

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кошкина Дарья Олеговна

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

Специальность 1.1.10 Биомеханика и биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Малюченко Наталия Валериевна**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Киреев Игорь Игоревич**
доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, отдел электронной микроскопии, заведующий отделом

Варижук Анна Михайловна
доктор химических наук, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, лаборатория структуры и функций биополимеров, заведующий лабораторией

Абашкин Дмитрий Антонович
кандидат биологических наук, Российский научный центр психического здоровья, Институт биологической психиатрии, лаборатория клинической генетики, научный сотрудник

Защита диссертации состоится 24 июня 2026 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.10 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3967>

Автореферат разослан «__» мая 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Д.В. Чистяков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Основная структурная единица хроматина – нуклеосома, представляющая собой октамер положительно заряженных гистонов, вокруг которого на ~1,65 витка обернута ДНК. Такая организация обеспечивает компактизацию генома при сохранении его функциональности за счет хроматин-ассоциированных регуляторных белков, включая пионерные факторы – транскрипционные факторы, способные связываться с неактивным хроматином и открывать ранее недоступные участки ДНК. Изучение пионерных свойств белков является актуальной задачей биоинженерии, поскольку именно они обеспечивают доступ регуляторных и редактирующих систем к конденсированному геному, включая транскрипционный аппарат, эпигенетические регуляторы и инструменты геномного редактирования.

PARP1 (поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1) традиционно рассматривают как сенсор разрывов ДНК, обладающий высокой аффинностью к одно- и двунитевым повреждениям. PARP1 катализирует синтез поли(АДФ-рибозы), которая служит сигналом для привлечения факторов репарации. Данный механизм является основой разработки таргетных препаратов – ингибиторов PARP (PARPi), которые более 10 лет применяются для лечения ряда раков, ассоциированных с дефектами в системе репарации гомологичной рекомбинации. Однако их долгосрочное использование сталкивается с двумя основными проблемами: развитием резистентности и значительной токсичностью. Это существенно ограничивает применение существующих препаратов. В связи с этим актуален поиск новых химических соединений с более благоприятным профилем безопасности при сохранении или усилении терапевтического эффекта.

В последние годы появляются данные, что PARP1 способен связываться с неповрежденной ДНК, а также с рядом ядерных факторов и хроматин-связывающих белков, влияя на транскрипционные программы клетки. Эта способность позволяет рассматривать PARP1 как белок с пионероподобной активностью, инициирующей локальные перестройки хроматина, обеспечивающие доступ к нуклеосомной ДНК и последующее связывание ключевых транскрипционных факторов. 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. Отсутствие доступа CRISPR/dCas к целевым участкам плотно упакованной хроматиновой ДНК является одним из ключевых ограничений геномного и эпигеномного редактирования. Хроматин-реорганизующая активность PARP1 потенциально может способствовать преодолению этого ограничения.

Особое значение имеет взаимодействие PARP1 с p53: за счет прямого поли(АДФ-рибозил)ирования, опосредованных контактов и изменения хроматинового окружения PARP1 влияет на активность p53 и, как следствие, на выбор клеточной судьбы после повреждения ДНК. 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

Проблемы организации хроматина и роль пионерных факторов подробно рассмотрены в работах отечественных и зарубежных исследователей. Исследования R.D. Kornberg, C. Wu, K. Luger, В.М. Студитского и др. сформировали современные представления о нуклеосоме как базовой структурной единице хроматина и механизмах упаковки генома и регуляции доступа белков к ДНК. Существенный вклад в изучение пионерных транскрипционных факторов внесли работы D. Reinberg, S. Yamanaka, A. Young и др., где показана их способность связываться с закрытым хроматином и инициировать его локальную перестройку.

В последние годы появились данные о наличии у PARP1 пионероподобных свойств, однако эта функция остаётся недостаточно изученной. Показано, что PARP1 связывается с неповреждённой ДНК и функционально взаимодействует с p53, модифицируя его посредством поли(АДФ-рибозил)ирования и влияя на стабильность, ДНК-связывание и транскрипционную активность. Вместе с тем молекулярные механизмы пионерной активности PARP1 на уровне нуклеосомы и особенности его взаимодействия с p53 в хроматине различной структуры остаются неясными.

В отличие от этого, классическая роль PARP1 как сенсора разрывов ДНК изучена более детально: охарактеризованы механизмы активации фермента и принципы действия ингибиторов PARP, включая подавление каталитической активности и стабилизацию комплекса PARP1–ДНК («траппинг»), что стало основой разработки клинических препаратов. При этом сохраняется необходимость поиска соединений с более благоприятным профилем безопасности; в этом контексте интересен ресвератрол — полифенольное соединение с противоопухолевой активностью, способное взаимодействовать с ДНК и потенциально модулировать активность PARP1.

Отдельный интерес представляет использование пионерной активности PARP1 для повышения эффективности CRISPR/Cas-систем. Одним из ключевых ограничений этих технологий является низкая доступность плотно упакованных участков хроматина. Способность PARP1 вызывать локальную декомпактизацию ДНК может повышать эффективность таргетирования CRISPR/dCas-комплексов и расширять круг доступных геномных локусов, открывая дополнительные возможности для 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

В работе впервые показано, что PARP1 обладает выраженной нуклеосом-реорганизующей активностью: он перестраивает нуклеосому по всей длине ДНК, включая коровую и линкерную области, при этом эффект не зависит от нуклеотидной последовательности, набора посттрансляционных модификаций гистонов и наличия линкерной ДНК. Установлено, что PARP1 способен вытеснять линкерный гистон H1.0 из реконструированных хроматосом даже при отсутствии каталитической активности, а эффективность этого процесса определяется длиной линкера, что подчеркивает критическую роль структурного контекста хроматина в регуляции пионерной функции PARP1. Показано, что PARP1 повышает доступность нуклеосомной ДНК для связывания регуляторных белков, включая p53DBD и dCas-системы, а разработанная нуклеосомная платформа позволила впервые провести прямую сравнительную оценку механизмов действия ингибиторов PARP и продемонстрировать траппинг PARP1 олапарибом и талазопарибом, а также выявить и охарактеризовать ингибирующую активность природного соединения ресвератрола в отношении PARP1.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в раскрытии механизма пионерной функции PARP1: показано, что он универсально реорганизует нуклеосомную структуру и обеспечивает доступ к ДНК независимо от гистонового состава, выступая ключевым фактором АТФ-независимого ремоделинга. Впервые продемонстрирована кооперация PARP1 с p53, чувствительная к структурному состоянию хроматина, что углубляет понимание регуляции транскрипционного ответа на стресс. Практическая значимость определяется разработкой простой контролируемой *in vitro*-платформы на основе позиционированных нуклеосом и их комплексов с PARP1, пригодной для скрининга и сравнительной оценки ингибиторов PARP и других малых молекул до перехода к клеточным и *in vivo* моделям. Показано, что универсальная пионерная активность PARP1 может быть использована для предварительной реорганизации компактного хроматина и

повышения эффективности CRISPR/dCas-конструктов при эпигенетическом редактировании и модуляции экспрессии генов, что открывает путь к преодолению ограничения генной терапии, связанного с низкой доступностью мишеней в нуклеосомной ДНК.

