

Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293T

ШИФР ТЕМЫ 1132

А.Е. Иванова ЛЯП ОИЯИ, М.П. Зарубин ЛЯП ОИЯИ, Е.В. Кравченко ЛЯП ОИЯИ, О.И. Кравчук ИБР РАН (Москва), О.А. Кулдошина ЛЯП ОИЯИ, А.В. Рзянина ЛЯП ОИЯИ, А.Н. Русакович ЛЯП ОИЯИ, А.С. Яхненко (ЛЯП ОИЯИ, Лимнологический институт СО РАН)

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

Е.В. Кравченко

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА

А.В. Рзянина

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО _____

ДАТА НТС ЛАБОРАТОРИИ 16.04.2020 НОМЕР ДОКУМЕНТА 2020-4

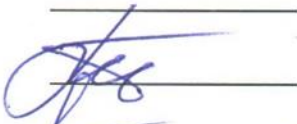



ДАТА НАЧАЛА ПРОЕКТА 01.01.2021

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА

Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293T

ШИФР ТЕМЫ 1132

Е.В. Кравченко

УТВЕРЖДЕН ДИРЕКТОРОМ ОИЯИ	_____	2020
СОГЛАСОВАНО		
ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ	_____	2020
ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ	_____	2020
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР	_____	2020
НАЧАЛЬНИК НОО	_____	2020
ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ	 _____	07.05 2020
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ	 _____	07.05 2020
РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА	 _____	07.05 2020
ЗАМ. РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	 _____	07.05 2020
ОДОБРЕН		
ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ ФИЗИКА КОНДЕНСИРОВАННЫХ СРЕД	_____	2020

Оглавление	
Аннотация	4
Введение	5
Состояние исследований по проблемам, изучаемым в проекте	6
Молекулярные механизмы радиорезистентности тихоходок	7
Список литературы	9
Цель и задачи проекта	11
Оптимизация и синтез последовательности ДНК, кодирующей белок Dsup	11
Создание линии <i>D. melanogaster</i> , стабильно экспрессирующей Dsup	11
Оценка радиорезистентности <i>D. melanogaster</i> , стабильно экспрессирующих Dsup	11
Создание клеточной линии HEK293Т, экспрессирующей гибридный белок (fusion protein) GFP-Dsup	12
Транскриптомный анализ <i>D. melanogaster</i> и клеточной линии HEK293Т, экспрессирующих белок Dsup, в обычных условиях и после воздействия ионизирующего излучения	13
Изучение распределения гибридного белка GFP-Dsup на политенных хромосомах <i>D. melanogaster</i>	13
Изучение продолжительности жизни линий <i>D. melanogaster</i> , экспрессирующих Dsup	14
Создание экспрессионного вектора для продуцирования белка Dsup в клетках <i>E. coli</i> , выделение и очистка белка Dsup для предварительных экспериментов по его кристаллизации	14
Исполнители	14
План-график работ	15
Смета затрат	16
Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления Проекта	17

Аннотация

Целью данного проекта является изучение радиопротекторных свойств нового белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культурах клеток человека и исследование механизмов действия этого белка. Белок Dsup является новым белком, открытым в 2016 году в экстремофильном организме *Ramazzottius varieornatus* – одном из самых радиорезистентных видов многоклеточных организмов. Создание линий *D. melanogaster* и культур клеток человека, экспрессирующих данный белок, позволит оценить возможность повышения их радиорезистентности в ходе облучения разными видами ионизирующего излучения, а широкий спектр методов, применимый к этим модельным организмам, позволит начать изучение воздействия Dsup на клетку как на организменном, так и на молекулярном уровне. Для решения данных задач нами будет использован широкий спектр молекулярно-биологических методов: в частности, создание линий организмов, экспрессирующих белок Dsup и гибридный белок GFP-Dsup, транскриптомный анализ, секвенирование, иммуноокрашивание политенных хромосом, синтез в бактериальных клетках, выделение и очистка значительных количеств белка Dsup и т.д. По ряду пунктов, необходимых для выполнения данного проекта, у авторов уже имеются значительные наработки, в частности уже созданы линии *D. melanogaster*, стабильно экспрессирующие Dsup, и культура клеток человека HEK239T с транзientной экспрессией Dsup. Следует отметить, что на текущий момент нет данных о многоклеточных модельных организмах, экспрессирующих белок Dsup, поэтому решаемые в ходе выполнения проекта задачи являются новыми и важным не только для молекулярной биологии и радиобиологии, но и для биотехнологии, космических исследований и любых других дисциплин, требующих повышения уровня радиорезистентности организмов.

Запрашиваемый бюджет проекта на 2021-2023 годы 160 kUSD.

