

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.22

PARP1-зависимые изменения нуклеосомной организации: возможное участие p53

Д.О. Кошкина^{1,2,*} , Н.В. Малюченко¹ , А.М. Новичкова¹,
А.В. Феофанов^{1,2} , В.М. Студитский^{1,3}

¹Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*email: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Хроматин эукариот представляет собой высокоорганизованную и динамичную структуру, состоящую из ДНК и ассоциированных белков. Эти белки обеспечивают точную регуляцию ключевых процессов, включая экспрессию генов, репликацию и репарацию ДНК. Важнейшими регуляторами архитектуры хроматина из негистоновых белков, являются p53 и PARP1, которые участвуют в ответе клетки на повреждения ДНК. В настоящей работе проведено исследование кооперативного и конкурентного связывания ДНК-связывающего домена (DBD, DNA-Binding Domain) белка p53, и фермента PARP1 с моонуклеосомами, реконструированными на основе последовательности Widom 603 с встроенным сайтом связывания p53. Для детекции взаимодействий использован метод электрофоретического сдвига подвижности (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay) с флуоресцентно меченными нуклеосомами. Комплексы формировали двумя способами: предварительно инкубировали нуклеосомами с p53 DBD и затем добавляли PARP1, либо сначала получали комплекс нуклеосома–PARP1 и затем вносили p53 DBD. Результаты показали, что порядок добавления белков определяет характер их взаимодействия с нуклеосомой: при низких концентрациях p53 наблюдается вытеснение этого белка PARP1, тогда как при повышении концентрации p53 формируются стабильные комплексы нуклеосома–p53, не нарушенные белком PARP1. Стабильных тройных комплексов нуклеосома–p53–PARP1 не обнаружено.

Ключевые слова: PARP1, p53, нуклеосома, EMSA, хроматин

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-10

Введение

В эукариотических клетках хроматин образует динамичную и сложно устроенную систему, включающую ДНК и взаимодействующие с ней белки. Архитектура хроматина крайне динамична: она постоянно подвергается ремоделированию, что необходимо для регуляции экспрессии генов, репликации и репарации ДНК [1]. К ключевым белкам хроматина относят гистоны и негистоновые белки. Гистоны – это высококонсервативные белки, ответственные за формирование базовой повторяющейся единицы хроматина – нуклеосомы. Она состоит из примерно 147 пар оснований, и гистонового октамера, который содержит два димера H2A/H2B и тетрамер H3/H4 [2, 3]. Между собой нуклеосомы соединены свободной линкерной ДНК, с которой могут связываться линкерные гистоны H1-типа, способствуя формированию структур более высокого порядка. Дальнейшая

компактизация хроматина обеспечивается плотной упаковкой рядов нуклеосом [4].

Существует два основных состояния хроматина: эухроматин – менее конденсированный транскрипционно активный материал и гетерохроматин – плотно конденсированный и обычно транскрипционно менее активный [5]. Организация хроматина и его динамическое состояние связаны с различными факторами, такими как: модификации гистонов и ДНК, варианты формы гистонов, а также взаимодействия с ним различных белков и белковых комплексов. Эти условия влияют на доступность хроматина для ремоделирующих и регуляторных белков в ответ на клеточные сигналы или повреждение ДНК [6]. Нарушение структуры хроматина может привести к aberrантной экспрессии генов и связано с различными заболеваниями, включая онкозаболевания.