Методология и методы исследования.

В работе применяли современные методы молекулярной биологии, биохимии и биоинженерии с использованием *in vitro* систем и реконструированных нуклеопротеиновых комплексов. Структурно-функциональные характеристики анализировали с помощью флуоресцентных подходов, электрофореза, конфокальной микроскопии и других общепринятых воспроизводимых методов с необходимыми контролями.

Положения, выносимые на защиту

1. PARP1 реорганизует нуклеосомы по всей длине ДНК, действуя независимо от состава гистонового кодра, 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 аффиность 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. 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 диссертационной работы получены автором лично. Вклад включает анализ литературы, постановку и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию данных, подготовку публикаций и представление результатов на конференциях. В работе Koshkina et al. (Biomolecules, 2024) автор участвовал в разработке экспериментального дизайна по изучению влияния ресвератрола на связывание PARP1 с нуклеосомами и его каталитическую активность, выполнил вестерн-блот анализ, спектроскопическое исследование ресвератрола и интерпретацию данных. В работе Koshkina D.O. et al. (Cells, 2025) автор спланировал и провел эксперименты по изучению H1-подобного связывания PARP1 с нуклеосомами и хроматосомами, включая подготовку образцов с различной конфигурацией флуорофоров, проведение биохимических и биофизических исследований и анализ результатов. В работе Кошкина Д.О. и соавт. (Вестник МГУ, серия 16, 2025) автором предложена концепция PARP1-опосредованных изменений нуклеосомы при участии p53; выполнены постановка экспериментов, подготовка образцов, исследование взаимодействия белков, анализ результатов и написание статьи. В работе Maluchenko et al. (Cells, 2022) автор участвовал в подготовке белковых и нуклеосомных образцов, проведении экспериментов, статистической обработке и обсуждении результатов. В работах Лобанова А.А. и соавт. (Вестник МГУ, серия 16, 2024, 2025) автор участвовал в разработке и оптимизации методов анализа активности PARP1/2, включая гель-электрофорез для классификации ингибиторов и подход к регистрации связывания PARP1 в реальном времени, а также в интерпретации результатов. В работе Малюченко Н.В. и соавт. (Acta Naturae, 2021) автор участвовал в анализе литературы и подготовке текста, а также внес вклад в развитие представлений о механизмах поли(АДФ-рибозил)ирования.

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.

Апробация работы

Апробация результатов диссертационной работы проводилась на международных и всероссийских конференциях, симпозиумах и научных школах. Основные результаты, посвящённые PARP1-зависимым изменениям структуры нуклеосом, взаимодействию PARP1 и p53, роли гистоновых вариантов и разработке ингибиторов PARP на нуклеосомных моделях, представлены в виде устных и стендовых докладов на профильных конференциях, включая «Биохимическая физика» (Москва, 2019, 2025), Всероссийские конференции по молекулярной онкологии (2019–2024), а также междисциплинарные конференции по химии и фармакологии (2020, 2025) и ряд других российских форумов.

Результаты работы также докладывались на международных конференциях, в том числе BGRS/SB (Новосибирск, 2022, 2024), RICCEM (2020–2025), FEBS и IUBMB–FEBS–PABMB (2019, 2022), а также на специализированных конференциях в области наноматериалов, биоинформатики и структурной биологии (Париж, Санкт-Петербург, Шэньчжэнь, Турция, 2020–2024).

Отдельные результаты, касающиеся роли линкерных гистонов, spFRET-анализа взаимодействий и разработки тест-систем для изучения ингибиторов PARP, представлены на российских конференциях и научных школах, включая «Ломоносов», «Ломоносовские чтения», «Future of Biomedicine» и Фестиваль науки «НАУКА 0+» (2018–2025).

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка сокращений, списка литературы, включающего 391 наименование. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 54 рисунка и 3 таблицы.

Основное содержание работы

Материалы и методы

Модельными объектами служили нуклеосомы с каноническим октамером гистонов человека и октамером с заменой H2A на вариант H2A.Z, а также донорный хроматин эритроцитов цыпленка (*Gallus gallus*), лишенный линкерных гистонов.

Нуклеосомы реконструировали на ДНК с нуклеосом-позиционирующими последовательностями Widom 603 и 601, а также модифицированной 603, содержащей сайт связывания p53. В качестве минимальной модели специфического взаимодействия использовали ДНК-связывающий домен p53 (p53DBD), отвечающий за распознавание консенсусных последовательностей; Для регистрации конформационных изменений методом spFRET вносили пары меток Cy3/Cy5 в коровую и линкерную области нуклеосомной ДНК (рис. 1). В работе использовали методики вестерн-блота, spFRET и гель-шифт-анализа для изучения взаимодействия и белков PARP1, p53DBD и dCas с нуклеосомами.

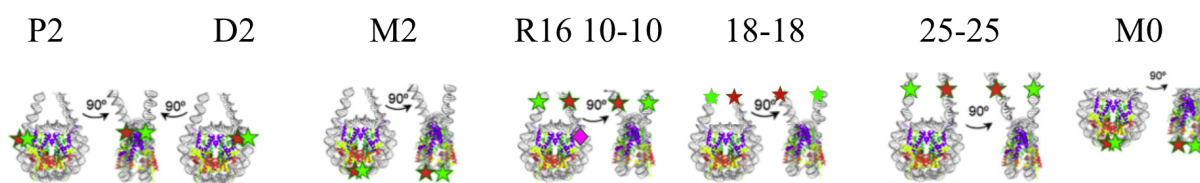


Рисунок 1 – Схематическое изображение расположения меток в разных типах нуклеосом, используемых в работе

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.

Результаты и обсуждение

1. Влияние PARP1 на структуру нуклеосом

1.1 PARP1 реорганизует структуру нуклеосом, образуя с ними три типа комплексов

Гель-шифт анализ выявил концентрационно-зависимое образование трех типов комплексов PARP1 с нуклеосомами донорного хроматина (рис. 2 Д), соответствующих стехиометрии 1:1, 2:1 и 3:1 (PARP1:нуклеосома).

По данным spFRET, нуклеосомы с метками в коровой области характеризуются двумя субпопуляциями: основной с высокими значениями E_{PR} ($>0,7$), соответствующей

компактным частицам, и минорной с низкими E_{PR} (~ 0), отражающей частично развернутые нуклеосомы и свободную ДНК. Для нуклеосом с метками в линкерной ДНК наблюдается обратное распределение: преобладает субпопуляция с низкими E_{PR} , тогда как минорная располагается в области средних значений.

Связывание первой молекулы PARP1 (при 10 нМ) вызывает незначительные структурные изменения, тогда как присоединение второй и третьей молекул (20–40 нМ) приводит к выраженной реорганизации, включая сближение линкерных участков и перестройку коровой области по всей длине ДНК (рис. 2 А-Г). В совокупности с литературными данными это указывает, что две молекулы PARP1 взаимодействуют с концами ДНК через цинковые пальцы и слабо влияют на структуру, тогда как третья, вероятно, связывается с кором нуклеосомы и индуцирует основные структурные изменения.