Введение

Задачей данного проекта является получение новых данных о свойствах уникального белка Dsup, обнаруженного у экстремофилов типа *Tardigrada*, и изучение механизмов его влияния на радиорезистентность и другие параметры живых организмов. В условиях увеличения уровня радиационного фона за счет различных техногенных составляющих, проблемы космического излучения, препятствующего длительному пребыванию живых организмов в космосе, и общих механизмов, лежащих в основе старения клеток и их повреждения ионизирующим излучением, изучение новых механизмов увеличения радиорезистентности является одним из важнейших направлений молекулярной биологии и радиобиологии. На данный момент существует весьма ограниченное число экспериментальных данных, описывающих механизмы действия Dsup (Chavez et al., 2019; Hashimoto et al., 2016), выполненных или *in vitro* (вне живого организма), или на культуре клеток, что не отражает всего многообразия реакций, которые могут быть вызваны белком Dsup в многоклеточном организме с разными типами тканей, системами органов и сложными взаимодействиями между ними на разных уровнях организации (в частности, влияние на продолжительность жизни, поведение, специализированные метаболические процессы и т.д.). Поэтому изучение влияния белка Dsup на модельный объект *D.melanogaster*, ставший основой для изучения процессов, происходящих на разных уровнях организации живых систем, позволит описать важные свойства этого белка и механизмы его взаимодействия с процессами жизнеобеспечения *D.melanogaster*. В качестве методов исследований в данном проекте предлагается использовать как современные методики транскриптомного анализа, создание гибридных белков и флуоресцентную микроскопию, так и требующие также хорошей классической молекулярно-биологической базы (секвенирование, методы молекулярного клонирования, иммуноокрашивание и т.д.).

В ходе реализации проекта впервые предполагается оценить картину влияния белка Dsup в нормальных условиях и после воздействия ионизирующего излучения разных типов на функционирование многоклеточного организма (*D. melanogaster*) на уровне продолжительности жизни и степени радиорезистентности, на уровне транскриптомов, и на хромосомном уровне. Для культуры клеток человека планируется впервые получить данные о влиянии белка Dsup на клетки на транскриптомном уровне и оценить изменения радиорезистентности культуры клеток, экспрессирующей Dsup, после воздействия протонов и тяжёлых ионов. Полученные данные могут внести важный вклад в описание новых механизмов радиорезистентности на разных уровнях организации живых систем и в дальнейшем оценить возможность их применения в различных областях биологии и медицины.

Состояние исследований по проблемам, изучаемым в проекте

Экстремофильные организмы, адаптировавшиеся к экстремальным условиям окружающей среды (высокая/низкая температура, высокое/низкое давление, $pH < 3$, $pH > 9$, высокие уровни ионизирующего излучения, засоленность и т.д.), давно являются предметом интереса биологии. Подавляющее большинство экстремофильных организмов относится к одноклеточным организмам, например, к бактериям и археям. Однако среди животных тоже встречаются виды, способные выживать в экстремальных условиях окружающей среды – в частности тихоходки (*Tardigrada*).

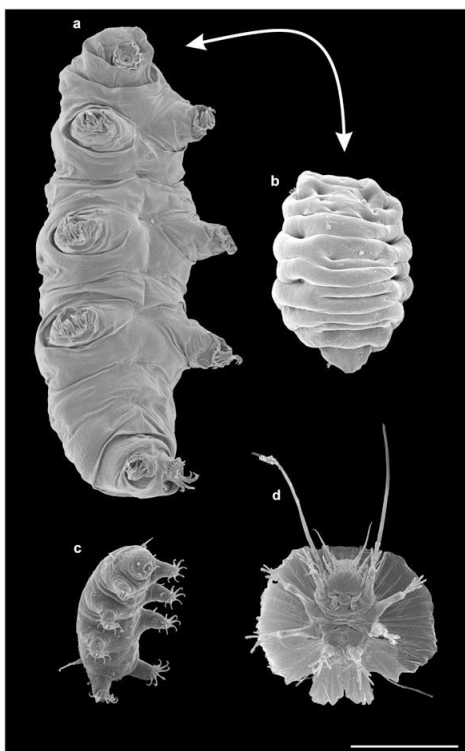


Рис.1. Сканирующая электронная микроскопия некоторых видов тихоходок. a,b *Richtersius coronifer* в гидратированном и ангидробиотическом состояниях. c - *Isoechiniscoides sifae*. d – *Actinarctus cf. doryphorus* (вентральный вид). Scale bar = 100 μm . Воспроизведено из Water Bears: The Biology of Tardigrades Editor: Ralph O. Schill. Springer 2018.

