor Binding within Nucleosomes / N. L. Burge, J. L. Thuma, Z. Z. Hong et al. // *Biochemistry*. – 2022. – Vol. 61. – № 8. – P. 625-638.
108. H2A.Z Facilitates Access of Active and Repressive Complexes to Chromatin in Embryonic Stem Cell Self-renewal and Differentiation / G. Hu, K. Cui, D. Northrup и др. // *Cell stem cell*. – 2013. – Т. 12. – № 2. – С. 180-192.
109. H2A.Z facilitates Sox2-nucleosome interaction by promoting DNA and histone H3 tail mobility / H. K. Moos, R. Patel, S. K. Flaherty и др. // *bioRxiv*. – 2025. – С. 2025.03.06.641691.
110. H2A.Z facilitates licensing and activation of early replication origins / H. Long, L. Zhang, M. Lv et al. // *Nature*. – 2020. – Vol. 577. – № 7791. – P. 576-581.
111. H2A.Z nucleosomes enriched over active genes are homotypic / C. M. Weber, J. G. Henikoff, S. Henikoff // *Nat Struct Mol Biol*. – 2010. – Т. 17. – № 12. – С. 1500-7.
112. H2A.Z-Mediated Genome-Wide Chromatin Specialization / J. Eirin-Lopez, J. Ausio // *Current Genomics*. – 2007. – Vol. 8. – № 1. – P. 59-66.
113. H2A.Z: view from the top / J. Zlatanova, A. Thakar // *Structure*. – 2008. – Т. 16. – № 2. – С. 166-79.
114. Haematologic toxicities with PARP inhibitors in cancer patients: an up-to-date meta-analysis of 29 randomized controlled trials / C. Wang, J. Li // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. – 2021. – Vol. 46. – Haematologic toxicities with PARP inhibitors in cancer patients. – № 3. – P. 571-584.
115. Harnessing p53 for targeted cancer therapy: new advances and future directions / Z. Andrysik, J. M. Espinosa // *Transcription*. – 2025. – Т. 16. – Harnessing p53 for targeted cancer therapy. – № 1. – С. 3-46.

116. Hematological toxicity of parp inhibitors in solid tumors: a systematic review and safety meta-analysis / B. A. Maiorano, M. Catalano, M. F. P. Maiorano и др. // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2025. – Т. 44. – Hematological toxicity of parp inhibitors in solid tumors. – № 3. – С. 65.
117. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs / J. J. Rottenberg S, O. M. Cranston A // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – Т. 105. – С. 17079-17084.
118. High-Speed Atomic Force Microscopy Reveals Spontaneous Nucleosome Sliding of H2A.Z at the Subsecond Time Scale / S. Morioka, S. Sato, N. Horikoshi et al. // *Nano Letters*. – 2023. – Vol. 23. – № 5. – P. 1696-1704.
119. Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly / B. Xiao, B. S. Freedman, K. E. Miller и др. // *Molecular Biology of the Cell*. – 2012. – Т. 23. – № 24. – С. 4864-4871.
120. Histone H1 subtypes differentially modulate chromatin condensation without preventing ATP-dependent remodeling by SWI/SNF or NURF / J. Clausell, N. Happel, T. K. Hale и др. // *PloS One*. – 2009. – Т. 4. – № 10. – С. e0007243.
121. Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency / J.-M. Terme, B. Sesé, L. Millán-Ariño и др. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Т. 286. – № 41. – С. 35347-35357.
122. Histone H2A Variants: Diversifying chromatin to ensure genome integrity / P. Oberdoerffer, K. M. Miller // *Seminars in cell & developmental biology*. – 2023. – Т. 135. – Histone H2A Variants. – С. 59-72.
123. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair / Y. Xu, M. K. Ayrapetov, C. Xu и др. // *Molecular cell*. – 2012. – Т. 48. – № 5. – С. 723-733.
124. Histone PARylation factor 1: a review of its role in the DNA damage response / J. Rudolph, K. Luger // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – Т. 53. – Histone PARylation factor 1. – № 20. – С. gkaf1170.
125. Histone Tails Promote PARP1-Dependent Structural Rearrangements in Nucleosomes / N. V. Maluchenko // *Dokl Biochem Biophys*. – 2019. – Т. 489. – № 1. – С. 377-379.
126. Histone Variant H2A.Z Enhances Histone and Nucleosome Dynamics / J. K. Dias, P. S. Dias, R. Alakenova и др. // *Molecular & cellular proteomics: MCP*. – 2026. – Т. 25. – № 3. – С. 101518.
127. Histone Variant H2A.Z Marks the 5' Ends of Both Active and Inactive Genes in Euchromatin / R. M. Raisner, P. D. Hartley, M. D. Meneghini и др. // *Cell*. – 2005. – Т. 123. – № 2. – С. 233-248.
128. Histone modifications and p53 binding poise the p21 promoter for activation in human embryonic stem cells / Y. Itahana, J. Zhang, J. Göke et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 28112.
129. Histone modifications in transcriptional regulation / S. L. Berger // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2002. – Т. 12. – № 2. – С. 142-148.

130. Histone supply: Multitiered regulation ensures chromatin dynamics throughout the cell cycle / S. Mendiratta, A. Gatto, G. Almouzni // *The Journal of Cell Biology*. – 2019. – Т. 218. – Histone supply. – № 1. – С. 39-54.
131. Histone tails as signaling antennas of chromatin / Y. Peng, S. Li, D. Landsman, A. R. Panchenko // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2021. – Т. 67. – С. 153-160.
132. Histone variant H2A.Z modulates nucleosome dynamics to promote DNA accessibility / S. Li, T. Wei, A. R. Panchenko // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 769.
133. Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics / P. B. Talbert, S. Henikoff // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2017. – Vol. 18. – Histone variants on the move. – № 2. – P. 115-126.
134. Histone variants: The bricks that fit differently / Y. A. Hegazy, H. Dhahri, N. El Osmani и др. // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2024. – Т. 301. – Histone variants. – № 1. – С. 108048.
135. Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes / C. Thomas, Y. Ji, C. Wu и др. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2019. – Т. 116. – № 20. – С. 9941-9946.
136. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer / M. L. Telli, K. M. Timms, J. Reid et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 15. – P. 3764-3773.
137. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins / R. Prakash, Y. Zhang, W. Feng, M. Jasin // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – Т. 7. – Homologous Recombination and Human Health. – № 4. – С. a016600.
138. Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer / C.-C. Chen, W. Feng, P. X. Lim и др. // *Annual Review of Cancer Biology*. – 2018. – Т. 2. – С. 313-336.
139. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis / R. Elkholi, J. E. Chipuk // *Bioessays*. – 2014. – Т. 36. – № 1. – С. 46-51.
140. Human PARP1 Facilitates Transcription through a Nucleosome and Histone Displacement by Pol II In Vitro / E. Y. Kotova, F. K. Hsieh, H. W. Chang и др. // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Т. 23. – № 13.
141. Human PARP1 substrates and regulators of its catalytic activity: An updated overview / T. Zhu, J.-Y. Zheng, L.-L. Huang и др. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2023. – Т. 14. – Human PARP1 substrates and regulators of its catalytic activity. – С. 1137151.
142. Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro / K. Yoda, S. Ando, S. Morishita et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 97. – № 13. – P. 7266-7271.