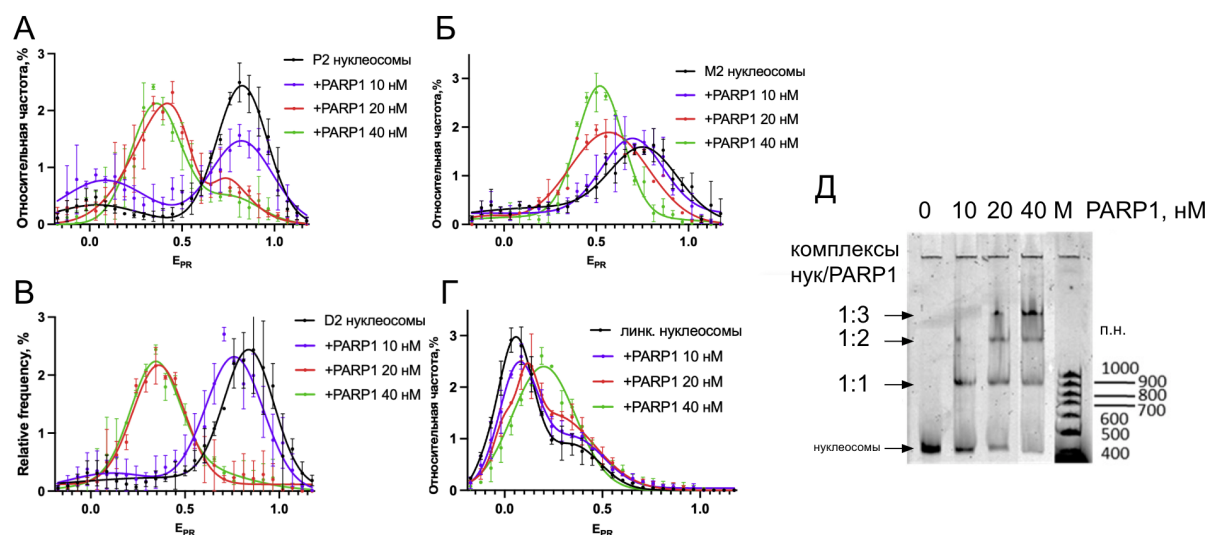


Рисунок 2 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом, собранных на донорном хроматине

Источник: из авторского исследования (Koshkina D. и др., 2025). Примечание: А-Г Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Нуклеосомы, содержали Cy3/Cy5 метки в положениях: (А) P2 +13/+91, (Б) M2 +35/+112, (В) D2 +57/+135, (Г) линк (-18/-18); (Д) Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-PARP1 при различных концентрациях PARP1.

Для анализа факторов, влияющих на PARP1-зависимую реорганизацию хроматина, использовали несколько моделей нуклеосом: (1) на основе Widom 603 и

рекомбинантных гистонов человека без ПТМ — для оценки роли ПТМ (рис. 3 А,Г); (2) на Widom 601 — для анализа влияния ДНК-последовательности (рис. 3 Б,Д); (3) без линкерной ДНК — для оценки вклада линкерных участков (рис. 3 В,Е). Показано, что реорганизация нуклеосомы под действием PARP1 не зависит ни от НПП, ни от наличия линкеров. Сопоставление данных (рис. 2 и 3) также демонстрирует, что источник гистонов (*Gallus gallus* vs *Homo sapiens*) и наличие ПТМ (донорный хроматин vs рекомбинантные белки) не влияют на характер структурных изменений.

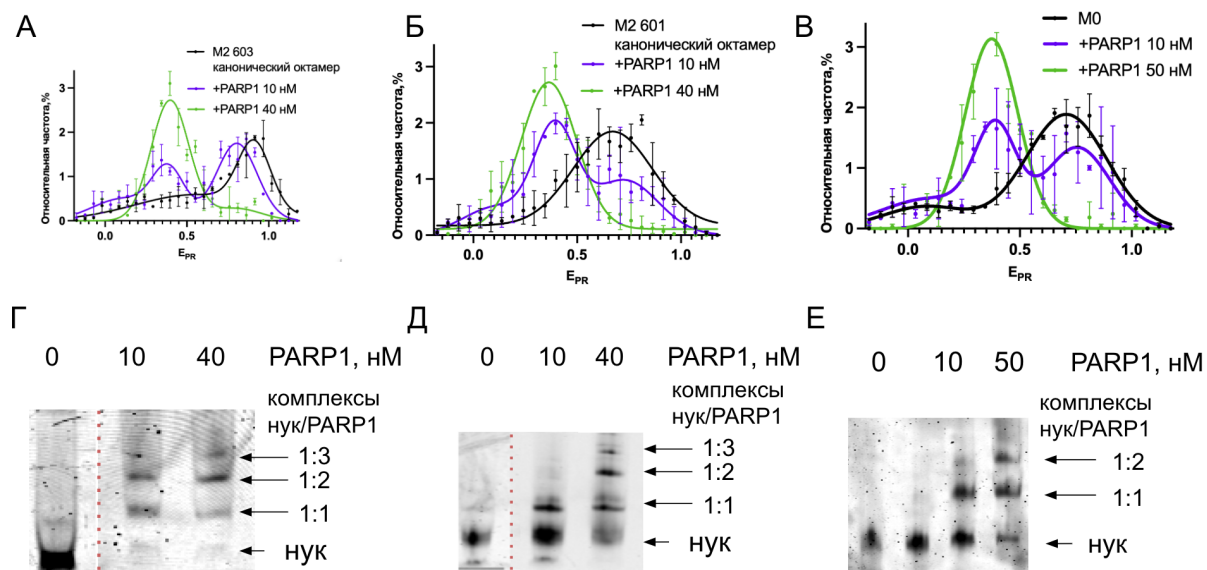


Рисунок 3 – Влияние PARP1 на структуру нуклеосом без посттрансляционных модификаций в гистоновом октамере

Источник: получено автором. Примечание: А, Б, В – частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET (E_{PR}) в присутствии различных концентраций PARP1. Г, Д, Е – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-PARP1.

Таким образом, было показано, что белок PARP1 реорганизует структуру нуклеосом по всей длине ДНК вне зависимости от источника гистонного кода, набора посттрансляционных модификаций, наличия линкерных участков, а также нуклеотидной последовательности ДНК, проявляя тем самым пионерподобные свойства регуляторных белков хроматина. Полученные данные свидетельствуют о том, что реорганизацию внутренней структуры нуклеосомы вызывает именно прямое связывание PARP1 с самой нуклеосомой, а не с концевыми участками нуклеосомной ДНК.