PARP1 известен прежде всего как белок, детектирующий разрывы ДНК (включая одно- и двуцепочечные). Его активация приводит к привлечению репарационного комплекса через механизм, опосредованный поли(АДФ-рибозилированием) (PAR, Poly(ADP-ribosyl)ation) [7, 8]. Помимо этого, PARP1 способен регулировать архитектуру и динамику хроматина. PARP1 способен предотвращать деметиляцию H3K4me3 путем связывания с промоторами ряда генов, таких как TMSL8, SCN1A, NELL2, ITPR1, а также прямого связывания с деметилазой KDM5B [9]. Каталитическая активность PARP1 приводит к вытеснению деметилазы KDM5B из хроматина, что способствует поддержанию транскрипционно активного состояния хроматина за счет сохранения активирующих гистоновых меток. Данные о воздействии PARP1 на организацию хроматина противоречивы. Взаимодействуя с нуклеосомами, PARP1 вызывает структурные изменения хроматина, модулируя его пространственную организацию. Этот процесс может приводить к конденсации и инактивации хроматина, что, вероятно, играет ключевую роль в обеспечении репарации ДНК при повреждениях [10]. Однако в других случаях PARP1 проявляет противоположный эффект – его взаимодействие с хроматином приводит к удалению линкерного гистона H1, снижению плотности упаковки ДНК и облегчению транскрипционного процесса [11, 12]. Эти данные указывают на способность PARP1 функционировать в качестве активатора хроматина. В целом, наблюдаемые эффекты зависят от каталитической активности PARP1, эпигенетического ландшафта и взаимодействия с другими регуляторными системами. Ранее было показано, что PARP1 способен непосредственно кооперировать с рядом белков, например p53 [8, 10], который известен как белок-супрессор опухолей, обладающий способностями контролировать клеточный цикл и регулировать апоптоз [13]. Помимо этого, p53 вовлечен в регуляцию окислительного стресса и активацию антиоксидантного ответа, а также в дифференциацию клеток. Кроме того, он участвует в регуляции метаболизма, репарации ДНК, активации и регуляции аутофагии, регуляции окислительного стресса и антиоксидантного ответа, контроле дифференцировки клеток, эпигенетических состояний и плюрипотентности [12, 14–16]. Он также проявляет пионерную активность, поскольку взаимодействует с хроматином, обогащенным нуклеосомами, открывает недоступные участки хроматина [17, 18].

Несмотря на вышесказанное, достаточных сведений о их совместном взаимодействии с нуклеосомой не представлено. Таким образом целью настоящей работы было исследование кооперативного/конкурентного связывания PARP-1 и p53 с нуклеосомами.

Материалы и методы

Список реактивов и оборудования. Смесь нуклеотидтрифосфатов для полимеразной цепной реакции (ПЦР), 10 мМ каждого (Евроген, Россия); буфер для ПЦР 10× (Евроген, Россия); Taq ДНК-полимераза (Евроген, Россия); плазмида pGEM-T easy, содержащая NPS 603 Widom и сайт связывания p53 (любезно предоставлено Бондаренко Е.А.); коммерческий набор Cleanup St PCR для очистки ДНК из реакционных смесей (Евроген, Россия); акриламид (Gibco, США); бис-акриламид (Amresco, США); Trizma Base (Sigma, США); ЭДТА (AppliChem, Германия); дитиотреитол (Sigma, США); NP-40 (Sigma, США); poly(I:C) (Sigma Aldrich, США); β-меркаптоэтанол (ICN Biomedicals Ltd., Великобритания); NaCl (Sigma, США); HEPES, pH 8,0 (Sigma Aldrich, США); TCEP (Sigma Aldrich, США); ZnCl₂ (Fluka, Швейцария); флуоресцентно меченные олигонуклеотиды с метками Cy3, Cy5 (Lumiprobe, Россия). В работе использовались следующие приборы и оборудование: источник тока PowerPac Basic (Bio-Rad, США); гель-сканер Amersham Typhoon (Cytiva, Великобритания); термальный циклер C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США); программное обеспечение для обработки изображений ImageJ (NIH, США).

Для работы готовили моонуклеосомы на основе последовательности Widom 603 [19] со встроенным сайтом связывания p53 «GAACATGTCCCAACATGTTG» в область входа/выхода нуклеосомы. Длина нуклеосом-позиционирующей последовательности 145 пар оснований, удлиненная с обеих сторон на 20 нуклеотидов. В представленной матрице подчеркнуты линкерные участки с обеих концов последовательности, а также сайт связывания внутри.

CAAGCGACACTGGCACTGGGCCGGTTCG
CGCGCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCTCTCTC
GGGCGTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGA
GCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGAT
GTTGAAAGAGGCCCTCCGAACATGTCCCAACA
TGTTGCTGGGGCCAGTGCCTATCATGGTTC

Для последующей детекции нуклеосом вносили флуоресцентные метки методом ПЦР с помощью флуоресцентно меченых олигонуклеотидов (Люмипроб, Россия; флуоресцентно-меченые тимидины указаны в квадратных скобках с названием меток Cy3 и Cy5):

GAACCATGAT[Cy5-dT]GGCACTGGGCCCCAG
CAACATGTTGGGACATGTTTCGGAGGGCCTCT
TTC

CAAGCGACAC[Cy3-dT]GGCACTGGGCCGGT
TCGCGCGCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCTCTC
TCTCGGGCGT

Реконструкцию нуклеосом проводили ступенчатым диализом с использованием полученной флуоресцентно меченой ДНК, а также кано-