Особенный интерес представляет устойчивость тихоходок к ионизирующему излучению. Несколько недавних исследований на разных видах организмов показали, что представители *Tardigrada* относятся к группе наиболее устойчивых к радиации животных на Земле, способных выживать после воздействия как редко- так и плотно ионизирующего излучения в дозах около 5 кГр (Charlotta Nilsson et al., 2010; Horikawa et al., 2012, 2008, 2006; Jönsson and Wojcik, 2017). Молекулярные механизмы такой радиорезистентности до сих пор в значительной степени неясны.

радиорезистентности до сих пор в значительной степени неясны.

Экстремальная радиорезистентность тихоходок сделала их модельным организмом для изучения влияния космических условий на живые организмы и на низкой околоземной орбите в ходе FOTONM3 миссии были проведены несколько экспериментов с тихоходками (TARDIS (Jönsson et al., 2008), RoTaRad (Persson et al., 2011), TARSE (Rebecchi et al., 2011, 2009)). В ходе проекта TARDIS (Tardigrades in Space) тихоходки 10 дней находились в условиях космического вакуума (10^{-6} Pa), воздействия космической радиации (100 мГр) и УФ-излучения. Наибольший отрицательный эффект на выживаемость тихоходок по сравнению с контрольной группой оказало УФ облучение полного спектра, тогда как воздействие вакуума и космической радиации не оказали на выживаемость существенного влияния (Jönsson et al., 2016, 2008).

Несмотря на значительное число исследований об уникальной радиорезистентности тихоходок, почти все эти данные описывают различные параметры выживаемости, не переходя на клеточный и молекулярный уровень, поэтому механизмы радиорезистентности тихоходок к ионизирующему излучению почти не изучены и представляют значительный интерес.

Молекулярные механизмы радиорезистентности тихоходок

В период доомиксных технологий было проведено два эксперимента по поиску генов тихоходок, экспрессия которых изменяется в ответ на воздействие ионизирующей радиации. Beltrán-Pardo et al. (Beltrán-Pardo et al., 2013) показали значительное увеличение количества белка Rad51 после γ -облучения (70 Гр) гидратированных *M. cf. tardigradum*, что говорит об активации систем репарации ДНК, связанных с гомологичной рекомбинацией. Jönsson and Schill (Jönsson and Schill, 2007) продемонстрировали повышение экспрессии гена *Hsp70* после γ -облучения (500 Гр) *R. cf. coronifer*. Hsp70 – белки-шапероны, принимающие участие в большом числе процессов, связанных с ответом на разные виды стресса и поддержание геномной стабильности. Гомологичные варианты этих белков присутствуют у всех живых организмов.

Прорыв в исследованиях произошел в 2016 году, когда был секвенирован геном *Ramazzottius varieornatus* – одного из самых радиорезистентных видов тихоходок (Hashimoto et al., 2016). После анализа данных и сравнения белков *R. varieornatus* со всеми уже известными белками других организмов был обнаружен уникальный белок - Damage suppressor (Dsup), присутствующий только у тихоходок. На культуре клеток НЕК239 было продемонстрировано, что после трансфекции вектором, содержащим GFP-Dsup, флуоресцентный сигнал был локализован в ядре, что говорит о возможном участии Dsup в защитных механизмах от воздействия радиации на ДНК. Облучение клеток, трансфицированных Dsup, γ -квантами в дозе 4 Гр показало увеличение их выживаемости и снижение радиационных повреждений на уровне ДНК (γ -H2AX foci detection, COMET assay) по сравнению с облученным нетрансфицированным контролем (Hashimoto et al., 2016). Поскольку облучение перед COMET проводилось на льду и фрагментация ДНК анализировалась сразу после облучения, репарационные процессы не вносили значимый вклад в уменьшение количества разрывов в ДНК, что говорит в пользу радиопротекторных функций Dsup, а не об усилении им репарационных процессов.

Белок Dsup состоит из 445 аминокислотных остатков, формирующих N-концевой и C-концевой районы, между которыми находится предполагаемая α -спираль. В экспериментах *in vitro* было показано, что Dsup взаимодействует с молекулами ДНК независимо от их нуклеотидной последовательности (Hashimoto et al., 2016). Клеточная линия, экспрессирующая Dsup с делетированным C-концевым районом, не обладала повышенной устойчивостью к рентгеновским лучам, а линия, экспрессирующая только C-концевой район, продемонстрировала ядерную локализацию этой части белка, но с формированием ненормальной структуры ядер. Вероятно, связывание отдельного C-концевого района белка Dsup с ДНК влияет на репликацию и/или транскрипцию. Подобный эффект наблюдается и для других белков, способных связываться с ДНК: например, сверхпродукция гистоноподобных белков у бактерий вызывает конденсацию ДНК и потерю клеткой жизнеспособности (Spurio et al., 1992). N-концевой район Dsup и предполагаемая α -спираль возможно нейтрализуют эти эффекты в полном размере белке Dsup (Hashimoto and Kunieda, 2017).