2. Взаимодействие PARP1 с нуклеосомами в различных структурных состояниях хроматина

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

2.1 PARP1-опосредованная реорганизация H1.0-содержащих хроматосом и H2A.Z-содержащих нуклеосом.

С учетом способности PARP1 реорганизовывать нуклеосомы, были изучены его эффекты на хроматосомах, содержащих линкерный гистон H1.0, характерный для транскрипционно неактивного хроматина. Связывание H1.0 (10 нМ) вызывало сближение линкерных участков ДНК (рис. 4 А). Добавление PARP1 приводило к вытеснению H1.0 даже в отсутствие НАД⁺, что сопровождалось изменением E_{PR} с $\sim 0,1$ до $\sim 0,43$, соответствующего комплексу нуклеосома–PARP1 (рис. 4 А). Однако при удлинённых линкерных участках (40 п.н.) PARP1 не вытеснял H1.0 (рис. 4 Б), вероятно вследствие более стабильного связывания гистона через его С-концевой домен.

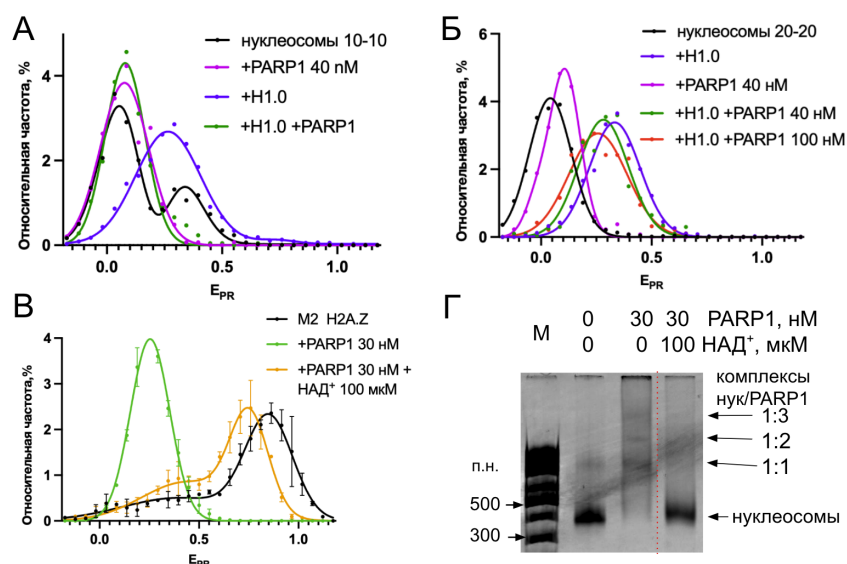


Рисунок 4 – Регуляция PARP1 структурой нуклеосом в разных транскрипционных состояниях

Источник: составлено на основе авторского исследования (Koshkina D. и др., 2025).

Примечание: А – Анализ комплексов H1.0 с нуклеосомами 18-18 с помощью spFRET-микроскопии и конкуренция между H1.0 и PARP1 за связывание с нуклеосомами. Б – Анализ комплексов H1.0 с нуклеосомами 25-25 с помощью spFRET-микроскопии и конкуренция между H1.0 и PARP1 за связывание с нуклеосомами. В – Частотные распределения нуклеосом, содержащих метки в положении M2 +35/+112, по эффективности FRET в присутствии PARP1 и НАД⁺. Г – 4 % нативный ПААГ комплексов нуклеосома PARP1 в отсутствии и присутствии НАД⁺.

H2A.Z-содержащие нуклеосомы при взаимодействии с 40 нМ PARP1 демонстрировали более выраженную реорганизацию коровой области по сравнению с каноническими нуклеосомами (E_{PR} ~0,25 против ~0,4; рис. 4В). Добавление 100 мкМ НАД⁺ в значительной степени восстанавливало исходную структуру, что также было показано на нуклеосомах, содержащих канонический октамер гистонов. Данные ГШ-анализа подтверждают более эффективное образование комплексов H2A.Z-нуклеосома–PARP1 по сравнению с каноническими нуклеосомами (рис. 2 Д, 4 Г).

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

Пионерная функция PARP1, заключающаяся в облегчении доступа к хроматину, была экспериментально доказана для двух различных факторов: для экзогенного эпигенетического редактора (dCas9) и эндогенного фактора транскрипции (p53).

3.1 Влияние p53 на структуру нуклеосом в различных структурных состояниях

Для изучения взаимодействия p53 с нуклеосомами использовали конструкции с сайтом связывания в коровой области и метками в линкерной ДНК (R16 10–10). По данным spFRET интактные нуклеосомы представлены двумя субпопуляциями: с низкими ($E_{PR} \sim 0$) и средними ($E_{PR} \sim 0,5$) значениями. 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. Добавление 400 нМ p53DBD вызывало частичный сдвиг в область низких E_{PR} , соответствующий расхождению флуорофоров (рис. 5 А), а при 1200 нМ наблюдалась полная дестабилизация с увеличением расстояния между линкерами. Гель-шифт анализ показал образование комплекса в стехиометрии 1:1 (рис. 5 Б), что согласуется с литературными данными о дозозависимом эффекте p53.

Наличие линкерного гистона H1.0 не препятствовало связыванию p53DBD: при 1,200 нМ происходила реорганизация линкерной области и формирование комплекса 1:1.

H2A.Z-содержащие нуклеосомы проявляли повышенную чувствительность к p53DBD: стабильный комплекс формировался при концентрации, примерно на треть ниже, чем для канонических нуклеосом (рис. 5 Е, 5 Б), сопровождаясь выраженной реорганизацией линкерной ДНК по данным spFRET (рис. 5 Д).

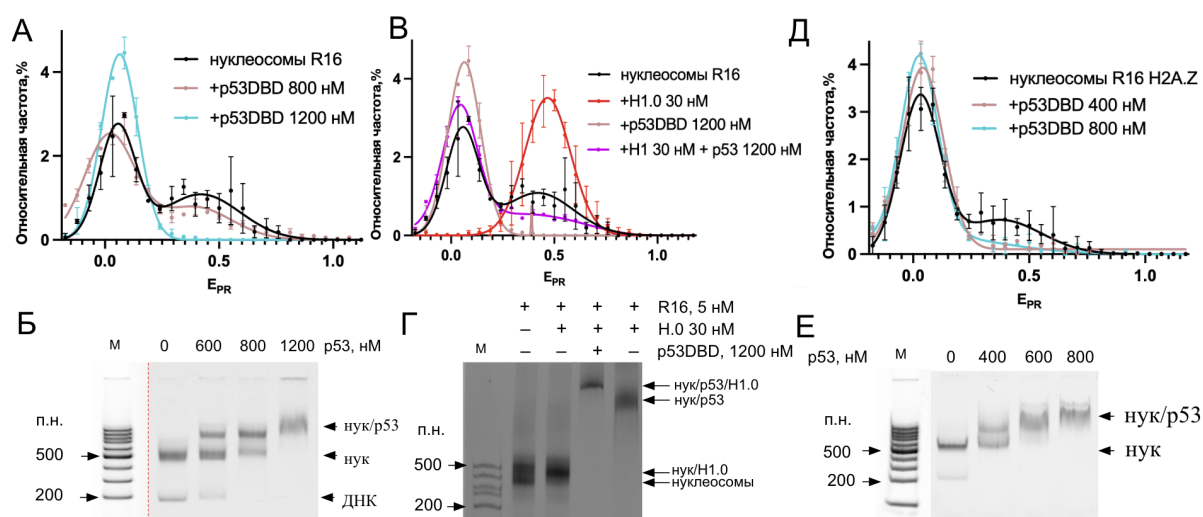


Рисунок 5 – p53 вызывает расхождение участков линкерной ДНК нуклеосомы

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии p53DBD. Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосома-p53DBD.

