

Тема 1132, проект “Изучение радиопротекторных свойств белка Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D.melanogaster* и культуре клеток человека HEK293”.

Целью данного проекта является изучение радиопротекторных свойств нового уникального белка тихоходок Damage suppressor (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293 и исследование механизмов действия этого белка. В течение 2021-2022 гг были выполнены следующие задачи:

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

Ранее нами были получены линии *D.melanogaster*, стабильно экспрессирующие Dsup. Для них всех был выполнен пероксидный тест с оценкой выживаемости по сравнению с контрольной линией. Все протестированные линии, экспрессирующие Dsup, показали лучшую выживаемость ($p < 0,01$), чем контрольная линия, что свидетельствует о повышении устойчивости к активным формам кислорода. На основе полученных данных была выбрана одна гомозиготная линия, экспрессирующая Dsup, с локализацией инсерции на второй хромосоме, для которой был проведен анализ выживаемости после облучения γ -квантами в дозе 500 Грэй (Рис.1). Облучение проводили в ЛЯР ОИЯИ на установке МТ-25, набор дозы происходил со скоростью 300 mGy s-1.

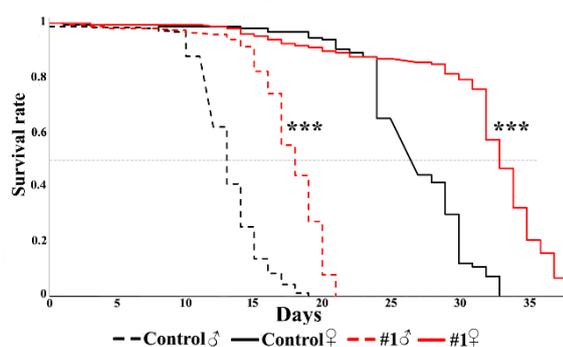


Figure 1. Impact of Dsup on survival rate of Dsup expressing (#1) and control lines after irradiation with γ -rays at a dose of 500 Gy (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0,001$).

Анализ кривых выживаемости говорит о значительном увеличении радиорезистентности по сравнению с контрольной линией (Рис.1) - функция выживания (Колмогорова-Смирнова, $p < 0,001$), средняя продолжительность жизни (критерий Уилкоксона-Бреслоу-Геана, $p < 0,001$), максимальная продолжительность жизни (U-критерий Манна-Уитни,

$p < 0,01$) и возраст 90% смертности (критерий Ванга-Эллисона, $p < 0,05$) после облучения статистически достоверно выше у линии, экспрессирующей Dsup.

2. Оценка радиорезистентности культуры клеток человека HEK293, экспрессирующей Dsup

Ранее созданным нами вектором была трансфицирована культура клеток человека HEK293 и с помощью стандартной селекции на генетичине была получена стабильная линия клеток, экспрессирующая Dsup. Контрольную линию клеток HEK293 и линию, экспрессирующую Dsup, облучали протонами с энергией 150 МэВ в дозе 4 Гр (ЛЯП ОИЯИ, Фазотрон). Оценка выживаемости клеток после облучение показало значительное повышение радиорезистентности ($p < 0,001$) в клетках линии, экспрессирующей Dsup (Рис.2).

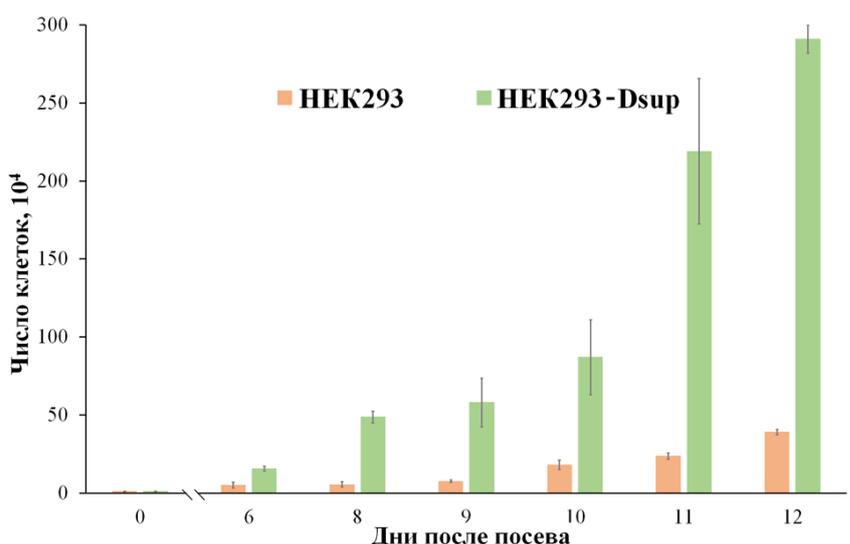


Figure 2. Histogram of cell numbers in HEK293 (orange) and HEK293-Dsup (green) cell culture after irradiation with 150 MeV protons at a dose of 4 Gy.