нического октамера гистонов человека (любезно предоставленный А.Н. Коровиной). Смесь ДНК и гистонного октамера в соотношении 1,1:1 инкубировали в буфере, содержащем 2 М NaCl, с последующим постепенным снижением концентрации до 0,1 М при 4°C. Качество сборки и наличие меток проверяли методом электрофореза в 4,5%-ном нативном полиакриламидном геле (ПААГ; 0,2-кратный буфер Tris-Borate-EDTA – TBE: 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) (рис. 1).

p53DBD хранили в буферах следующего состава: 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис pH 7,5, 10 мМ DTT, 10%-ный глицерин. PARP1 хранили в буферах следующего состава: 20 мМ HEPES pH 8,0; 150 мМ NaCl (Sigma Aldrich, США), 0,1 мМ ТСЕР (Sigma Aldrich, США), 0,15 мМ ZnCl₂ (Fluka, Швейцария), 25%-ный глицерин (Fisher Scientific, США).

Белки PARP1 и ДНК-связывающий домен p53 были очищены методом аффинной хроматографии с использованием никель-содержащей колонки.

Для изучения кооперативного взаимодействия PARP1 и p53DBD комплексы с нуклеосомами формировали двумя способами. Первый – к предварительно полученному комплексу нуклеосома-p53 добавляли PARP1, второй – к предварительно полученному комплексу нуклеосома-PARP1 добавля-

ли p53DBD. Для формирования комплексов был использован буфер следующего состава: 2,5 мМ Трис (pH 8,0), 0,25 мМ β-меркаптоэтанола, 0,125 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl. Такие концентрации оптимальны для поддержания специфичных комплексов нуклеосома-p53DBD. При предварительном формировании комплексов нуклеосома-p53 и последующим добавлением PARP1 комплексы с p53 готовили следующим образом: в реакционный буфер добавляли 5 нг poly(I:C) (в качестве неспецифического полинуклеотида-компетитора, контрольные эксперименты, демонстрирующие его влияние, представлены на рис. А1, приложение) и 1,2 мкМ p53DBD и оставляли на 5 мин при 25°C. Далее к образцу добавляли 2 нМ нуклеосом и инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Далее добавляли 20 нМ PARP1 и инкубировали 30 мин. Если сначала формировался комплекс нуклеосома-PARP1, то в реакционный раствор добавляли 20 нМ PARP1 и 2 нМ нуклеосом и инкубировали 30 мин. За 5 мин до конца первой инкубации готовили смесь poly(I:C) и p53DBD, которую по истечении времени добавляли к комплексу нуклеосома-PARP1. Готовые образцы помещали в нативный 4,5%-ный ПААГ и проводили электрофорез в течение 30 мин. Полученный гель сканировали на Amersham Typhoon (Cytiva, США) с использованием лазеров для Cy3 – 532 нм, Cy5 – 633 нм и для Cy2 – 488 нм (рис. 1, 2).

Результаты

Основным центром взаимодействия PARP1 и p53 является С-терминальный домен p53 (аминокислоты 356–393) [20]. Поли(АДФ)-рибозилирование этого участка усиливает взаимодействие PARP1 и p53. Таким образом, при наличии p53DBD мы можем исключить возможность непосредственного связывания и наблюдать кооперативность или конкуренцию при формировании комплексов с нуклеосомой. Следует отметить, что такая система имеет статус модельной и преимущественно нацелена на уточнение фундаментальных механизмов взаимодействий этих белков с нуклеосомой. Полученные результаты не в полной мере отражают физиологические процессы.

После определения фундаментальных механизмов взаимодействия данных белков с хроматином, в дальнейших исследованиях планируется детально изучить ферментативную активность PARP1 в аналогичных условиях. Предполагается, что при PAR-илировании такой системы p53DBD не будет модифицирован поли(АДФ-рибозой) и сохранит свою связь с нуклеосомой, поддерживая индуцированные конформационные изменения.

Для более детального анализа использовали p53DBD в концентрации, частично переводящей нуклеосомы в комплекс (1,2 мкМ), и в концентрации PARP1, приводящей к формированию комплексов со всеми нуклеосомами в образце (20 нМ).

