

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

УСЛОВНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ПРОЕКТА - Dsup

ШИФР ТЕМЫ 1132

Т.О. Азорская ЛЯП ОИЯИ, М.П. Зарубин ЛЯП ОИЯИ, Е.В. Кравченко ЛЯП ОИЯИ,
О.А. Кулдошина ЛЯП ОИЯИ, Т.Н. Муругова ЛНФ ОИЯИ, А.В. Рзянина ЛЯП ОИЯИ,
К.А. Тарасов ЛЯП ОИЯИ, А.С. Яхненко ЛЯП ОИЯИ

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

Е.В. Кравченко

ЗАМЕСТИТЕЛЬ РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА

А.В. Рзянина

ДАТА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ПРОЕКТА В НОО _____

ДАТА НТС ЛАБОРАТОРИИ _____НОМЕР ДОКУМЕНТА

ДАТА НАЧАЛА ПРОЕКТА 01.01.2023

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	_____	2022
СОГЛАСОВАНО		
ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ОИЯИ	_____	2022
ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ	_____	2022
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР	_____	2022
НАЧАЛЬНИК НОО	_____	2022
ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ	_____	2022
ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ	_____	2022
РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА	_____	2022
ЗАМ. РУКОВОДИТЕЛЯ ПРОЕКТА	_____	2022
ОДОБРЕН		
ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ ФИЗИКА КОНДЕНСИРОВАННЫХ СРЕД	_____	2022

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
1. Производство белка Dsup в клетках <i>E.coli</i> , выделение и очистка белка Dsup	11
2. Определение вторичной структуры белка Dsup с помощью методов SAXS, DLS и кругового дихроизма	11
3. Оценка в клетках культуры человека HEK293, экспрессирующих Dsup, метаболической активности (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определение уровня активных форм кислорода в клетках.	12
Исполнители, ССВУ-анализ.....	12
План-график работ	13
Смета затрат.....	14
Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления Проекта	15

Аннотация

Целью данного проекта является изучение свойств нового радиопротекторного белка тихоходок Damage suppressor (Dsup) и исследование механизмов его действия. Белок Dsup является новым белком, открытым в 2016 году в тихоходке *Ramazzottius varieornatus* – одном из самых радиорезистентных видов многоклеточных организмов. В ходе выполнения проекта в 2021-2022 годах нами были созданы линии *D. melanogaster* и культура клеток человека HEK293, экспрессирующие данный белок, для которых мы показали значительное увеличение радиорезистентности в ходе облучения разными видами ионизирующего излучения. Проведенные первые эксперименты по определению структуры белка Dsup показали наличие возможной вторичной структуры. Поэтому данный проект является продолжением исследований в этих направлениях. Будут продолжены эксперименты по установлению вторичной структуры белка в нативных и денатурирующих условиях. Для понимания действия белка Dsup в живых клетках в культуре клеток человека HEK293 будет проведена оценка устойчивости к цитотоксическому действию протонного излучения с помощью оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определения уровня активных форм кислорода в клетках. Для решения данных задач нами будет использован широкий спектр молекулярно-биологических методов: в частности, методы SAXS, DLS и кругового дихроизма, продуцирование, очистка и хроматография белка, различные биохимические тесты, описывающие состояние культуры клеток. Решаемые в ходе выполнения проекта задачи являются новыми и важным не только для фундаментальной молекулярной биологии и радиобиологии, но и для прикладных направлений биотехнологии, космических исследований и других дисциплин, требующих повышения уровня радиорезистентности организмов.

Запрашиваемый бюджет проекта на 2023 год 40 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.). В ходе реализации проекта в 2021-2022 годах нами были получены линии *D.melanogaster* и культура клеток человека HEK293, экспрессирующие Dsup, для которых было показано увеличение радиорезистентности. С помощью транскриптомного анализа нами были установлены гены, изменившие свою активность в линиях дрозофилы в случае присутствия в клетках белка Dsup и облучения таких линий гамма квантами.