Полученные данные позволяют заключить, что p53DBD проявляет свойства, характерные для пионерного фактора, однако полная реорганизация хроматина на нуклеосомном и хроматосомном 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.

3.2 Совместное влияние p53 и PARP1 на нуклеосомы

В работе показано, что PARP1 и p53 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. Также показано, что PARP1 и p53 в клетке тесно взаимодействуют, однако, остается неясным, происходит ли кооперация или конкуренция между этими белками при их связывании с нуклеосомами. Одновременное взаимодействие p53 и PARP1 с нуклеосомой вызывает возникновение отдельных комплексов (рис. 6 Б), что на частотном распределении по эффективности FRET проявляется как один пик с максимумом между значениями, соответствующими отдельным комплексам с p53 и PARP1 (рис. 6 А).

Согласно литературным данным, p53 и PARP1 функционально связаны через поли(АДФ-рибозил)ирование. Хотя большинство сайтов модификации p53 расположены в его С-концевом домене (отсутствующем в используемом нами фрагменте), ДНК-связывающий домен (DBD) также содержит потенциальные сайты поли(АДФ-рибозил)ирования, что позволило оценить влияние ферментативной активности PARP1 на связывание p53DBD с нуклеосомой. Добавление НАД⁺ к комплексу нуклеосома-PARP1 приводит к авто-поли(АДФ-рибозил)ированию и диссоциации PARP1, однако при добавлении к этой реакции p53DBD часть p53DBD остаётся связанной с нуклеосомой (рис. 6 В). Образующиеся отрицательно заряженные поли(АДФ-рибоз)ные цепи, вероятно, электростатически притягивают p53DBD и перераспределяют его между свободным и нуклеосом-связанным состояниями. Данные вестерн-блоттинга с антителами к поли(АДФ-рибозе) показывают модификацию только PARP1 (рис. 6 Г), что, по-видимому, связано с преобладанием отдельных комплексов и пространственной недоступностью p53DBD для модификации.

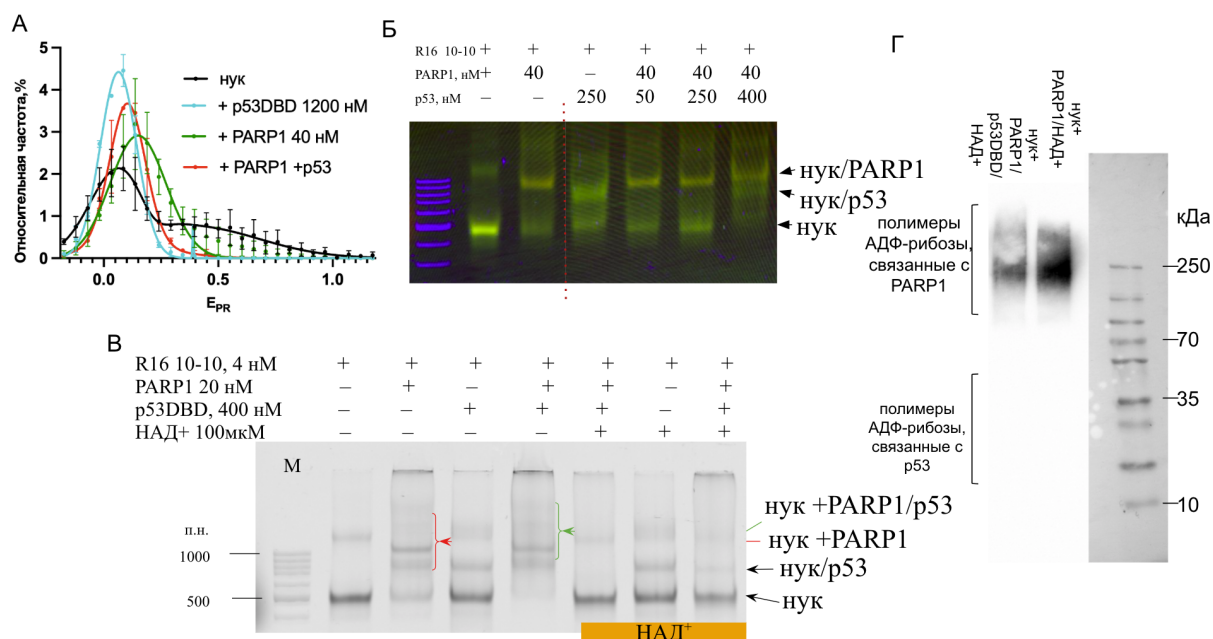


Рисунок 6 – Совместное влияние p53 и PARP1 на структуру нуклеосом

Источник: получено автором. Примечание: А – Частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET в присутствии p53DBD и PARP1 Б – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом-р53DBD-PARP1. В – Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом с белками PARP1 и p53DBD до и после обработки НАД⁺. Г – Вестерн-блот с использованием антител к полимерам АДФ-рибозы.

Замена канонического гистона H2A на его вариантную форму H2A.Z изменяет характер комплексообразования p53 и PARP1 с нуклеосомой. При их совместном взаимодействии с нуклеосомой формируется тройной комплекс нуклеосом-PARP1-p53, который частично распадается при добавлении в реакционную смесь НАД⁺ (рис. 7). Поли(АДФ-рибозил)ирование также вызывает диссоциацию PARP1 от нуклеосомы, однако p53 остаётся связанным с ней.

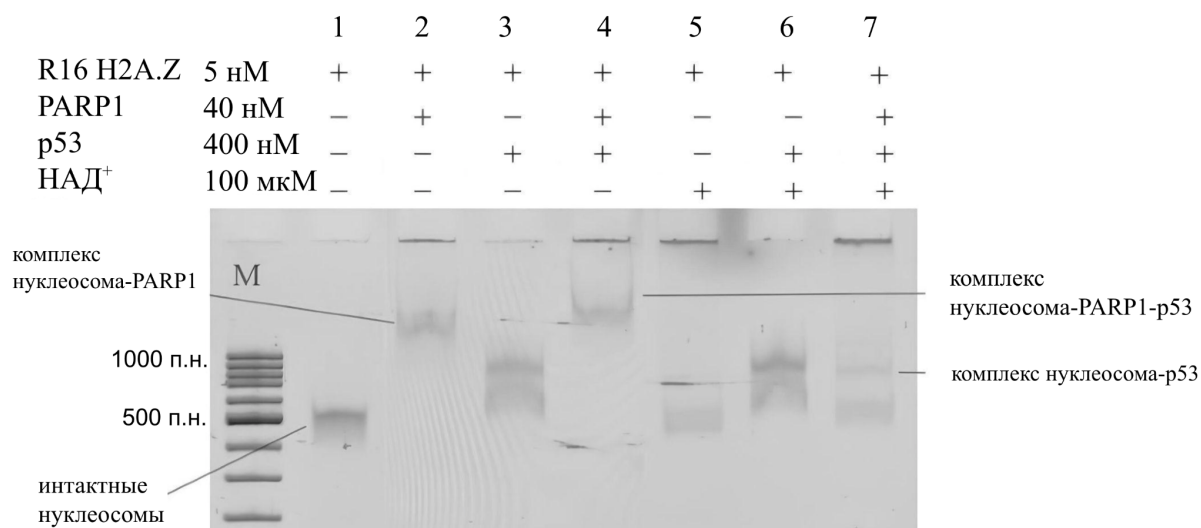


Рисунок 7 – p53 и PARP1 формируют мультимолекулярный комплекс с H2A.Z-содержащими нуклеосомами

Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов H2A.Z-содержащих нуклеосом с белками PARP1 и p53DBD в присутствии и отсутствии НАД⁺.