143. Identification and mechanism of action analysis of the new PARP-1 inhibitor 2''-hydroxygenkwanol A / F. Dal Piaz, P. Ferro, A. Vassallo и др. // *Biochim Biophys Acta*. – 2015. – Т. 1850. – № 9. – С. 1806-14.
144. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression / K. K. Walker, A. J. Levine // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1996. – Т. 93. – № 26. – С. 15335-15340.
145. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 / R. Wooster, G. Bignell, J. Lancastert et al. – 1995. – Vol. 378.
146. Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing / J. Rudolph, K. Jung, K. Luger // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2022. – Т. 119. – № 11. – С. e2121979119.
147. Integrating PARP Inhibitors in mCRPC Therapy: Current Strategies and Emerging Trends / B. Thapa, N. De Sarkar, S. Giri et al. // *Cancer Management and Research*. – 2024. – Vol. Volume 16. – Integrating PARP Inhibitors in mCRPC Therapy. – P. 1267-1283.
148. Interaction between p53 N terminus and core domain regulates specific and nonspecific DNA binding / F. He, W. Borchers, T. Song и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Т. 116. – № 18. – С. 8859-8868.
149. Interactions of PARP1 Inhibitors with PARP1-Nucleosome Complexes / N. Maluchenko // *Cells*. – 2022. – Т. 11. – С. 21.
150. Interactions of p53 with poly(ADP-ribose) and DNA induce distinct changes in protein structure as revealed by ATR-FTIR spectroscopy / A. Krüger, A. Stier, A. Fischbach и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Т. 47. – № 9. – С. 4843-4858.
151. Interstitial lung disease in patients treated with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi): analysis of results from clinical trials and the FDA Adverse Events Reporting System database / Z. He, J. Mo, W. Jiang и др. // *International Journal of Gynecological Cancer*. – 2023. – Т. 33. – Interstitial lung disease in patients treated with poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors (PARPi). – № 8. – С. 1237-1246.
152. Intra- and inter-nucleosomal interactions of the histone H4 tail revealed with a human nucleosome core particle with genetically-incorporated H4 tetra-acetylation / M. Wakamori, Y. Fujii, N. Suka et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – № 1. – P. 17204.
153. Jackson, S. P. The DNA-damage response in human biology and disease / S. P. Jackson, J. Bartek // *Nature*. – 2009. – Т. 461. – № 7267. – С. 1071-1078.
154. Key role of the REC lobe during CRISPR–Cas9 activation by ‘sensing’, ‘regulating’, and ‘locking’ the catalytic HNH domain / G. Palermo, J. S. Chen, C. G. Ricci и др. // *Quarterly reviews of biophysics*. – 2018. – Т. 51. – С. e91.
155. Large-Scale Functional Organization of Long-Range Chromatin Interaction Networks / K. S. Sandhu, G. Li, H. M. Poh и др. // *Cell reports*. – 2012. – Т. 2. – № 5. – С. 1207-1219.

156. Linker histone H1.0 loads onto nucleosomes through multiple pathways that are facilitated by histone chaperones / E. Akbari, N. L. Burge, M. G. Poirier // bioRxiv: The Preprint Server for Biology. – 2025. – C. 2025.02.23.639383.
157. Linker histone defines structure and self-association behaviour of the 177 bp human chromosome / S. Wang, V. K. Vogirala, A. Soman et al. // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 380.
158. Linker histones as liquid-like glue for chromatin / E. B. Gibbs, R. W. Kriwacki // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2018. – T. 115. – № 47. – C. 11868-11870.
159. Linking chromatin composition and structural dynamics at the nucleosome level / G. A. Armeev, A. K. Gribkova, I. Pospelova et al. // Current Opinion in Structural Biology. – 2019. – Vol. 56. – P. 46-55.
160. Major adverse cardiac events and cardiovascular toxicity with PARP inhibitors-based therapy for solid tumors: a systematic review and safety meta-analysis / A. Palazzo, C. Ciccarese, R. Iacovelli и др. // ESMO Open. – 2023. – T. 8. – Major adverse cardiac events and cardiovascular toxicity with PARP inhibitors-based therapy for solid tumors. – № 2. – C. 101154.
161. Management of Adverse Events During Rucaparib Treatment for Relapsed Ovarian Cancer: A Review of Published Studies and Practical Guidance / D. Lorusso, J. García-Donas, J. Sehouli, F. Joly // Targeted Oncology. – 2020. – T. 15. – Management of Adverse Events During Rucaparib Treatment for Relapsed Ovarian Cancer. – № 3. – C. 391-406.
162. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II / O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov и др. // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2009. – T. 16. – № 12. – C. 1272-8.
163. Mechanisms of Nucleosome Reorganization by PARP1 / N. V. Maluchenko, D. K. Nilov, S. V. Pushkarev и др. // Int J Mol Sci. – 2021. – T. 22. – № 22.
164. Mechanisms of Nucleosome Reorganization by PARP1 / N. V. Maluchenko, D. K. Nilov, S. V. Pushkarev и др. // Int J Mol Sci. – 2021a. – T. 22. – № 22.
165. Mechanisms of transcriptional regulation by p53 / K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, J. M. Espinosa // Cell Death & Differentiation. – 2018. – Vol. 25. – № 1. – P. 133-143.
166. Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors / T. A. Hopkins, Y. Shi, L. E. Rodriguez и др. // Mol Cancer Res. – 2015. – T. 13. – № 11. – C. 1465-77.
167. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes / B. E. Bernstein, E. L. Humphrey, R. L. Erlich et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2002. – Vol. 99. – № 13. – P. 8695-8700.
168. Modulating chromatin accessibility by transactivation and targeting proximal dsRNAs enhances Cas9 editing efficiency in vivo / G. Liu, K. Yin, Q. Zhang et al. // Genome Biology. – 2019. – Vol. 20. – № 1. – P. 145.
169. Modulation of DNA intercalation by resveratrol and genistein / S. Usha, I. M. Johnson, R. Malathi // Mol Cell Biochem. – 2006. – T. 284. – № 1-2. – C. 57-64.

170. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites / M. S. Altmeyer M. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Т. 37. – С. 3723-3738.
171. Multiple roles of H2A.Z in regulating promoter chromatin architecture in human cells / L. Cole, S. Kurscheid, M. Nekrasov и др. // *Nature Communications.* – 2021. – Т. 12. – № 1. – С. 2524.
172. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response / O. Cazzalini, A. I. Scovassi, M. Savio и др. // *Mutation Research.* – 2010. – Т. 704. – № 1-3. – С. 12-20.
173. Myelodysplastic Syndrome/Acute Myeloid Leukemia Following the Use of Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP) Inhibitors: A Real-World Analysis of Postmarketing Surveillance Data / Q. Zhao, P. Ma, P. Fu и др. // *Frontiers in Pharmacology.* – 2022. – Т. 13. – Myelodysplastic Syndrome/Acute Myeloid Leukemia Following the Use of Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP) Inhibitors. – С. 912256.
174. N- and C-terminal domains determine differential nucleosomal binding geometry and affinity of linker histone isoforms H1(0) and H1c / P. Vyas, D. T. Brown // *The Journal of Biological Chemistry.* – 2012. – Т. 287. – № 15. – С. 11778-11787.
175. NAD⁺-Dependent Modulation of Chromatin Structure and Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1 / M. Y. Kim, S. Mauro, N. Gévry et al. // *Cell.* – 2004. – Vol. 119. – № 6. – P. 803-814.
176. Native nucleosome-positioning elements as alternatives to the 601 sequence for nucleosome repositioning studies / R.-W. Chen, S. D. Stoeber, I. M. Nodelman и др. // *Nucleic Acids Research.* – 2025. – Т. 53. – № 17. – С. gkaf822.
177. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer’s Disease: Role of SIRT1 / B. A. Q. Gomes, J. P. B. Silva, C. F. R. Romeiro и др. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* – 2018. – Т. 2018. – Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer’s Disease. – С. 8152373.
178. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning / P. T. Lowary // *J. Mol. Biol.* – 1998. – Т. 276. – № 1. – С. 19-42.
179. New Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease Management—A Review of the Literature / I. Lousa, F. Reis, I. Beirão и др. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Т. 22. – № 1. – С. 43.
180. New Therapeutic Options for BRCA Mutant Patients / A. Ghanem, S. M. Domchek // *Annual Review of Medicine.* – 2025. – Vol. 76. – № 1. – P. 175-187.
181. Non-Classical H1-like PARP1 Binding to Chromatosome / D. Koshkina, N. Maluchenko, D. Nilov и др. // *Cells.* – 2025. – Т. 14. – № 17. – С. 1309.
182. Novel Epigenetic Techniques Provided by the CRISPR/Cas9 System / N. Xie, Y. Zhou, Q. Sun, B. Tang // *Stem Cells International.* – 2018. – Т. 2018. – С. 7834175.
183. Novel Tricyclic Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitors with Potent Anticancer Chemopotentiating Activity: Design, Synthesis, and X-ray Cocrystal Structure / S. S. Canan Koch, L. H. Thoresen, J. G. Tikhe et al. // *Journal of Medicinal*

- Chemistry. – 2002. – Vol. 45. – Novel Tricyclic Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitors with Potent Anticancer Chemopotentiating Activity. – № 23. – P. 4961-4974.
184. Nuclear and nucleolar activity of linker histone variant H1.0 / A. Kowalski // Cellular & Molecular Biology Letters. – 2016. – T. 21. – C. 15.
185. Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex / J. L. Workman, R. E. Kingston // Science. – 1992. – T. 258. – № 5089. – C. 1780-4.
186. Nucleosome-binding by TP53, TP63, and TP73 is determined by the composition, accessibility, and helical orientation of their binding sites / P. D. Wilson, X. Yu, M. J. Buck. – bioRxiv, 2024.
187. Nucleosomes impede Cas9 access to DNA in vivo and in vitro / M. A. Horlbeck, L. B. Witkowsky, B. Guglielmi и др. // eLife. – T. 5. – C. e12677.
188. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation / M. Robson, S.-A. Im, E. Senkus и др. // The New England Journal of Medicine. – 2017. – T. 377. – № 6. – C. 523-533.
189. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer / J. de Bono, J. Mateo, K. Fizazi и др. // The New England Journal of Medicine. – 2020. – T. 382. – № 22. – C. 2091-2102.
190. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial / A. Poveda, A. Floquet, J. A. Ledermann и др. // The Lancet. Oncology. – 2021. – T. 22. – Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21). – № 5. – C. 620-631.
191. OlympiAD extended follow-up for overall survival and safety: olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer / M. E. Robson, S.-A. Im, E. Senkus и др. // European journal of cancer (Oxford, England : 1990). – 2023. – T. 184. – OlympiAD extended follow-up for overall survival and safety. – C. 39-47.
192. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1 / X. and K. Luo // Genes Dev. – 2012. – T. 26. – C. 417-432.
193. On the Interaction of Resveratrol with Nucleosomes / A. T. V. Maluchenko N. V., S. V. M. Feofanov A. V. // Biophysics. – 2023. – T. 68. – № 3. – C. 369-375.
194. Optimization of Competitor Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC) Levels is Advised in DNA-Protein Interaction Studies Involving Enriched Nuclear Proteins / K. Larouche, M.-J. Bergeron, S. Leclerc, S. L. Guérin // BioTechniques. – 1996. – Vol. 20. – № 3. – P. 439-444.
195. Overall Survival Results From the POLO Trial: A Phase III Study of Active Maintenance Olaparib Versus Placebo for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer / H. L. Kindler, P. Hammel, M. Reni и др. // Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2022. – T. 40. – Overall Survival Results From the POLO Trial. – № 34. – C. 3929-3939.

196. Overcoming a nucleosomal barrier to replication / H.-W. Chang, M. Pandey, O. I. Kulaeva et al. // *Science Advances*. – 2016. – Vol. 2. – № 11. – P. e1601865.
197. Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation / S. J. Petesch, J. T. Lis // *Trends in Genetics*. – 2012. – Vol. 28. – № 6. – P. 285-294.
198. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures / D. Gleditzsch, P. Pausch, H. Müller-Esparza и др. // *RNA biology*. – 2019. – Т. 16. – PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes. – № 4. – C. 504-517.
199. PARP Inhibitor Applicability: Detailed Assays for Homologous Recombination Repair Pathway Components / G. O’Sullivan Coyne, C. Karlovich, D. Wilsker et al. // *OncoTargets and Therapy*. – 2022. – Vol. Volume 15. – PARP Inhibitor Applicability. – P. 165-180.
200. PARP Inhibitors in Pancreatic Cancer with Homologous Recombination Repair Gene Mutations: A Single-Institution Experience / R. Miao, K. Blue, K. Sommerer et al. // *Cancers*. – 2024. – Vol. 16. – PARP Inhibitors in Pancreatic Cancer with Homologous Recombination Repair Gene Mutations. – № 20. – P. 3447.
201. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy / C. J. Lord, A. Ashworth // *Science (New York, N.Y.)*. – 2017b. – Т. 355. – PARP Inhibitors. – № 6330. – C. 1152-1158.
202. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification / M.-F. Langelier, T. Eisemann, A. A. Riccio, J. M. Pascal // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2018. – Т. 53. – PARP family enzymes. – C. 187-198.
203. PARP inhibitors beyond BRCA-mutated cancers: precision medicine at the crossroads / B. Tomasik, M. Bieńkowski, J. Jassem. – Text : electronic // *Precision Cancer Medicine*. – 2021. – Vol. 4. – PARP inhibitors beyond BRCA-mutated cancers. – № 0.
204. PARP inhibitors in HRD BRCAness breast cancer patients / I. Eiriz, M. V. Batista, A. R. Freitas et al. // *Journal of Cancer Biology*. – 2023. – Vol. Volume 4. – № Issue 1. – P. 17-28.
205. PARP inhibitors in cancer therapy: Two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications / Y. Drew, R. Plummer // *Drug Resistance Updates*. – 2009. – Vol. 12. – PARP inhibitors in cancer therapy. – № 6. – P. 153-156.
206. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic / C. J. Lord, A. Ashworth // *Science*. – 2017a. – Т. 355. – № 6330. – C. 1152-1158.
207. PARP mediated DNA damage response, genomic stability and immune responses / C. Zong, T. Zhu, J. He et al.
208. PARP mediated DNA damage response, genomic stability and immune responses / C. Zong, T. Zhu, J. He et al. // *International Journal of Cancer*. – 2022. – Vol. 150. – № 11. – P. 1745-1759.
209. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain / J. M. Dawicki-McKenna, M. F. Langelier, J. E. DeNizio и др. // *Mol Cell*. – 2015. – Т. 60. – № 5. – C. 755-768.

210. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles / W. L. Kraus, M. O. Hottiger // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Т. 34. – PARP-1 and gene regulation. – № 6. – С. 1109-1123.
211. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis / M.-F. Langelier, J. M. Pascal // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2013. – Vol. 23. – № 1. – P. 134-143.
212. PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response / M. T. Valenzuela, R. Guerrero, M. I. Núñez и др. // *Oncogene*. – 2002. – Т. 21. – № 7. – С. 1108-1116.
213. PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response / V. Mt, G. R, N. Mi et al. – Text : electronic // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – № 7.
214. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway / R. Krishnakumar, W. L. Kraus // *Mol Cell*. – 2010. – Т. 39. – № 5. – С. 736-49.
215. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1 / M. F. Langelier, A. A. Riccio, J. M. Pascal // *Nucleic Acids Res*. – 2014. – Т. 42. – № 12. – С. 7762-75.
216. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design / N. V. Malyuchenko, E. Y. Kotova, O. I. Kulaeva и др. // *Acta Naturae*. – 2015. – Т. 7. – № 3. – С. 27-37.
217. PARP1 Trapping by PARP Inhibitors Drives Cytotoxicity in Both Cancer Cells and Healthy Bone Marrow / T. A. Hopkins, W. B. Ainsworth, P. A. Ellis и др. // *Mol Cancer Res*. – 2019. – Т. 17. – № 2. – С. 409-419.
218. PARP1 and PARylation facilitate transcription-coupled DNA repair by stabilizing the CSB-RNAPII complex / M. Robu, R. G. Shah, D. van den Heuvel и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2025. – Т. 53. – № 22. – С. gkaf1303.
219. PARP1 and Sox2: An Unlikely Team of Pioneers to Conquer the Nucleosome / G. Gaullier, K. Luger // *Molecular Cell*. – 2017. – Т. 65. – PARP1 and Sox2. – № 4. – С. 581-582.
220. PARP1 catalytic variants reveal branching and chain length-specific functions of poly(ADP-ribose) in cellular physiology and stress response / L. Aberle, A. Kruger, J. M. Reber и др. // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – Т. 48. – № 18. – С. 10015-10033.
221. PARP1-dependent Kinetics of Recruitment of MRE11 and NBS1 Proteins to Multiple DNA Damage Sites / J.-F. Haince, D. McDonald, A. Rodrigue et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 2. – P. 1197-1208.
222. PARP1-dependent alterations in nucleosome organization: potential involvement of p53 / D. O. Koshkina, N. V. Maluchenko, A. M. Novichkova и др. // *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seria 16. Biologia*. – 2025. – Т. 80. – PARP1-dependent alterations in nucleosome organization. – № №3S, 2025. – С. 67-72.
223. PARP1: Liaison of Chromatin Remodeling and Transcription / W. Zong, Y. Gong, W. Sun et al. // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14. – PARP1. – № 17. – P. 4162.

224. PARP1: Structural Insights and Pharmacological Targets for Inhibition / J. O. Spiegel, B. Van Houten, J. D. Durrant // DNA repair. – 2021. – T. 103. – PARP1. – C. 103125.
225. PARPs and PARP inhibitors: molecular mechanisms and clinical applications / F. Wang, Z. Guo, M. J. Carr, W. Shi // Molecular Biomedicine. – 2025. – Vol. 6. – PARPs and PARP inhibitors. – № 1. – P. 152.
226. Pan-cancer Analysis of Homologous Recombination Repair-associated Gene Alterations and Genome-wide Loss-of-Heterozygosity Score / C. B. Westphalen, A. D. Fine, F. André et al. // Clinical Cancer Research. – 2022. – Vol. 28. – № 7. – P. 1412-1421.
227. Phase I Study of Veliparib (ABT-888) Combined with Cisplatin and Vinorelbine in Advanced Triple-Negative Breast Cancer and/or BRCA Mutation-Associated Breast Cancer / E. T. Rodler, B. F. Kurland, M. Griffin и др. // Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2016. – T. 22. – № 12. – C. 2855-2864.
228. Pilot study of veliparib (ABT-888) with temozolomide (TMZ) in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) / M. Hussain // J. Clin. Oncol. – 2012. – T. 30 (Suppl.). – C. a224.
229. Pioneer Transcription Factors, Chromatin Dynamics, and Cell Fate Control / K. S. Zaret, S. Mango // Current opinion in genetics & development. – 2016. – T. 37. – C. 76-81.
230. Pioneer factors: Roles and their regulation in development / A. Barral, K. S. Zaret // Trends in genetics : TIG. – 2024. – T. 40. – Pioneer factors. – № 2. – C. 134-148.
231. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression / K. S. Zaret, J. S. Carroll // Genes & Development. – 2011. – T. 25. – Pioneer transcription factors. – № 21. – C. 2227-2241.
232. Poly(ADP-Ribosyl) Code Functions / N. V. Maluchenko, D. O. Koshkina, A. V. Feofanov и др. // Acta Naturae. – 2021b. – T. 13. – № 2. – C. 58-69.
233. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions / M. Malanga // J. Biol. Chem. – 1998. – T. 273. – C. 11839-11843.
234. Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity / T. Eisemann, J. M. Pascal // Cell Mol Life Sci. – 2020. – T. 77. – № 1. – C. 19-33.
235. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation / W. S. G. Jp, V. H et al. – Text : electronic // The Journal of biological chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 21.
236. Poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2: Classical Functions and Interaction with HPF1 – New Histone Poly(ADP-ribosyl)ation Factor / T. A. Kurgina, K. T. A, O. I. Lavrik, J. O. И // Molecular Biology. – 2023. – T. 57. – Poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2. – № 2. – C. 254-268.

237. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 In Vitro and In Vivo Modulates Binding to its DNA Consensus Sequence / C. M. Simbulan-Rosenthal, D. S. Rosenthal, R. Luo и др. // *Neoplasia* (New York, N.Y.). – 2001. – Т. 3. – № 3. – С. 179-188.
238. PolyADP-ribose-mediated regulation of p53 complexed with topoisomerase I following ionizing radiation / H. M. Smith, A. J. Grosovsky // *Carcinogenesis*. – 1999. – Т. 20. – № 8. – С. 1439-1443.
239. Post-transcriptional control of PARP gene expression / C. Clayton, H. R. Hotz // *Mol Biochem Parasitol*. – 1996. – Т. 77. – № 1. – С. 1-6.
240. Post-translational modifications and chromatin dynamics / T. O. Tolsma, J. C. Hansen // *Essays in Biochemistry*. – 2019. – Т. 63. – № 1. – С. 89-96.
241. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review / A. Shaito, A. M. Posadino, N. Younes и др. // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Т. 21. – № 6.
242. Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer / T. Tanaka, M. Watanabe, K. Yamashita // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9. – № 22. – P. 16234-16247.
243. Powell, S. N. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation / S. N. Powell, L. A. Kachnic // *Oncogene*. – 2003. – Т. 22. – № 37. – С. 5784-5791.
244. Prediction of homologous recombination deficiency identifies colorectal tumors sensitive to PARP inhibition / G. Corti, K. Buzo, E. Berrino et al. // *npj Precision Oncology*. – 2024. – Vol. 8. – № 1. – P. 231.
245. Predictive biomarkers for the efficacy of PARP inhibitors in ovarian cancer: an updated systematic review / Y.-W. Wang, I. Allen, G. Funingana et al. // *BJC Reports*. – 2025. – Vol. 3. – Predictive biomarkers for the efficacy of PARP inhibitors in ovarian cancer. – № 1. – P. 14.
246. Preparation and Analysis of Uniquely Positioned Mononucleosomes / D. A. Gaykalova, O. I. Kulaeva, V. A. Bondarenko, V. M. Studitsky. – Text : electronic // *Chromatin Protocols* / S. P. Chellappan ed. . – Totowa, NJ : Humana Press, 2009. – Vol. 523. – P. 109-123.
247. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET / K. S. Kudryashova, O. V. Chertkov, D. V. Nikitin и др. // *Methods Mol Biol*. – 2015. – Т. 1288. – С. 395-412.
248. Preparative two-step purification of recombinant H1.0 linker histone and its domains / N. Ivic, S. Bilokapic, M. Halic // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 12. – P. e0189040.
249. Probing the Conformational Changes Associated with DNA Binding to PARP1 / J. Rudolph, J. Mahadevan, K. Luger // *Biochemistry*. – 2020. – Т. 59. – № 21. – С. 2003-2011.
250. Profile of veliparib and its potential in the treatment of solid tumors / L. M. Wagner // *OncoTargets and therapy*. – 2015. – Т. 8. – С. 1931-1939.
251. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system / D. Bikard, W. Jiang, P. Samai и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Т. 41. – № 15. – С. 7429-7437.

252. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity / S. A. Shah, S. Erdmann, F. J. M. Mojica, R. A. Garrett // *RNA biology*. – 2013. – Т. 10. – Protospacer recognition motifs. – № 5. – С. 891-899.
253. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor / T. Tsukiyama, C. Wu // *Cell*. – 1995. – Т. 83. – № 6. – С. 1011-20.
254. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea / B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, J. A. Doudna // *Nature*. – 2012. – Т. 482. – № 7385. – С. 331-338.
255. RNA-guided human genome engineering via Cas9 / P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt и др. // *Science*. – 2013. – Т. 339. – № 6121. – С. 823-826.
256. Rapid Detection and Signaling of DNA Damage by PARP-1 / N. Pandey, B. E. Black // *Trends in biochemical sciences*. – 2021. – Т. 46. – № 9. – С. 744-757.
257. Recent advances in γ H2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair / N. Rahmanian, M. Shokrzadeh, M. Eskandani // *DNA Repair*. – 2021. – Vol. 108. – Recent advances in γ H2AX biomarker-based genotoxicity assays. – P. 103243.
258. Reciprocal Binding of PARP-1 and Histone H1 at Promoters Specifies Transcriptional Outcomes / R. Krishnakumar, M. J. Gamble, K. M. Frizzell et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 319. – № 5864. – P. 819-821.
259. Regulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 by DNA Structure-specific Binding / I. Lonskaya, V. N. Potaman, L. S. Shlyakhtenko et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280. – № 17. – P. 17076-17083.
260. Regulation of chromatin by histone modifications / A. J. Bannister, T. Kouzarides // *Cell Research*. – 2011. – Т. 21. – № 3. – С. 381-395.
261. Regulation of the nucleosome unwrapping rate controls DNA accessibility / J. A. North, J. C. Shimko, S. Javaid et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40. – № 20. – P. 10215-10227.
262. Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions / I. D'Silva, J. D. Pelletier, J. Lagueux и др. // *Biochim Biophys Acta*. – 1999. – Т. 1430. – № 1. – С. 119-26.
263. Replacement of histone H3 with CENP-A directs global nucleosome array condensation and loosening of nucleosome superhelical termini / T. Panchenko, T. C. Sorensen, C. L. Woodcock et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 40. – P. 16588-16593.
264. Replication-dependent histone biosynthesis is coupled to cell-cycle commitment / C. Armstrong, S. L. Spencer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2021. – Vol. 118. – № 31. – P. e2100178118.
265. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression / L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert и др. // *Cell*. – 2013. – Т. 152. – № 5. – С. 1173-1183.
266. Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research / L. X. Zhang, C. X. Li, M. U. Kakar и др. // *Biomed Pharmacother*. – 2021. – Т. 143. – С. 112164.

267. Resveratrol Boosts Cognitive Function by Targeting SIRT1 / W. Cao, Y. Dou, A. Li // *Neurochemical Research*. – 2018. – T. 43. – № 9. – C. 1705-1713.
268. Resveratrol Effects on Metabolic Syndrome Features: A Systematic Review and Meta-Analysis / G. C. Batista-Jorge, A. S. Barcala-Jorge, D. F. Lelis et al. // *Endocrines*. – 2024. – Vol. 5. – Resveratrol Effects on Metabolic Syndrome Features. – № 2. – P. 225-243.
269. Resveratrol Inhibits Nucleosome Binding and Catalytic Activity of PARP1 / D. Koshkina, N. Maluchenko, A. Korovina et al. // *Biomolecules*. – 2024. – Vol. 14. – № 11. – P. 1398.
270. Resveratrol Modulates SIRT1 and DNMT Functions and Restores LINE-1 Methylation Levels in ARPE-19 Cells under Oxidative Stress and Inflammation / A. Maugeri, M. Barchitta, M. G. Mazzone и др. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – T. 19. – № 7. – C. 2118.
271. Resveratrol activates SIRT1 in a Lamin A-dependent manner / S. Ghosh, B. Liu, Z. Zhou // *Cell Cycle*. – 2013. – T. 12. – № 6. – C. 872-876.
272. Resveratrol and Cardiovascular Diseases / D. Bonnefont-Rousselot // *Nutrients*. – 2016. – T. 8. – № 5. – C. 250.
273. Resveratrol in the Therapy and Prevention of Parkinson's Disease: Prospects and Limitations / E. V. Semenova, A. V. Siprov, M. A. Vedenkin // *Medicine and Biotechnology*. – 2025. – T. 1. – Resveratrol in the Therapy and Prevention of Parkinson's Disease. – № 4. – C. 342-355.
274. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits / B. Salehi, A. P. Mishra, M. Nigam и др. // *Biomedicines*. – 2018. – T. 6. – Resveratrol. – № 3. – C. 91.
275. Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment / M. Koushki, N. Amiri-Dashatan, N. Ahmadi и др. // *Food Science & Nutrition*. – 2018. – T. 6. – Resveratrol. – № 8. – C. 2473-2490.
276. Review of embryo-fetal developmental toxicity studies performed for pharmaceuticals approved by FDA in 2016 and 2017 / P. Barrow // *Reproductive Toxicology*. – 2018. – T. 80. – C. 117-125.
277. Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54 / S. Sasse-Dwight, J. D. Gralla // *Cell*. – 1990. – T. 62. – № 5. – C. 945-54.
278. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair / M. S. Satoh, T. Lindahl // *Nature*. – 1992. – Vol. 356. – № 6367. – P. 356-358.
279. Rotational positioning of nucleosomes facilitates selective binding of p53 to response elements associated with cell cycle arrest / F. Cui, V. B. Zhurkin // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – T. 42. – № 2. – C. 836-847.
280. SWR1 Complex Poises Heterochromatin Boundaries for Antisilencing Activity Propagation / B. O. Zhou, S.-S. Wang, L.-X. Xu et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2010. – Vol. 30. – № 10. – P. 2391-2400.
281. Safety assessments and clinical features of PARP inhibitors from real-world data of Japanese patients with ovarian cancer / R. Uekusa, A. Yokoi, E. Watanabe et al. // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 12595.