Исходя из полученных данных можно заключить, что белок тихоходок Dsup способен повышать устойчивость сложных комплексных организмов, таких как *D. melanogaster*, к воздействию ионизирующего излучения (γ -кванты) и активных форм кислорода (перекись водорода). На модели клеток человека также зарегистрировано значительное увеличение выживаемости после облучения протонами в присутствии в клетках белка Dsup.

3. Продуцирование белка Dsup в клетках *E.coli*, выделение и очистка белка Dsup для экспериментов по определению его вторичной структуры. Определение вторичной структуры белка Dsup методами SAXS и SANS.

Для понимания механизмов действия белка Dsup важным является определение его структуры. Ранее было показано, что Dsup способен неспецифически связываться с ДНК, поэтому определение характеристик структуры этого белка даст ответ на вопрос каким способом может происходить это связывание. Нами было проведено молекулярное моделирование структуры Dsup, состоящего из 445 аминокислот, с помощью платформы I-Tasser, которое предполагает наличие вторичной структуры у этого белка (Рис.3).



Figure 3. Dsup protein structure model (I-Tasser).

Для проведения экспериментов по определению структуры белка Dsup культура клеток *E.coli* была трансформирована вектором pCold-I-Dsup (#90021), полученным из некоммерческой организации Addgene. Продуцированный культурой белок был очищен, сконцентрирован и проанализирован методами SAXS (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ, ESRF Гренобль, Франция), SANS (ЛНФ ОИЯИ) и DLS (ЛНФ ОИЯИ). На основе экспериментальных данных малоуглового рассеивания была получены первые результаты о структуре и пространственных размерах белка Dsup (рис.4).

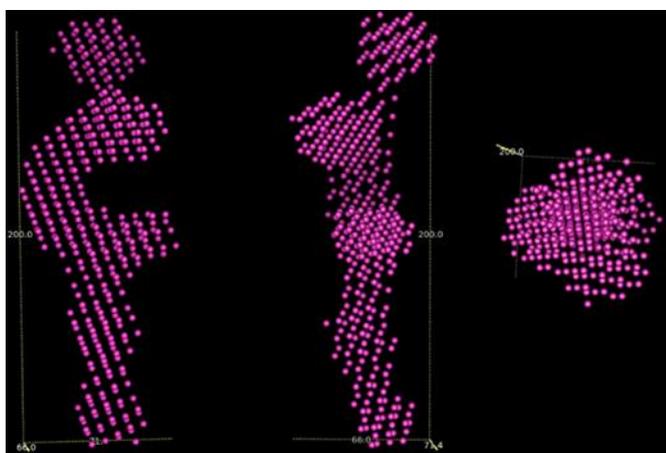


Figure 4. Model of Dsup structure derived from experimental data (DAMMIF package).

Список публикаций и конференций, на которых были представлены полученные результаты:

1. The tardigrade Dsup (damage suppressor) protein enhances radioresistance and oxidative stress tolerance of *D.melanogaster* and acts as an unspecific repressor of transcription
2. Unique Radioprotective Damage Suppressor protein (Dsup): Comparative Sequence Analysis M. Zarubin, O. Kuldoshina, E. Kravchenko. Particles and Nuclei, Letters (PEPAN Letters), 2022, 19(3) (accepted for publication)
3. M. Zarubin, E. Kravchenko. Effect of radioprotective damage suppressor protein (Dsup) on non-irradiated and exposed to various types of ionizing radiation *D. melanogaster* at transcriptome and physiological levels, 45th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS). Ljubljana, Slovenia. 3-8 July 2021
4. Mikhail Zarubin, Anna Rzyanina, Elena Kravchenko. Radioprotective Damage suppressor protein (Dsup) in model organisms: from transcriptome and physiology to molecular structure. 13th European Biophysics Conference, Vienna, Austria. 24-28 July 2021
5. Kuldoshina O.A., Zarubin M.P., Kravchenko E.V. Effects of radioprotective Dsup protein (Damage suppressor) on the resistance of *D. melanogaster* to various doses of ionizing radiation. Meeting in Nor Amberd: Fifth International Conference, Dedicated to N. W. Timofeeff-Ressovsky and His Scientific School “Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution”, Nor Amberd, 5–10 Oct. 2021, Armenia.