В более поздних исследованиях 2019 года (Chavez et al., 2019) было показано, что Dsup предпочтительнее связывается с нуклеосомами, чем со

свободной от белков ДНК и уменьшает степень повреждения ДНК гидроксильными радикалами. Неожиданно, что консервативный район Dsup, необходимый для связывания с нуклеосомами, очень похож на домен, связывающийся с нуклеосомами у белков группы HMGN позвоночных (консенсус RRSARLSA)(Chavez et al., 2019; González-Romero et al., 2015). Ортологичный белок был обнаружен и в другом виде тихоокеанских тихоходок. Белки Dsup заряжены и обогащены сериновыми, аланиновыми, глициновыми и лизиновыми остатками (более 50%), которые могут формировать неупорядоченную вторичную структуру (Dunker et al., 2001). Предполагается, что прямое связывание Dsup с нуклеосомами и формирование диффузной массы белка вокруг хромосомной ДНК создает защиту от гидроксильных радикалов.

Список литературы

- Beltrán-Pardo, E.A., Jönsson, I., Wojcik, A., Haghdoost, S., Harms-Ringdahl, M., Bermúdez Cruz, R.M., Bernal Villegas, J.E., 2013. Sequence analysis of the DNA-repair gene *rad51* in the tardigrades *Milnesium cf. tardigradum*, *Hypsibius dujardini* and *Macrobiotus cf. harmsworthi*. *J. Limnol.* <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2013.s1.e10>
- Charlotta Nilsson, E.J., Ingemar Jönsson, K., Pallon, J., 2010. Tolerance to proton irradiation in the eutardigrade *Richtersius coronifer* a nuclear microprobe study. *Int. J. Radiat. Biol.* <https://doi.org/10.3109/09553000903568001>
- Chavez, C., Cruz-Becerra, G., Fei, J., Kassavetis, G.A., Kadonaga, J.T., 2019. The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects dna from hydroxyl radicals. *Elife.* <https://doi.org/10.7554/eLife.47682>
- Dunker, A.K., Lawson, J.D., Brown, C.J., Williams, R.M., Romero, P., Oh, J.S., Oldfield, C.J., Campen, A.M., Ratliff, C.M., Hipps, K.W., Ausio, J., Nissen, M.S., Reeves, R., Kang, C.H., Kissinger, C.R., Bailey, R.W., Griswold, M.D., Chiu, W., Garner, E.C., Obradovic, Z., 2001. Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00138-8)
- González-Romero, R., Eirín-López, J.M., Ausió, J., 2015. Evolution of high mobility group nucleosome-binding proteins and its implications for vertebrate chromatin specialization. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/10.1093/molbev/msu280>
- Hashimoto, T., Horikawa, D.D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin-I, T., Minakuchi, Y., Ohishi, K., Motoyama, A., Aizu, T., Enomoto, A., Kondo, K., Tanaka, S., Hara, Y., Koshikawa, S., Sagara, H., Miura, T., Yokobori, S.I., Miyagawa, K., Suzuki, Y., Kubo, T., Oyama, M., Kohara, Y., Fujiyama, A., Arakawa, K., Katayama, T., Toyoda, A., Kunieda, T., 2016. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/ncomms12808>
- Hashimoto, T., Kunieda, T., 2017. DNA protection protein, a novel mechanism of radiation tolerance: Lessons from tardigrades. *Life.* <https://doi.org/10.3390/life7020026>
- Horikawa, D.D., Kunieda, T., Abe, W., Watanabe, M., Nakahara, Y., Yukuhiro, F., Sakashita, T., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Katagiri, C., Kobayashi, Y., Higashi, S., Okuda, T., 2008. Establishment of a rearing system of the extremotolerant tardigrade *Ramazzottius varieornatus*: A new model animal for astrobiology. *Astrobiology.* <https://doi.org/10.1089/ast.2007.0139>
- Horikawa, D.D., Sakashita, T., Katagiri, C., Watanabe, M., Kikawada, T., Nakahara, Y., Hamada, N., Wada, S., Funayama, T., Higashi, S., Kobayashi, Y., Okuda, T., Kuwabara, M., 2006. Radiation tolerance in the tardigrade *Milnesium tardigradum*. *Int. J. Radiat. Biol.* <https://doi.org/10.1080/09553000600972956>
- Horikawa, D.D., Yamaguchi, A., Sakashita, T., Tanaka, D., Hamada, N., Yukuhiro, F., Kuwahara, H., Kunieda, T., Watanabe, M., Nakahara, Y., Wada, S., Funayama, T., Katagiri, C., Higashi, S., Yokobori, S.I., Kuwabara, M., Rothschild, L.J., Okuda, T., Hashimoto, H., Kobayashi, Y., 2012. Tolerance of anhydrobiotic eggs of the tardigrade *ramazzottius varieornatus* to extreme environments. *Astrobiology.* <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0669>
- Jönsson, K.I., Rabbow, E., Schill, R.O., Harms-Ringdahl, M., Rettberg, P., 2008.

- Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Curr. Biol.*
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.048>
- Jönsson, K.I., Schill, R.O., 2007. Induction of Hsp70 by desiccation, ionising radiation and heat-shock in the eutardigrade *Richtersius coronifer*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.10.111>
- Jönsson, K.I., Schill, R.O., Rabbow, E., Rettberg, P., Harms-Ringdahl, M., 2016. The fate of the TARDIS offspring: no intergenerational effects of space exposure. *Zool. J. Linn. Soc.* <https://doi.org/10.1111/zoj.12499>
- Jönsson, K.I., Wojcik, A., 2017. Tolerance to X-rays and heavy ions (Fe, He) in the tardigrade *Richtersius coronifer* and the bdelloid rotifer *Mniobia russeola*. *Astrobiology.* <https://doi.org/10.1089/ast.2015.1462>
- Karess, R.E., Rubin, G.M., 1984. Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell.* [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90534-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90534-8)
- Parashar, V., Frankel, S., Lurie, A.G., Rogina, B., 2008. The Effects of Age on Radiation Resistance and Oxidative Stress in Adult *Drosophila melanogaster*. *Radiat. Res.* <https://doi.org/10.1667/rr1225.1>
- Persson, D., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Ricci, C., Møbjerg, N., Kristensen, R.M., 2011. Extreme stress tolerance in tardigrades: Surviving space conditions in low earth orbit. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00605.x>
- Rebecchi, L., Altiero, T., Cesari, M., Bertolani, R., Rizzo, A.M., Corsetto, P.A., Guidetti, R., 2011. Resistance of the anhydrobiotic eutardigrade *Paramacrobiotus richtersi* to space flight (LIFE-TARSE mission on FOTON-M3). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2010.00606.x>
- Rebecchi, L., Altiero, T., Guidetti, R., Cesari, M., Bertolani, R., Negroni, M., Rizzo, A.M., 2009. Tardigrade resistance to space effects: First results of experiments on the LIFE-TARSE Mission on FOTON-M3 (September 2007). *Astrobiology.* <https://doi.org/10.1089/ast.2008.0305>
- Rubin, G.M., Spradling, A.C., 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (80-)*. <https://doi.org/10.1126/science.6289436>
- Spradling, A.C., Rubin, G.M., 1982. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (80-)*. <https://doi.org/10.1126/science.6289435>
- Spurio, R., Dürrenberger, M., Falconi, M., La Teana, A., Pon, C.L., Gualerzi, C.O., 1992. Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy. *MGG Mol. Gen. Genet.* <https://doi.org/10.1007/BF00279792>

Цель и задачи проекта

Главными целями проекта являются изучение механизмов действия белка Dsup и оценка перспектив использования Dsup для повышения радиорезистентности многоклеточных сложных организмов. Для достижения этих целей необходимо решить ряд задач.

1. Оптимизация и синтез последовательности ДНК, кодирующей белок Dsup

Для проведения экспериментов по изучению белка Dsup необходимо иметь источник этого белка. Поскольку дальнейшие эксперименты в основном проводятся на модельном генетическом объекте *D.melanogaster*, последовательность ДНК, кодирующая белок Dsup (LC050827.1), была оптимизирована с учетом частоты встречаемости различных кодонов в геноме *D.melanogaster* для стабильного высокого уровня синтеза этого белка. После чего оптимизированная последовательность длиной 1338 п.н. была синтезирована и проверена на правильность синтеза с помощью секвенирования. Эта оптимизированная и проверенная последовательность и используется во всех дальнейших экспериментах.