Обнаруженная повышенная эффективность реорганизации H2A.Z-нуклеосом закономерна, так как этот вариант гистона стабилизирует открытые, динамичные конформации хроматина, что облегчает связывание транскрипционных факторов. Важно отметить, что только в системе с H2A.Z удалось зарегистрировать формирование ранее не наблюдавшегося стабильного мультимолекулярного комплекса нуклеосома–PARP1–p53DBD. При этом PARP1 диссоциирует в ауто-модифицированной форме, в то время как p53DBD остается прочно ассоциированным с нуклеосомой. Нуклеосомы, содержащие канонический октамер гистонов в меньшей степени связывают p53DBD при наличии PARP1 в сравнении с H2A.Z-содержащими нуклеосомами.

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

В работе использовали систему CRISPR/dCas9 — каталитически инактивированную Cas9, направляемую sgRNA и способную специфически связываться с ДНК без внесения разрывов. sgRNA была нацелена на последовательность в коровой области нуклеосомы, недоступной для dCas9 из-за стерического барьера гистонического октамера. Показано, что в присутствии PARP1 уже при 20 нМ происходит реорганизация нуклеосомы, обеспечивающая доступ к ранее скрытому участку ДНК и эффективное связывание dCas9 (рис. 8).

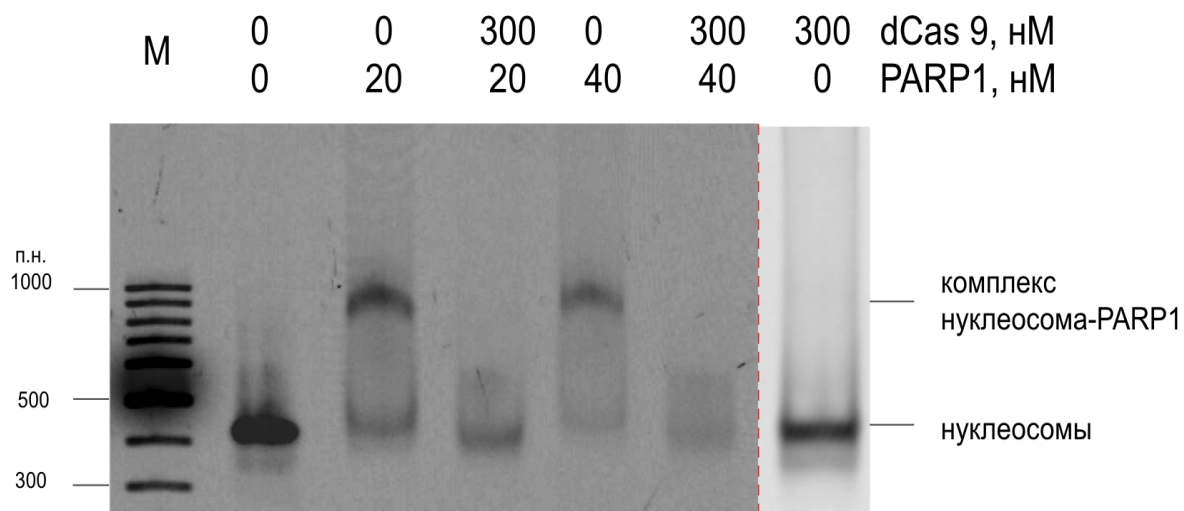


Рисунок 8. Влияние PARP1 на связывание комплекса dCas9:sgRNA с нуклеосомой
 Источник: получено автором. Примечание: Электрофореграмма (4% нативный ПААГ) комплексов нуклеосом с PARP1 (20 и 40 нМ) и/или dCas9:sgRNA (300 нМ), содержащей сайт связывания в области диады.

Таким образом, выявленная способность PARP1 реорганизовывать коровую часть нуклеосомы открывает перспективу его практического применения в прикладных задачах биоинженерии в качестве пионерного фактора для систем dCas.

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

Для исследования были выбраны клинически одобренные PARP-ингибиторы олапариб и талазапариб, а также находящийся на стадии доклинических испытаний велипариб. Эти соединения различаются по химической структуре, влиянию на каталитическую активность PARP и способности индуцировать траппинг фермента в хроматине. Несмотря на признание траппинга PARP1 ключевым механизмом действия PARPi, его реализация на уровне нуклеосом остается недостаточно изученной.

Показано, что при концентрациях олапариба 0.1–10 мкМ PARP1 связывается с нуклеосомами со стехиометрией 1:3 (нуклеосома:PARP1). В присутствии НАД⁺ ингибирующий эффект проявляется уже при 1 мкМ: PARP1 утрачивает способность к диссоциации от нуклеосомы, что свидетельствует о реализации траппинга (рис. 9).