В ходе дальнейшей реализации проекта в 2023 году впервые предполагается установить вторичную структуру белка Dsup с помощью методов SAXS, DLS и кругового дихроизма (совместно с ЛНФ ОИЯИ и МФТИ), что позволит описать молекулярный механизм действия этого белка в ходе его взаимодействия с нуклеиновыми кислотами. Для культуры клеток человека планируется впервые получить данные об устойчивости линий, экспрессирующих Dsup, к цитотоксическому действию протонного излучения с помощью оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определить уровень активных форм кислорода в клетках. 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*).

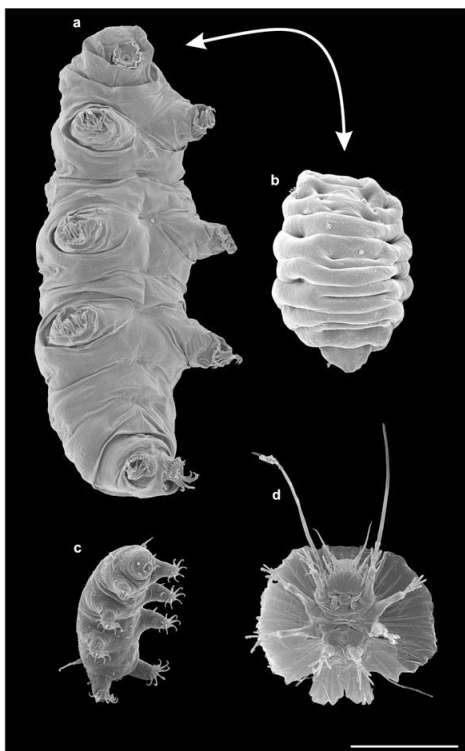


Рис.1. Сканирующая электронная микроскопия некоторых видов тихоходок. a,b *Richtersius coronifer* в гидратированном и ангидробиотическом состояниях. c - *Isoechiniscoides sifae*. d – *Actinarctus cf. doryphorus* (вентральный вид). Scale bar = 100 μm . Воспроизведено из Water Bears: The Biology of Tardigrades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

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 домиксных 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 HEK239 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, трансфецированных 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 нетрансфецированным 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, демонстрировала 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 гистонподобных 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 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. В ходе реализации проекта в 2023 году планируется выполнить следующие задачи

1. Производство белка Dsup в клетках *E.coli*, выделение и очистка белка Dsup

Поскольку вторичная структура белка Dsup до сих пор не исследована, важным является экспрессия белка Dsup в культуре *E.coli* с последующей его очисткой и анализом пространственных характеристик и возможной вторичной структуры. Определение вторичной структуры белка позволит сделать предположение о механизмах его связывания с ДНК и/или другими белками и смоделировать различные сценарии механизмов его действия. В ходе выполнения проекта в 2021-2022 годах нами была отработана методика продуцирования белка в клетках *E.coli* с использованием вектора pCold-I-Dsup (Addgene plasmid # 90021, Hashimoto et al. 2016) с последующей очисткой и концентрированием белка Dsup. Показано, что белок Dsup в концентрированных растворах способен образовывать агрегаты, поэтому для получения мономерной фракции необходима его дополнительная очистка с помощью эксклюзионной хроматографии (size-exclusion chromatography). С использованием этих методов нами стабильно продуцируются чистые растворы белка Dsup с концентрациями 0.5 – 5 мг/мл, необходимые для выполнения дальнейших задач проекта.

2. Определение вторичной структуры белка Dsup с помощью методов SAXS, DLS и кругового дихроизма

Очищенный белок Dsup может быть использован для определения его пространственных характеристик и возможной вторичной структуры. В ходе анализа методом SAXS (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ, ESRF Гренобль, Франция) на основе экспериментальных данных малоуглового рентгеновского рассеивания были получены первые результаты о пространственных размерах белка Dsup (рис. 2).