2. Создание линии *D. melanogaster*, стабильно экспрессирующей Dsup

Синтезированная последовательность, кодирующая белок Dsup, была встроена в вектор pCaSpeR4 (Drosophila Genomic Resources Center, DGRC) под контролем сильного конститутивного промотора гена β -актина – Act5C. Полученная конструкция вместе с вектором, кодирующим источник транспозазы (Karess and Rubin, 1984), с помощью микроинъекций были введены в эмбрионы *D.melanogaster* на стадии пребластодермы, согласно ранее описанным протоколам (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982). Полученные взрослые особи скрещивались с линией y^1w^{1118} и в следующем поколении отбирались трансформанты, демонстрирующие появление окраски глаз (селективный маркер в составе pCaSpeR4). В итоге было получено 5 независимых линий *D. melanogaster*, содержащих данную молекулярно-генетическую конструкцию в разных позициях генома. К нашему удивлению для 3 из 5 линий оказалось невозможным получить чистую линию (на данный момент линии ведутся в гетерозиготном состоянии), а в 2 чистых линиях, которые удалось получить, заметно повышена частота элиминирования конструкции, исходно находящейся между инвертированными повторами P-элемента в составе pCaSpeR4. Вполне возможно это может быть связано с влиянием появившегося в геноме нового белка Dsup, что требует дальнейшего изучения. Тем не менее для точных оценок требуется определение точного места встройки конструкции, несущей Dsup, в геном с помощью инвертированной ПЦР и секвенирования для всех полученных линий.

3. Оценка радиорезистентности *D. melanogaster*, стабильно экспрессирующих Dsup

Для оценки влияния белка Dsup на радиорезистентность *D. melanogaster* линия Dsup№1, ведущаяся в гомозиготном состоянии, была облучена γ -квантами на ускорителе МТ-25 ЛЯР ОИЯИ в дозе 1000 Гр, что близко к значениям LD_{50/2} (Parashar et al., 2008)

Эксперимент проводился для линии №1 *D. melanogaster*, экспрессирующей Dsup, и исходной линии y^1w^{1118} отдельно для самок и самцов (по 60 особей). Первые полученные данные говорят в пользу увеличения радиорезистентности линии Dsup№1. На графике (рис.2) видно увеличение выживаемости в интервале 10-12 дней после облучения как самцов, так и самок линии Dsup№1 по сравнению с самцами и самками контрольной линии y^1w^{1118} .

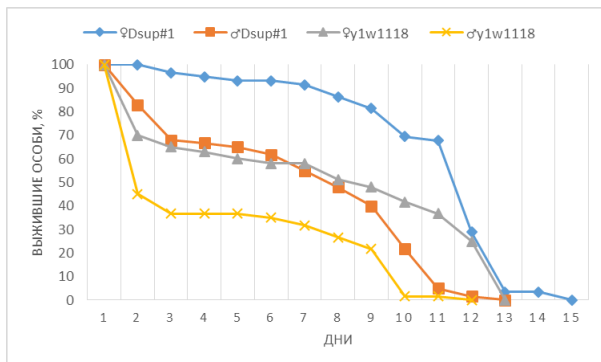


Рис.2. График выживаемости самок и самцов линий Dsup№1 и y^1w^{1118} после облучения γ -квантами в дозе 1000 Гр.

Очевидно, что для получения точных оценок требуется значительное увеличение выборки, независимые повторы и демонстрация наблюдаемого эффекта для разных линий, экспрессирующих Dsup. Интересно, что в исходной линии y^1w^{1118} наблюдается различная радиочувствительность между самками и самцами, что само по себе является интересным для изучения и в ходе планирующегося транскриптомного анализа может быть объяснено при оценке дифференциально экспрессирующихся генов.

4. Создание клеточной линии HEK293T, экспрессирующей гибридный белок (fusion protein) GFP-Dsup

Ранее Hashimoto et al. (Hashimoto et al., 2016) продемонстрировали ядерную локализацию гибридного белка Dsup-GFP, где N-конец GFP был слит с C-концом Dsup. Показано, что ориентация целевого белка и GFP относительно друг друга может влиять на фолдинг белка и искажать функции целевого белка и его локализацию. Поскольку C-конец Dsup играет важную роль в определении его функций (Hashimoto et al., 2016) мы проверили вариант, когда на C-конец Dsup не оказывается пространственного влияния GFP и сделали обратную ориентацию в гибридном белке, где C-конец GFP был слит с N-концом Dsup. Конструкция, содержащая слитые гены GFP-Dsup была трансфецирована в клеточную линию HEK293T, где гибридный белок продемонстрировал четкую ядерную локализацию (рис.3). Таким образом мы подтвердили результаты Hashimoto et al. и получили возможность для создания линии HEK293T, стабильно экспрессирующей Dsup, что позволит оценить радиорезистентность этой клеточной линии к различным типам ионизирующего излучения, в частности, к протонам и тяжёлым ионам.