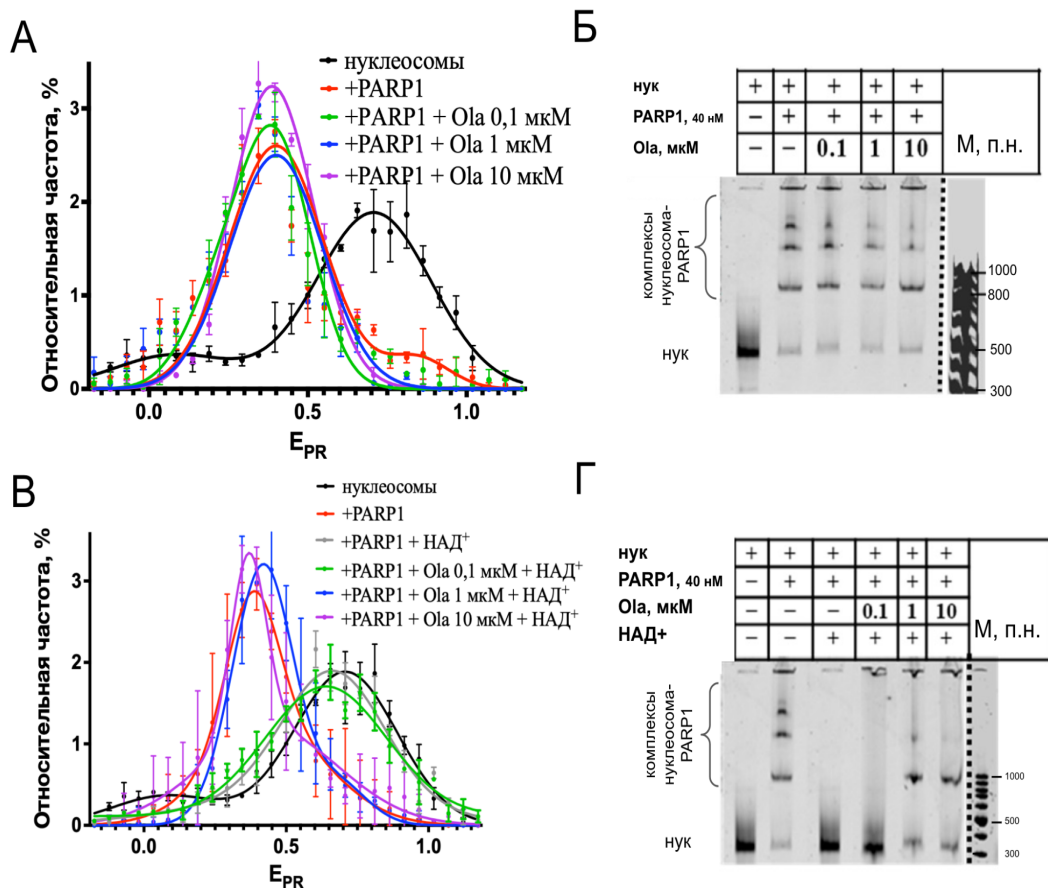


Рисунок 9. Влияние Олапариба (Ola) на эффективность образование комплексов нуклеосома–PARP1 и ингибирование PARP1

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.

В присутствии талазопариба от 0.1 до 10 мкМ, PARP1 также эффективно связывается с нуклеосомами (рис. 10 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. 10 В, Г).

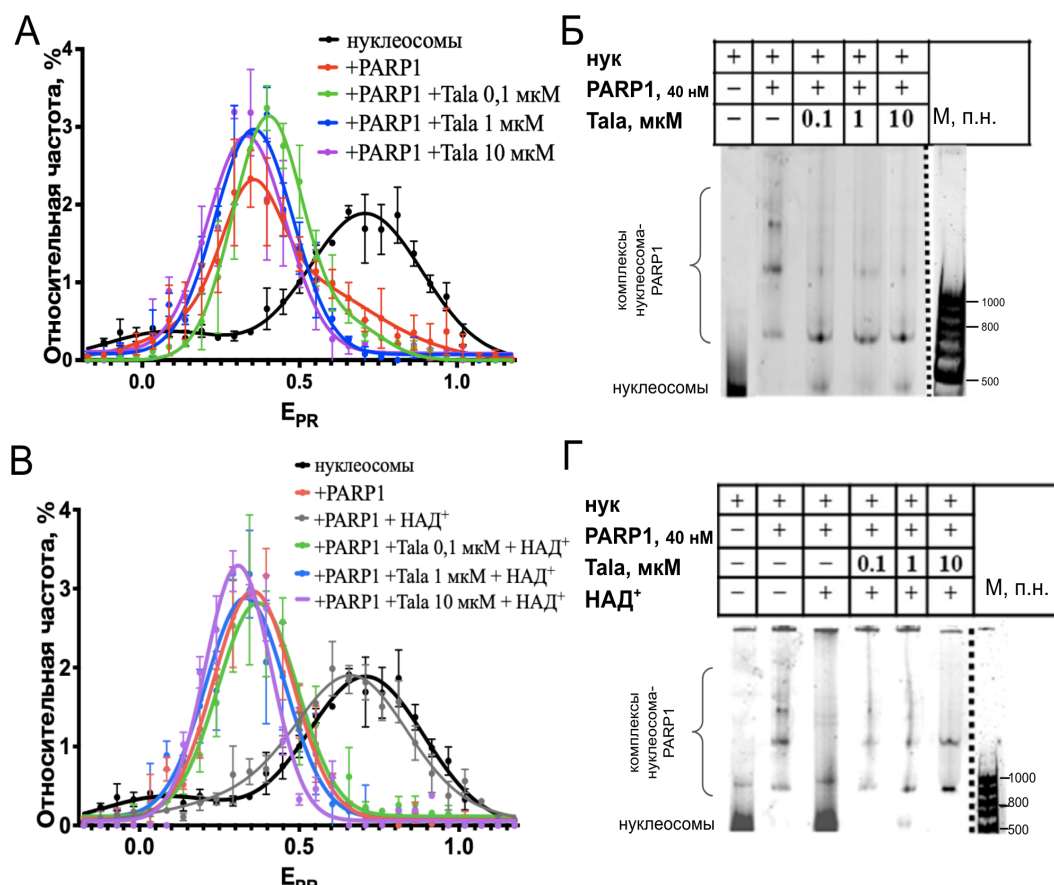


Рисунок 10. Влияние талазопариба (Tala) на эффективность образования комплексов нуклеосома-PARP1 и ингибирование PARP1

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.

В присутствии от 0.1 до 10 мкМ велипариба PARP1 эффективно связывается с нуклеосомами, сохраняя паттерн с характерной стехиометрией 1:3 (нуклеосома:PARP1) (рис. 11 А, Б). В отличие от талазапариба и олапариба, 10 мкМ велипариба в присутствии 100 мкМ НАД⁺ слабее сохраняет PARP1 в комплексах с нуклеосомами и значительная часть нуклеосом диссоциирует, что соответствует описываемому в литературе эффекту велипариба на клетках (рис. 11 В, Г).

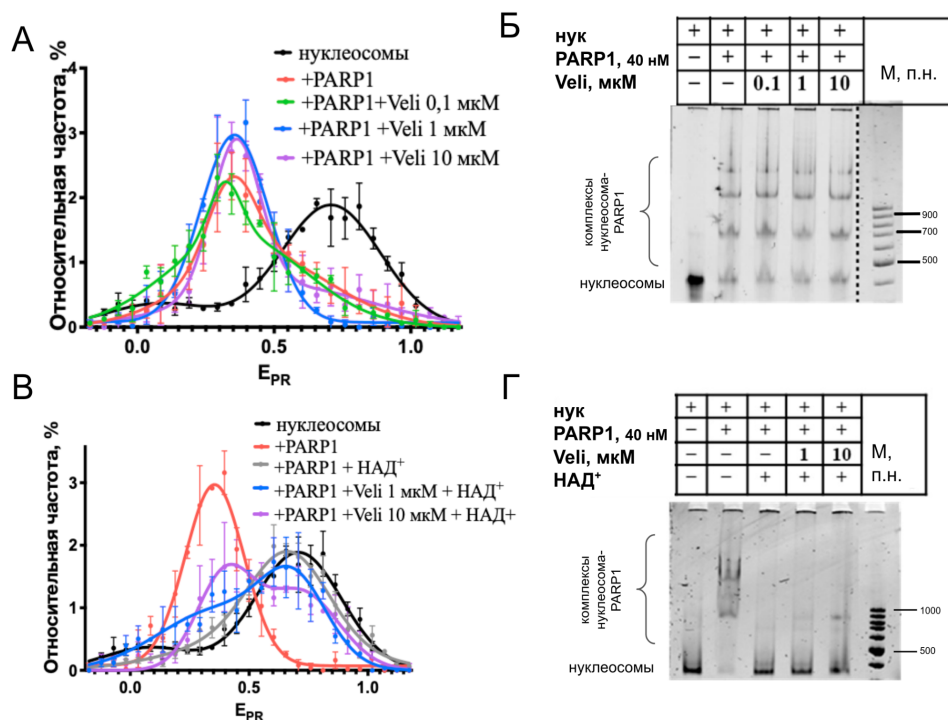


Рисунок 11. Влияние Велипариба (Veli) на эффективность образование комплексов нуклеосома–PARP1 и ингибирование PARP1

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.