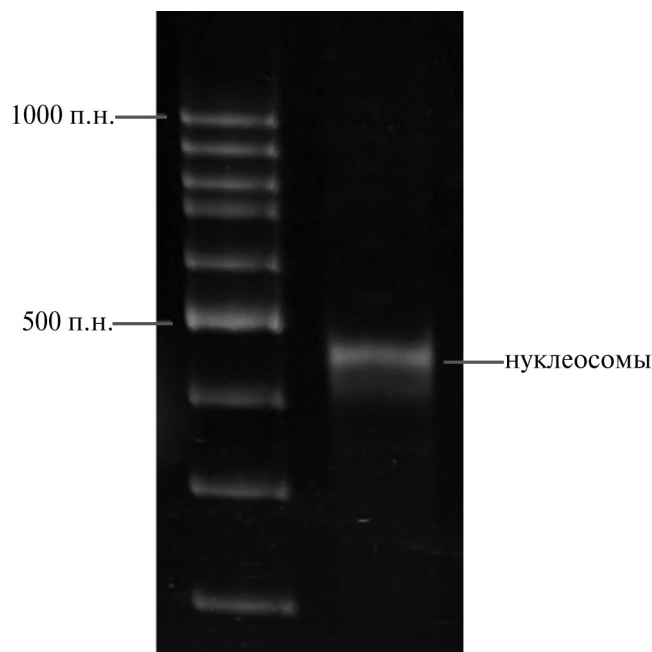


Рис. 1. Проверка качества сборки нуклеосом, 4,5%-ный ПААГ. Визуализацию нуклеосом методом FRET (Förster Resonance Energy Transfer) осуществляли с помощью сканирующего прибора Amersham Typhoon (Cytiva, США). Для регистрации сигнала производилось лазерное возбуждение в канале Cy3 (532 нм) с детекцией флуоресценции в соответствующем спектральном диапазоне. Дополнительно фиксировали флуоресценцию акцептора (Cy5, 670 нм) при возбуждении Cy3 и регистрации в канале Cy5. Полученные изображения геля обрабатывались и совмещались с помощью программного обеспечения ImageJ.

С помощью такого подхода проверяли гипотезу о кооперации PARP1 с ДНК-связывающим доменом p53, возможно, по механизму, сходному с облегчением доступа SOX2 к хроматину при связывании PARP1 с нуклеосомными структурами [21]. Кооперативные эффекты могут проявляться в виде образования мультимолекулярных комплексов либо в виде изменений эффективности формирования комплексов, благодаря специфическому влиянию одного белка на доступность или динамику связывания другого компонента системы.

Помимо нуклеосом в пробе также присутствует свободная ДНК, которая также влияет на визуализацию комплексов. При формировании комплекса нуклеосома-PARP1 происходит изменение сдвига в ПААГ (рис. 2). Комплексы с PARP1 представляют собой совокупность полос на изображении геле-электрофореза: он способен формировать мультисоставные комплексы с нуклеосомой, а также эффективно связывать свободную ДНК. Молекулярный вес p53DBD меньше PARP1, поэтому комплекс нуклеосома-p53DBD быстрее мигрирует в геле, чем комплекс нуклеосома-PARP1 (рис. 2).

P53DBD, являясь ДНК-связывающим белком, эффективно связывается и со свободной, и с нуклеосомной ДНК. Образуется два типа комплексов: нуклеосома-p53, более тяжелый и высокий идущий комплекс, и ДНК-p53, занимающий место между интактными нуклеосомами и комплексом нуклеосома-p53.

При предварительном формировании комплекса нуклеосома-p53 и последующем добавлении PARP1 происходит формирование отдельных комплексов нуклеосома-p53 и нуклеосома-PARP1. Вероятно, это связано со слабой способностью p53 в низких концентрациях взаимодействовать с нуклеосомами, и наоборот высокой способностью

у PARP1. При обратной последовательности формирования комплекса также наблюдается формирование отдельных комплексов с p53 и PARP1, но общая совокупность комплексов претерпевает ряд следующих изменений. На дорожке превалируют низкомолекулярные комплексы как с PARP1 так и с p53DBD. Вероятно, это связано с тем, что PARP1 индуцирует реорганизацию хроматина, способствуя освобождению сайта связывания p53 на нуклеосомной ДНК. Однако вследствие стерических ограничений нуклеосомной структуры и ограниченной гибкости канонической нуклеосомы эффективность образования высокомолекулярных комплексов нуклеосома-PARP1 снижается.