282. Selective Inhibition of BRCA2-Deficient Mammary Tumor Cell Growth by AZD2281 and Cisplatin / B. Evers, R. Drost, E. Schut et al. // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14. – № 12. – P. 3916-3925.
283. Single-Pair FRET Microscopy Reveals Mononucleosome Dynamics / W. J. A. Koopmans, A. Brehm, C. Logie et al. // *Journal of Fluorescence*. – 2007. – Vol. 17. – № 6. – P. 785-795.
284. Single-molecule FRET and linear dichroism studies of DNA breathing and helicase binding at replication fork junctions / C. Phelps, W. Lee, D. Jose et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110. – № 43. – P. 17320-17325.
285. Single-molecule measurements reveal that PARP1 condenses DNA by loop stabilization / N. A. W. Bell, P. J. Haynes, K. Brunner и др. // *Science Advances*. – 2021. – Т. 7. – № 33. – C. eabf3641.
286. Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics / R. Buning, J. van Noort // *Biochimie*. – 2010. – Vol. 92. – № 12. – P. 1729-1740.
287. Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects / D. S. Moraes, D. C. Moreira, J. M. O. Andrade, S. H. S. Santos // *IBRO Reports*. – 2020. – Т. 9. – Sirtuins, brain and cognition. – C. 46-51.
288. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes / S. J. J. Brouns, M. M. Jore, M. Lundgren et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 321. – № 5891. – P. 960-964.
289. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan / K. T. Howitz, K. J. Bitterman, H. Y. Cohen и др. // *Nature*. – 2003. – Т. 425. – № 6954. – C. 191-6.
290. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase / H. E. Bryant, N. Schultz, H. D. Thomas et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 434. – № 7035. – P. 913-917.
291. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH / S. Zhang, X. Sun, Z. Jing, F. Qu // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. – 2011. – Т. 82. – № 1. – C. 213-6.
292. Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. / P. J. Shoemaker BA // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – Т. 97. – № 16. – C. 8868-73.
293. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib / J. Murai, S. N. Huang, A. Renaud и др. // *Molecular cancer therapeutics*. – 2014. – Т. 13. – № 2. – C. 433-443.
294. Structural Basis for DNA Damage-Dependent Poly(ADP-ribosyl)ation by Human PARP-1 / M.-F. Langelier, J. L. Planck, S. Roy, J. M. Pascal // *Science*. – 2012. – Vol. 336. – № 6082. – P. 728-732.
295. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1 / S. Eustermann, W. F. Wu, M. F. Langelier и др. // *Mol Cell*. – 2015. – Т. 60. – № 5. – C. 742-754.

296. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1 / S. Eustermann, W.-F. Wu, M.-F. Langelier et al. // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 60. – № 5. – P. 742-754.
297. Structural Evolution and Dynamics of the p53 Proteins / G. Chillemi, S. Kehrlöesser, F. Bernassola и др. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. a028308.
298. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription / D. A. Gaykalova, O. I. Kulaeva, O. Volokh и др. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2015. – Т. 112. – № 43. – С. E5787-95.
299. Structural and functional insights into internal domain replacement in SpCas9 for protein engineering / S. Kim, H. Won, J. Bae et al. // *Scientific Reports*. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 41528.
300. Structural and functional insights into the bona fide catalytic state of *Streptococcus pyogenes* Cas9 HNH nuclease domain / Z. Zuo, A. Zolekar, K. Babu и др. // *eLife*. – 2019. – Т. 8. – С. e46500.
301. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks / L. Zandarashvili, M. F. Langelier, U. K. Velagapudi и др. // *Science*. – 2020. – Т. 368. – № 6486.
302. Structural basis for p53 binding to its nucleosomal target DNA sequence / M. Nishimura, Y. Takizawa, K. Nozawa, H. Kurumizaka // *PNAS Nexus*. – 2022. – Т. 1. – № 4. – С. pgac177.
303. Structural basis of chromatin regulation by histone variant H2A.Z / T. S. Lewis, V. Sokolova, H. Jung и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2021. – Т. 49. – № 19. – С. 11379-11391.
304. Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system / C. Huai, G. Li, R. Yao et al. // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1375.
305. Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9 / M. Guo, K. Ren, Y. Zhu et al. // *Cell Research*. – 2019. – Vol. 29. – № 3. – P. 183-192.
306. Structural modeling for DNA binding to antioxidants resveratrol, genistein and curcumin / C. N. N'Soukroe-Kossi, P. Bourassa, J. S. Mandeville и др. // *J Photochem Photobiol B*. – 2015. – Т. 151. – С. 69-75.
307. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain / P. A. Loeffler, M. J. Cuneo, G. A. Mueller и др. // *BMC structural biology*. – 2011. – Т. 11. – С. 37.
308. Structure and dynamics of a nucleosome core particle based on Widom 603 DNA sequence / G. A. Armeev, A. V. Moiseenko, N. A. Motorin et al. // *Structure*. – 2025. – Vol. 33. – № 5. – P. 948-959.e5.
309. Structure of the H1 C-terminal domain and function in chromatin condensation. / H. J. Caterino TL // *Biochem Cell Biol*. – 2011. – Т. 89. – № 35-44.
310. Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain / M. Wells, H. Tidow, T. J. Rutherford и др. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Т. 105. – № 15. – С. 5762-5767.

311. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation / M. Jinek, F. Jiang, D. W. Taylor и др. // *Science*. – 2014. – Т. 343. – № 6176. – С. 1247997.
312. Studies of the Mechanism of Nucleosome Dynamics: A Review on Multifactorial Regulation from Computational and Experimental Cases / D. Shi, Y. Huang, C. Bai // *Polymers*. – 2023. – Т. 15. – Studies of the Mechanism of Nucleosome Dynamics. – № 7. – С. 1763.
313. Studying PAR-Dependent Chromatin Remodeling to Tackle PARPi Resistance / C. Andronikou, S. Rottenberg // *Trends in Molecular Medicine*. – 2021. – Т. 27. – № 7. – С. 630-642.
314. Survival and Evolution of CRISPR–Cas System in Prokaryotes and Its Applications / M. A. B. Shabbir, H. Hao, M. Z. Shabbir и др. // *Frontiers in Immunology*. – 2016. – Т. 7. – С. 375.
315. Synergistic lethality between PARP-trapping and alantolactone-induced oxidative DNA damage in homologous recombination-proficient cancer cells / H. Wang, S. Zhang, L. Song и др. // *Oncogene*. – 2020. – Т. 39. – № 14. – С. 2905-2920.
316. Synthesis of Veliparib Prodrugs and Determination of Drug-Release-Dependent PARP-1 Inhibition / M. Borgini, P. Wipf // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2023. – Т. 14. – № 5. – С. 652-657.
317. Synthetic Lethality in Cancer: Mechanistic and Therapeutic Insights into PARP Inhibitors, BRCA Mutations, and Homologous Recombination Deficiency (HRD). Synthetic Lethality in Cancer / S. Kumar. – 2025.
318. TP53 mutations in cancer: Molecular features and therapeutic opportunities / M. L. Tornesello // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2025. – Т. 55. – TP53 mutations in cancer. – № 1. – С. 1-11.
319. Take a break--resveratrol in action on DNA / S. A. Gatz, L. Wiesmuller // *Carcinogenesis*. – 2008. – Т. 29. – № 2. – С. 321-32.
320. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation / J. K. Litton, H. S. Rugo, J. Ettl и др. // *The New England Journal of Medicine*. – 2018. – Т. 379. – № 8. – С. 753-763.
321. Target motifs affecting natural immunity by a constitutive CRISPR-Cas system in *Escherichia coli* / C. Almendros, N. M. Guzmán, C. Díez-Villaseñor и др. // *PloS One*. – 2012. – Т. 7. – № 11. – С. e50797.
322. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy / H. Wang, M. Guo, H. Wei, Y. Chen // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2023. – Vol. 8. – Targeting p53 pathways. – № 1. – P. 1-35.
323. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy / H. Farmer, N. McCabe, C. J. Lord et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 434. – № 7035. – P. 917-921.
324. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae* / J. E. Babiarz, J. E. Halley, J. Rine // *Genes & Development*. – 2006. – Vol. 20. – № 6. – P. 700-710.