В работе для анализа механизма действия PARP-ингибиторов использовали моонуклеосомы как модельную систему. Показано, что эффективность траппинга PARP1 (по степени его задержки на нуклеосомах) возрастает в ряду: талазопариб > олапариб >> велипариб, что соответствует данным клеточных экспериментов. Траппинг обусловлен сочетанием двух механизмов: усилением аффинности PARP1 к ДНК и подавлением авто-поли(АДФ-рибозил)ирования. Эти результаты согласуются с ранее предложенными моделями и демонстрируют, что нуклеосомы позволяют отдельно оценивать как ингибирование каталитической активности, так и способность индуцировать захват фермента в хроматине. С использованием данного подхода также исследована способность ресвератрола ингибировать PARP1.

5. Ингибирующая PARP1 активность ресвератрола

В присутствии ресвератрола ослабляется связывание PARP1 с нуклеосомами, при этом максимальный эффект наблюдается при 1 мкМ по данным spFRET и ГШ-анализа (рис. 12 В,Г). При активации PARP1 НАД⁺ аналогичный ингибирующий эффект фиксируется при 0,1–1 мкМ ресвератрола (рис. 12 Б). Это связано с концентрационно-зависимой агрегацией ресвератрола: при высоких концентрациях он образует агрегаты с ограниченной способностью взаимодействовать с нуклеосомами, тогда как при разведении переходит в мономерное состояние и эффективно связывается с нуклеосомами и PARP1 (рис. 12 А).

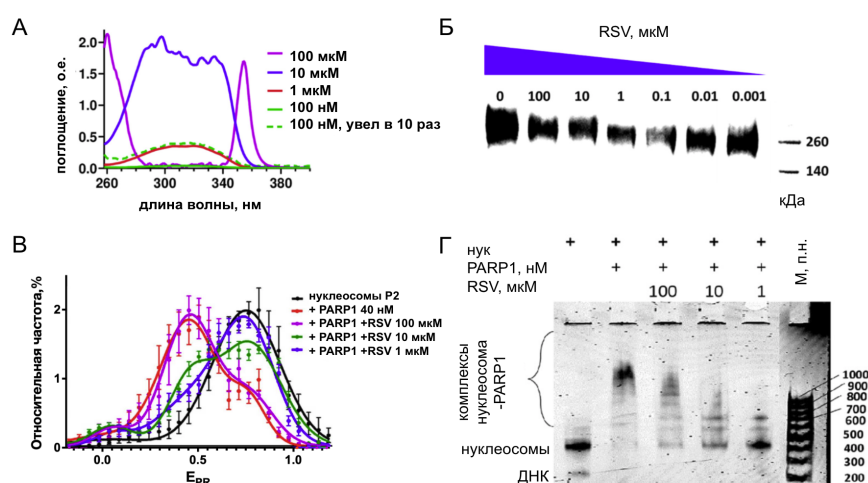


Рисунок 12. Влияние ресвератрола (RSV) на каталитическую активность и нуклеосом-связывающие свойства PARP1.

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 по эффективности FRET для комплексов нуклеосома-PARP1, в присутствии отсутствия и при добавлении ресвератрола; Г – Электрофореграмма (нативный ПААГ 4%) комплексов PARP1 с нуклеосомами при добавлении ресвератрола.

Таким образом, показано, что RSV является перспективным низкомолекулярным модулятором активности PARP1, способный эффективно ингибировать связывающую и каталитическую способность PARP1 относительно нуклеосом в субмикромольном диапазоне концентраций.

Заключение

Проведённое исследование показало, что PARP1, помимо функции сенсора разрывов ДНК, участвует в реорганизации хроматина, индуцируя структурные изменения как в коровой части нуклеосомы, так и в линкерной ДНК. Эти эффекты не зависят от последовательности ДНК и модификаций гистонов и носят обратимый характер за счёт НАД⁺-зависимой аутомодификации фермента.

Показано, что PARP1 конкурирует с линкерным гистоном H1.0 за связывание с нуклеосомой; эффективность этого взаимодействия определяется длиной линкерной ДНК: при её укорочении PARP1 вытесняет H1.0, тогда как при увеличении длины линкера преимущество сохраняется за H1.0.

В условиях открытого хроматина (H2A.Z-содержащие нуклеосомы) PARP1 демонстрирует повышенную аффинность и формирует стабильные комплексы с участием p53. Установлено, что p53 способен связываться с нуклеосомной ДНК и индуцировать перестройку линкерной области, что соответствует его пионерным свойствам; эффект носит концентрационно-зависимый характер. Полученные данные указывают на кооперативное участие PARP1 и p53 в регуляции структуры хроматина и доступности ДНК. В клетках с интактным p53 ингибирование PARP1 потенциально может усиливать противоопухолевый эффект за счёт повышения доступности p53-связывающих сайтов в нуклеосомах, что открывает дополнительные возможности для рационального дизайна биоинженерных и терапевтических подходов.

Показано, что PARP1 повышает доступность нуклеосомной ДНК для CRISPR/dCas9: участки, недоступные для связывания в области диады, становятся доступными после обработки PARP1, что позволяет рассматривать его как перспективный инструмент для решения задач биоинженерии, в частности – как модуль для повышения эффективности эпигеномного редактирования.

Разработана *in vitro* нуклеосомная система для анализа механизмов действия ингибиторов PARP1. Показано, что при сопоставимом подавлении каталитической активности различные ингибиторы по-разному влияют на стабильность комплексов PARP1–нуклеосома и степень реорганизации хроматина, что указывает на существование различных механизмов ингибирования. Система может быть использована для классификации и скрининга новых соединений. С использованием данной платформы установлено, что ресвератрол эффективно ингибирует PARP1: в

субмикромольных концентрациях он ослабляет связывание фермента с нуклеосомами и подавляет его активность.

Выводы работы:

1. Белок PARP1 универсально реорганизует структуру нуклеосом по всей ДНК: эффект воспроизводится при смене источника гистоновой коры, 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в соавторстве в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук:

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. — P. 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. — P. 1309. EDN: NXIWPY. Импакт-фактор 5,2 (JIF) (2,20/0,30)¹.
 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. — P. 3343. EDN: NIZLIC. Импакт-фактор 5,2 (JIF) (1,27/0,20)¹.
 5. 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.
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: TKHHVW. 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., Гераскина 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.

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