Обсуждение

В целом, результаты наших исследований демонстрируют, что порядок добавления PARP1 и p53DBD к нуклеосомам определяет кооперативность или конкуренцию. Последовательное связывание белков с нуклеосомами может создавать партнерские эффекты: предыдущее связывание одного белка изменяет конформацию нуклеосомы, что влияет на эффективность связывания последующих белков. Известно, что оба белка реагируют на участки ДНК, содержащие одно- или двунитевые разрывы [8, 22, 23]. PARP1 распознает повреждения ДНК и рекрутирует репарационные белки [24], тогда как p53 активируется при повреждении ДНК и действует как транскрипционный фактор [25]. С биологической точки зрения, наблюдаемые эффекты могут отражать процессы в хроматине, когда происходит выбор между процессом репарации и апоптозом и с ключевой ролью p53 в этом выборе. p53 — критический регулятор клеточного ответа на стресс. Его взаимодействие с PARP1 и нуклеосомами может определять судьбу клетки: p53 усили-

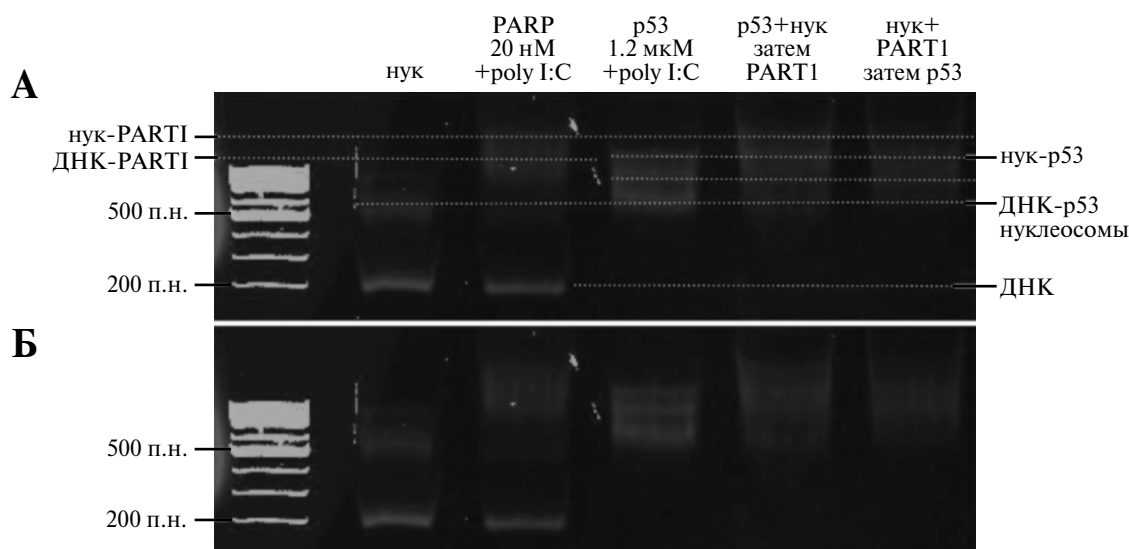


Рис. 2. Анализ взаимодействия PARP1 и p53 с нуклеосомами методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Комплексы инкубировали с нуклеосомами (нук), PARP1 20 нМ и p53DBD 1,2 мкМ. Справа указаны позиции миграции: свободные нуклеосомы (нижняя полоса), комплекс ДНК-p53, нук-p53 и комплексы ДНК-PARP1, нук-PARP1. Слева показаны маркеры молекулярного веса (п.н. — пары нуклеотидов). В последних двух дорожках представлены комплексы нуклеосом с белками p53 и PARP1.

вает связывание PARP1 с нуклеосомами, способствуя эффективной репарации [23, 26], в то же время при определенных условиях, например, при сильном генотоксическом стрессе доминирование p53 может подавлять PARP1-зависимую репарацию, способствуя апоптозу в сильно поврежденных клетках. Таким образом конкуренция и кооперативность между p53 и PARP1 отражает сложный баланс между репарацией ДНК и программируемой гибелью клетки. Это важно для понимания ре-