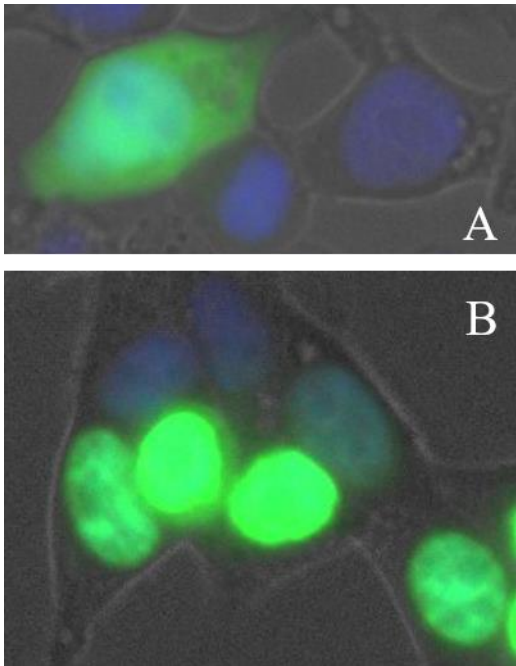


Рис.3. Фотография локализации только GFP (А) и гибридного белка GFP-Dsup (В) в клетках HEK293Т. Ядерная ДНК окрашена с помощью DAPI. Совмещение зеленого флуоресцентного сигнала от GFP-Dsup и синего флуоресцентного сигнала от ДНК, расположенной в ядре, на рис. 3В свидетельствует о ядерной локализации GFP-Dsup

5. Транскриптомный анализ *D.melanogaster* и клеточной линии HEK293Т, экспрессирующих белок Dsup, в обычных условиях и после воздействия ионизирующего излучения

На данный момент нет никаких данных о том, что происходит на уровне взаимодействия между генами и, как следствие, биологических процессах в случае добавления в геном нехарактерного для организма белка Dsup, который может оказывать влияние на ряд фундаментальных процессов. По всей видимости, предполагаемое взаимодействие Dsup с нуклеосомами может оказывать влияние на компактизацию хроматина и таким образом влиять на уровень экспрессии многих генов. Оценку такого влияния можно получить, сравнив транскриптом организмов, экспрессирующих Dsup, и контрольных организмов. Также интерес представляет анализ различий в экспрессии генов (формирование ответа) после воздействия ионизирующей радиации между контрольными и Dsup-экспрессирующими организмами. Для таких оценок могут быть использованы метод гибридизации на микрочипах, который широко используется в ЛЯП ОИЯИ (Affymetrix), и RNA-seq, которое тоже проводилось в ЛЯП ОИЯИ. Отдельный интерес представляет изучение на уровне транскриптомов разной радиочувствительности между самцами и самки исходной линии y^1w^{1118} , которая была выявлена в ходе уже проведенных экспериментов.

6. Изучение распределения гибридного белка GFP-Dsup на политенных хромосомах *D.melanogaster*

Для понимания механизмов работы белка Dsup важной является оценка его распределения на хромосомах. Оптимальным методом для быстрой оценки такого распределения является иммуноокрашивание политенных хромосом *D. melanogaster*. Иммуноокрашивание планируется проводить для линий *D.melanogaster*, экспрессирующих гибридный белок GFP-Dsup, кроличьими поликлональными антителами к белку GFP, с последующей детекцией вторичными антителами, мечеными Alexa Fluor 488. В случае равномерного распределения белка Dsup на хромосомах можно говорить о неспецифическом защитном

механизме действия этого белка. В случае неравномерного распределения – необходим анализ районов, в которых происходит связывание белка Dsup, для выявления закономерностей связывания. Также важно оценить возможное изменение степени компактизации политенных хромосом в случае связывания с ними белка Dsup.

7. Изучение продолжительности жизни линий *D.melanogaster*, экспрессирующих Dsup

В связи с предполагаемой способностью белка Dsup связываться с нуклеосомами, интересно оценить влияние возможных изменений в компактизации хроматина на функционирование всего организма. Помимо транскриптомного анализа это может позволить сделать анализ продолжительности жизни *D.melanogaster* исходной линии и линии, содержащей Dsup. Подобные исследования требуют значительного количества самцов и самок исследуемых линий и занимают более 3-4 месяцев с непрерывной оценкой количества погибших/живущих особей.

8. Создание экспрессионного вектора для продуцирования белка Dsup в клетках *E.coli*, выделение и очистка белка Dsup для предварительных экспериментов по его кристаллизации

Поскольку вторичная структура белка Dsup до сих пор не исследована, интересным представляется экспрессия белка Dsup в культуре *E.coli* с последующей его очисткой и попыткой кристаллизации или анализа с использованием методов спектрометрии. Определение вторичной структуры белка позволит сделать предположение о механизмах его связывания с ДНК и/или другими белками и смоделировать различные сценарии механизмов его действия.