325. The BRCT domain of PARP1 binds intact DNA and mediates intrastrand transfer / J. Rudolph, U. M. Muthurajan, M. Palacio и др. // *Mol Cell*. – 2021. – Т. 81. – № 24. – С. 4994-5006 e5.
326. The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by PARP1 / A. Fischbach, A. Krüger, S. Hampp et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № 2. – P. 804-822.
327. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger / V. H. Eustermann S // *J Mol Biol*. – 2011. – Т. 407. – С. 149-170.
328. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. / N. P. Pavletich, K. A. Chambers, C. O. Pabo // *Genes & Development*. – 1993. – Vol. 7. – № 12b. – P. 2556-2564.
329. The Effect of Green and Black Tea Polyphenols on BRCA2 Deficient Chinese Hamster Cells by Synthetic Lethality through PARP Inhibition / S. Alqahtani, K. Welton, J. P. Gius и др. // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Т. 20. – № 6.
330. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle / S. P. Hergeth, R. Schneider // *EMBO Reports*. – 2015. – Т. 16. – The H1 linker histones. – № 11. – С. 1439-1453.
331. The PHD Finger: A Versatile Epigenome Reader / R. Sanchez, M.-M. Zhou // *Trends in biochemical sciences*. – 2011. – Т. 36. – The PHD Finger. – № 7. – С. 364-372.
332. The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction / M. F. Langelier, D. D. Ruhl, J. L. Planck и др. // *J Biol Chem*. – 2010. – Т. 285. – № 24. – С. 18877-87.
333. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential / P. Dumont, J. I.-J. Leu, A. C. Della Pietra et al. // *Nature Genetics*. – 2003. – Vol. 33. – № 3. – P. 357-365.
334. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage / J. M. Pascal // *DNA Repair*. – 2018. – Vol. 71. – P. 177-182.
335. The double face of the histone variant H3.3 / E. Szenker, D. Ray-Gallet, G. Almouzni // *Cell Research*. – 2011. – Т. 21. – № 3. – С. 421-434.
336. The dynamics and regulation of PARP1 and PARP2 in response to DNA damage and during replication / H. Zhang, S. Zha // *DNA repair*. – 2024. – Т. 140. – С. 103690.
337. The expanding universe of PARP1-mediated molecular and therapeutic mechanisms / D. Huang, W. L. Kraus // *Molecular Cell*. – 2022. – Т. 82. – № 12. – С. 2315-2334.
338. The histone variant H2A.Z in gene regulation / B. D. Giaimo, F. Ferrante, A. Herchenröther и др. // *Epigenetics & Chromatin*. – 2019. – Т. 12. – С. 37.
339. The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity / M. Brunelle, A. Nordell Markovits, S. Rodrigue и др. // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Т. 43. – № 20. – С. 9742-9756.

340. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly / K. Ahmad, S. Henikoff // *Mol. Cell.* – 2002. – T. 9. – № 6. – С. 1191-200.
341. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. / V. Schreiber, M. Molinete, H. Boeuf et al. // *The EMBO Journal.* – 1992. – Vol. 11. – № 9. – P. 3263-3269.
342. The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies / S. A. Verkuijl, M. G. Rots // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2019. – T. 55. – С. 68-73.
343. The mechanistic basis for chromatin regulation by pioneer transcription factors / M. Iwafuchi-Doi // *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine.* – 2019. – T. 11. – № 1. – С. e1427.
344. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling / A. Ray Chaudhuri, A. Nussenzweig // *Nature reviews. Molecular cell biology.* – 2017. – T. 18. – № 10. – С. 610-621.
345. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate / A. Hafner, M. L. Bulyk, A. Jambhekar, G. Lahav // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* – 2019. – Vol. 20. – № 4. – P. 199-210.
346. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix / G. Arents, R. W. Burlingame, B. C. Wang и др. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1991. – T. 88. – № 22. – С. 10148-52.
347. The pioneer transcription factor FoxA maintains an accessible nucleosome configuration at enhancers for tissue-specific gene activation / M. Iwafuchi-Doi, G. Donahue, A. Kakumanu и др. // *Molecular cell.* – 2016. – T. 62. – № 1. – С. 79-91.
348. The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells / N. Baptiste, P. Friedlander, X. Chen, C. Prives // *Oncogene.* – 2002. – T. 21. – № 1. – С. 9-21.
349. The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. / C. Venot, M. Maratrat, C. Dureau и др. // *The EMBO Journal.* – 1998. – T. 17. – № 16. – С. 4668-4679.
350. The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress: significance in tumorigenesis and cancer therapy / J. Zhang // *Cell & Bioscience.* – 2013. – Vol. 3. – The role of BRCA1 in homologous recombination repair in response to replication stress. – № 1. – P. 11.
351. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response / C. Liu, A. Vyas, M. A. Kassab et al. // *Nucleic Acids Research.* – 2017. – Vol. 45. – № 14. – P. 8129-8141.
352. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond / R. Barrangou // *Current Opinion in Immunology.* – 2015. – T. 32. – С. 36-41.

353. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function / S. Martire, L. A. Banaszynski // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2020. – Т. 21. – № 9. – С. 522-541.
354. The structure of DNA in the nucleosome core / T. J. Richmond, C. A. Davey // *Nature*. – 2003. – Т. 423. – № 6936. – С. 145-50.
355. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity / A. L. Okorokov, M. B. Sherman, C. Plisson и др. // *The EMBO journal*. – 2006. – Т. 25. – № 21. – С. 5191-200.
356. The transcriptional foundation of pluripotency / I. Chambers, S. R. Tomlinson // *Development (Cambridge, England)*. – 2009. – Т. 136. – № 14. – С. 2311-2322.
357. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. / M. Ikejima, S. Noguchi, R. Yamashita et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1990. – Vol. 265. – № 35. – P. 21907-21913.
358. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks / A. A. E. Ali, G. Timinszky, R. Arribas-Bosacoma et al. // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 19. – № 7. – P. 685-692.
359. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks / T. G. Ali AA // *Nat Struct Mol Bio*. – 2012. – Т. 19. – № 7. – С. 685-692.
360. Theranostic biomarkers and PARP-inhibitors effectiveness in patients with non-BRCA associated homologous recombination deficient tumors: Still looking through a dirty glass window? / L. Incurvaia, A. Perez, C. Marchetti et al. // *Cancer Treatment Reviews*. – 2023. – Vol. 121. – Theranostic biomarkers and PARP-inhibitors effectiveness in patients with non-BRCA associated homologous recombination deficient tumors. – P. 102650.
361. Therapeutic Targeting of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Cancer: Current Developments, Therapeutic Strategies, and Future Opportunities / J. Rajawat, N. Shukla, D. P. Mishra // *Medicinal Research Reviews*. – 2017. – Vol. 37. – Therapeutic Targeting of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Cancer. – № 6. – P. 1461-1491.
362. Transcriptional Regulation by P53 / R. Beckerman, C. Prives // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2010. – Т. 2. – № 8. – С. a000935.
363. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation / W. L. Kraus // *Curr Opin Cell Biol*. – 2008. – Т. 20. – № 3. – С. 294-302.
364. Transcriptional regulation mechanism of PARP1 and its application in disease treatment / Y. Lu, W. Fu, W. Xing и др. // *Epigenetics & Chromatin*. – 2024. – Т. 17. – № 1. – С. 26.
365. Transcriptional roles of PARP1 in cancer / M. J. Schiewer, K. E. Knudsen // *Molecular cancer research: MCR*. – 2014. – Т. 12. – № 8. – С. 1069-1080.
366. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors / J. Murai, S. N. Huang, B. B. Das и др. // *Cancer Research*. – 2012. – Т. 72. – № 21. – С. 5588-5599.

367. Tumor Suppressive Functions of p53 / J. T. Zilfou, S. W. Lowe // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2009. – Т. 1. – № 5. – С. a001883.
368. Tumor Suppressor p53: Biology, Signaling Pathways, and Therapeutic Targeting / L. J. H. Borrero, W. S. El-Deiry // Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer. – 2021. – Т. 1876. – Tumor Suppressor p53. – № 1. – С. 188556.
369. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome / R. D. Kornberg, Y. Lorch // Cell. – 1999. – Т. 98. – № 3. – С. 285-94.
370. Unraveling linker histone interactions in nucleosomes / F. Hao, S. Kale, S. Dimitrov, J. J. Hayes // Curr Opin Struct Biol. – 2021. – Т. 71. – С. 87-93.
371. Unraveling the Guardian: p53's Multifaceted Role in the DNA Damage Response and Tumor Treatment Strategies / H. Zhang, J. Xu, Y. Long et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – Unraveling the Guardian. – № 23. – P. 12928.
372. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning / B. Guillemette, A. R. Bataille, N. Gevry и др. // PLoS Biol. – 2005. – Т. 3. – № 12. – С. e384.
373. Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division / C.-M. Chow, A. Georgiou, H. Szutorisz и др. // EMBO reports. – 2005. – Т. 6. – № 4. – С. 354-360.
374. Veliparib for the treatment of solid malignancies / R. R. George, R. Thomas, A. Davice, M. S. Mathew // Journal of Oncology Pharmacy Practice: Official Publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners. – 2022. – Т. 28. – № 4. – С. 924-934.
375. Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial / V. Diéras, H. S. Han, B. Kaufman и др. // The Lancet. Oncology. – 2020. – Т. 21. – Veliparib with carboplatin and paclitaxel in BRCA-mutated advanced breast cancer (BROCADE3). – № 10. – С. 1269-1282.
376. Woods, D. C. Elucidating the influence of linker histone variants on chromatosome dynamics and energetics / D. C. Woods, J. Wereszczynski // Nucleic Acids Research. – 2020. – Vol. 48. – № 7. – P. 3591-3604.
377. Workman, J. L. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation / J. L. Workman, R. E. Kingston // Annual Review of Biochemistry. – 1998. – Т. 67. – С. 545-579.
378. Writing, erasing and reading histone lysine methylations / K. Hyun, J. Jeon, K. Park, J. Kim // Experimental & Molecular Medicine. – 2017. – Vol. 49. – № 4. – P. e324-e324.
379. [The Role of the WGR Domain in the Functions of PARP1 and PARP2] / N. V. Maluchenko, A. N. Korovina, A. A. Saulina и др. // Mol Biol (Mosk). – 2023. – Т. 57. – № 5. – С. 782-791.
380. dCas9: A Versatile Tool for Epigenome Editing / D. J. W. Brocken, M. Tark-Dame, R. T. Dame // Current Issues in Molecular Biology. – 2018. – dCas9. – P. 15-32.

381. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z / N. Gévry, H. M. Chan, L. Laflamme и др. // *Genes & Development*. – 2007. – Т. 21. – № 15. – С. 1869-1881.
382. p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State / S. Bell, C. Klein, L. Müller и др. // *Journal of Molecular Biology*. – 2002. – Т. 322. – № 5. – С. 917-927.
383. p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation / L. M. M. Jenkins, S. R. Durell, S. J. Mazur, E. Appella // *Carcinogenesis*. – 2012. – Т. 33. – p53 N-terminal phosphorylation. – № 8. – С. 1441-1449.
384. p53 binding sites in normal and cancer cells are characterized by distinct chromatin context / F. Bao, P. R. LoVerso, J. N. Fisk et al. // *Cell Cycle*. – 2017. – Vol. 16. – № 21. – P. 2073.
385. p53 binding to nucleosomal DNA depends on the rotational positioning of DNA response element / G. Sahu, D. Wang, C. B. Chen и др. // *J Biol Chem*. – 2010. – Т. 285. – № 2. – С. 1321-32.
386. p53 binding to nucleosomes within the p21 promoter in vivo leads to nucleosome loss and transcriptional activation / O. Laptenko, R. Beckerman, E. Freulich, C. Prives // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Т. 108. – № 26. – С. 10385-10390.
387. p53 binds preferentially to genomic regions with high DNA-encoded nucleosome occupancy / E. Lidor Nili, Y. Field, Y. Lubling et al. // *Genome Research*. – 2010. – Vol. 20. – № 10. – P. 1361-1368.
388. p53 can repress transcription of cell cycle genes through a p21WAF1/CIP1-dependent switch from MMB to DREAM protein complex binding at CHR promoter elements / M. Quaas, G. A. Müller, K. Engeland // *Cell Cycle*. – 2012. – Т. 11. – № 24. – С. 4661-4672.
389. p53 rapidly restructures 3D chromatin organization to trigger a transcriptional response / F. Serra, A. Nieto-Aliseda, L. Fanlo et al.
390. p53 rapidly restructures 3D chromatin organization to trigger a transcriptional response / F. Serra, A. Nieto-Aliseda, L. Fanlo-Escudero et al. // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 2821.
391. Связывание PARP1 с разрывами и шпильками на ДНК изменяет структуру нуклеосом / Н. В. Малюченко, Е. Ю. Котова, М. П. Кирпичников и др. // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. – 2019. – Т. 74. – № 3. – С. 200-206.