зистентности к терапии (например, ингибиторам PARP) и разработки комбинированных методов лечения рака.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (проект № 21-64-00001-П). Данная работа не содержала экспериментов с участием людей или животных. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Hansen J.C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005;15(2):188–196.
2. Bavykin S.G., Usachenko S.I., Zalensky A.O., Mirzabekov A.D. Structure of nucleosomes and organization of internucleosomal DNA in chromatin. *J. Mol. Biol.* 1990;212(3):495–511.
3. Luger K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251–260.
4. Bednar J., Horowitz R.A., Grigoryev S.A., Carruthers L.M., Hansen J.C., Koster A.J., Woodcock C.L. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(24):14173–14178.
5. Luger K., Dechassa M.L., Tremethick D.J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(7):436–447.
6. Mishra L.N., Thiriet C., Vasudevan D. Editorial: Chromatin structure and function. *Front. Genet.* 2023;14:1140534.
7. Ko H.L., Ren E.C. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules.* 2012;2(4):524–548.
8. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18(10):610–621.
9. Nakamoto M.Y., Rudolph J., Wuttke D.S., Luger K. Non-specific binding of RNA to PARP1 and PARP2 does not lead to catalytic activation. *Biochemistry.* 2019;58(51):5107–5111.
10. Muthurajan U.M., Hepler M.R.D., Hieb A.R., Clark N.J., Kramer M., Yao T., Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111(35):12752–12757.
11. Zhang S., Sun X., Jing Z., Qu F. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011;82(1):213–216.
12. Labuschagne C.F., Zani F., Vousden K.H. Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2018;1870(1):32–42.
13. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323–331.
14. Borrero L.J.H., El-Deiry W.S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2021;1876(1):188556.
15. Sui X., Han W., Pan H. p53-induced autophagy and senescence. *Oncotarget.* 2015;6(14):11723–11724.
16. Wang X., Simpson E.R., Brown K.A. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 2015;75(23):5001–5007.
17. Fischer M., Schwarz R., Riege K., Förste S., Schwab K., Wiechens E., van Bömmel A., Hoffmann S. p53 reveals principles of chromatin remodeling and enhancer activation. *Nucleic Acids Research.* 2025;53(11):gkaf465.
18. Yu X., Buck M.J. Defining TP53 pioneering capabilities with competitive nucleosome binding assays. *Genome Res.* 2019;29(1):107–115.
19. Widom J. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(3):1095–1099.
20. Okorokov A.L., Sherman M.B., Plisson C., Grinkevich V., Sigmundsson K., Selivanova G., Milner J., Orlova E.V. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *EMBO J.* 2006;25(21):5191–5200.
21. Liu Z., Kraus W.L. Catalytic-independent functions of PARP-1 determine Sox2 pioneer activity at intractable genomic loci. *Molecular Cell.* 2017;65(4):589–603.e9.
22. Nozaki T., Masutani M. p53-dependent cell cycle checkpoint after DNA damage and its relevance to PARP1. *Res. Rev. Insights.* 2018;2(2):1–5.
23. Süsse S., Scholz C.J., Bürkle A., Wiesmüller L. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(2):669–680.
24. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(21):6170–6182.
25. Reinhardt H.C., Schumacher B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012;28(3):128–136.
26. Malanga M. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J. Biol. Chem.* 1998;273(19):11839–11843.

Поступила в редакцию 01.07.2025

После доработки 19.09.2025

Принята в печать 03.10.2025

ORIGINAL RESEARCH

PARP1-dependent alterations in nucleosome organization: potential involvement of p53

D.O. Koshkina^{1,2,*} , N.V. Maluchenko¹ , A.M. Novichkova¹,
A.V. Feofanov^{1,2} , V.M. Studitsky^{1,3} 

¹*School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*

²*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;*

³*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA*

*e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Chromatin of eukaryotic organisms is a complexly organized and dynamic complex. Chromatin proteins provide proper regulation of gene expression, DNA replication, and DNA repair. Among the most important regulators of chromatin architecture among non-histone proteins are p53 and PARP1, which are involved in the cellular response to DNA damage. In the present study, we investigated the cooperative and competitive binding of the DNA-binding domain (DBD) of p53 and the enzyme PARP1 to mononucleosomes reconstituted on the Widom 603 sequence with an embedded p53 binding site. To detect interactions, the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method with fluorescently labeled DNA. Complexes were formed in two ways: nucleosomes were pre-incubated with p53 DBD and then PARP1 was added, or the nucleosome–PARP1 complex was formed first and then p53 DBD was introduced. The results showed that the order of protein addition determines the nature of their interaction with the nucleosome: at low p53 concentrations, displacement of this protein by PARP1 is observed, while at higher p53 concentrations, stable nucleosome–p53 complexes are formed, undisturbed by PARP1. No stable ternary nucleosome–p53–PARP1 complexes were detected.

Keywords: *PARP1, p53, nucleosome, EMSA, chromatin*

Funding: This research was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-64-00001-P).

Сведения об авторах

Кошкина Дарья Олеговна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; ст. лаборант-исследователь отдела клеточной геномики группы динамики хроматина ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8137-4685>

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

Новичкова Антонина Михайловна — студентка кафедры молекулярного биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; tonya.novichkova@bk.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. отдела клеточной геномики группы динамики хроматина ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>