Исполнители проекта

Среди исполнителей работ: 3 кандидата биологических наук с большим опытом работы в молекулярной генетике, молекулярной биологии и радиобиологии, владеющие всеми перечисленными в проекте методами (ОИЯИ и Институт биологии развития им. Кольцова РАН), 2 аспиранта (факультет Биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова и Иркутский государственный университет), сотрудники ЛЯП ОИЯИ.

Е.В. Кравченко - 1 FTE, А.В. Рязина – 0.5 FTE, О.И. Кравчук – 0,5 FTE, М.П. Зарубин - 1 FTE, О.А. Кулдошина - 1 FTE, А.Н. Русакович – 1 FTE, А.С. Яхненко – 0,5 FTE, А.Е. Иванова - 1 FTE.

Краткий ССВУ – анализ

Сильные стороны проекта: у авторов имеются наработки, позволяющие в заявленные сроки выполнить задачи проекта; ОИЯИ обладает ускорителями, позволяющими получить заявленные дозы и типы излучений; ЛЯП ОИЯИ обладает значительной частью требуемого для выполнения проекта оборудования; часть экспериментальных данных уже получена; в составе коллектива помимо опытных специалистов присутствуют аспиранты и молодые ученые

Слабые стороны проекта: высокая конкуренция в данной области исследований с научными коллективами из других стран

6. ПЛАН-ГРАФИК

Работ по Проекту **Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293T**

Этапы работы	Содержание работ
2021 г.	Определение локализации конструкций, содержащих Dsup, в геноме <i>D.melanogaster</i> . Проведение сеансов облучения линий <i>D.melanogaster</i> , экспрессирующих Dsup и исходных линий, в 3-5 повторах γ -квантами на ускорителе МТ-25 ЛЯР ОИЯИ в дозе 1000 Гр с оценкой выживаемости и продолжительности жизни. Проведение эксперимента по оценке влияния белка Dsup на продолжительность жизни <i>D.melanogaster</i> в нормальных условиях по сравнению с исходной линией. Создание молекулярно-генетической конструкции для экспрессии в <i>D. melanogaster</i> гибридного белка GFP-Dsup. Транскриптомный анализ ответа линий <i>D. melanogaster</i> , содержащих Dsup, и исходной линии в нормальных условиях и после воздействия ионизирующего излучения
2022 г.	Создание клеточной линии HEK293T, стабильно экспрессирующей гибридный белок (fusion protein) GFP-Dsup. Проведение экспериментов по оценке влияния белка Dsup на радиорезистентность этой клеточной линии с построением дозовой зависимости (протоны, тяжелые ионы). Транскриптомный анализ клеточной линии HEK293T, стабильно экспрессирующей гибридный белок (fusion protein) GFP-Dsup, и исходной линии HEK293T в нормальных условиях и после воздействия ионизирующего излучения. Микроинъектирование конструкции для экспрессии гибридного белка GFP-Dsup в эмбрионы <i>D.melanogaster</i> , получение линий, несущих GFP-Dsup
2023 г.	Оценка распределения гибридного белка GFP-Dsup с помощью иммунофлуоресцентного анализа на политенных хромосомах <i>D.melanogaster</i> . Создание экспрессионного вектора для продуцирования белка Dsup в клетках <i>E.coli</i> , выделение и очистка белка Dsup для предварительных экспериментов по его кристаллизации.

Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления Проекта
**Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на
 модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293T**

Требуемое оборудование, источники финансирования		Стоимость (тыс.\$)	1 год 2021	2 год 2022	3 год 2023
Оборудование	1. Гомогенизатор с принадлежностями	20	20	-	-
	2. Орбитальный шейкер	1	1	-	-
	3. Ротационный перемешиватель	1	1	-	-
	4. Термостат	2	2	-	-
	5. Центрифуга	11	11	-	-
	6. Автоматический внешний переключатель баллонов CO ₂	5	5	-	-
Источники финансирования	Затраты из бюджета	40	40	0	0

РУКОВОДИТЕЛЬ ТЕМЫ



Г.В. Мицын

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА



Е.В.Кравченко

Смета затрат по Проекту

Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293T

№	Наименование статей затрат	Полная стоимость	2021 год	2022 год	2023 год
	Прямые расходы на Проект				
1	Материалы (тыс.\$)	100	40	30	30
2	Оборудование (тыс.\$)	40	40	-	-
3	Командировочные расходы(тыс.\$)	20	6	7	7
	Итого по прямым расходам:	160			

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА



Е.В. Кравченко

ДИРЕКТОР ЛЯП



В.А. Бедняков

ПОМОЩНИК ДИРЕКТОРА ЛЯП
ПО ЭКОНОМИЧЕСКИМ И ФИНАНСОВЫМ
ВОПРОСАМ



Г.А. Усова