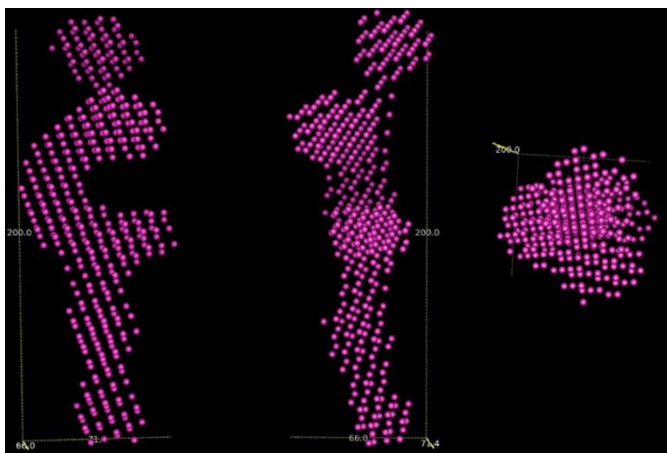


Рис.2. Model of Dsup structure derived from experimental data (DAMMIF package).

Также эти данные свидетельствуют о том, что Dsup не относится к глобулярным белкам и возможно присутствие вторичной структуры. Для уточнения вторичной структуры белка Dsup необходимо провести измерения с помощью методов кругового дихроизма, DLS и SAXS в нативных и денатурирующих условиях. Эксперименты будут проведены в 2023 году с использованием оборудования ЛНФ ОИЯИ и МФТИ.

3. Оценка в клетках культуры человека HEK293, экспрессирующих Dsup, метаболической активности (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определение уровня активных форм кислорода в клетках.

Для культуры клеток человека планируется впервые получить данные об устойчивости линий, экспрессирующих Dsup, к цитотоксическому действию протонного излучения с помощью оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определить уровень активных форм кислорода в клетках. Полученные данные помогут описать на уровне клеточного метаболизма ряд параметров, на которые может оказывать присутствие радиопротекторного белка Dsup.

Исполнители проекта

Среди исполнителей работ: 3 кандидата биологических наук с большим опытом работы в молекулярной генетике, радиобиологии и биофизики, владеющие всеми перечисленными в проекте методами, 1 аспирант (Иркутский государственный университет), сотрудники ЛЯП и ЛНФ ОИЯИ.

Т.О. Азорская – 1 FTE, М.П. Зарубин – 1 FTE, Е.В. Кравченко – 1 FTE, О.А. Кулдошина – 1 FTE, А.В. Рзянина – 0.5 FTE, Т.Н. Муругова - 0.3 FTE, К.А. Тарасов – 1 FTE, А.С. Яхненко – 1 FTE.

Краткий ССВУ – анализ

Сильные стороны проекта: у авторов имеются наработки, позволяющие в заявленные сроки выполнить задачи проекта; ОИЯИ (ЛЯП И ЛНФ) и МФТИ обладают всем требуемым для выполнения проекта оборудованием; часть экспериментальных данных уже получена; в составе коллектива помимо опытных специалистов присутствуют аспиранты и молодые ученые

Слабые стороны проекта: возможны проблемы, связанные с поставками реагентов и сред для проведения экспериментов на культуре клеток.

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
2023 г.	<ol style="list-style-type: none"><li data-bbox="411 595 1436 667">1. Продуцирование белка Dsup в клетках <i>E.coli</i>, выделение и очистка белка Dsup.<li data-bbox="411 674 1436 745">2. Определение вторичной структуры белка Dsup с помощью методов SAXS, DLS и кругового дихроизма<li data-bbox="411 752 1436 902">3. Оценка в клетках культуры человека HEK293, экспрессирующих Dsup, метаболической активности (МТТ-тест) и индукции апоптоза (по активности каспаз-3/7), определение уровня активных форм кислорода в клетках.

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 2023
Оборудование	1. Центрифуга	10	10
Источники финансирования	Затраты из бюджета	10	10

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	2023 год
	Прямые расходы на Проект		
1	Материалы (тыс.\$)	27	27
2	Оборудование (тыс.\$)	10	10
3	Командировочные расходы(тыс.\$)	3	3
	Итого по прямым расходам:	40	

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА

Е.В. Кравченко

ДИРЕКТОР ЛЯП

В.А. Бедняков

ПОМОЩНИК ДИРЕКТОРА ЛЯП
ПО ЭКОНОМИЧЕСКИМ И ФИНАНСОВЫМ
ВОПРОСАМ

Г.А. Усова