

Изучение радиопротекторных свойств белка *Damage suppressor* (Dsup) на модельном объекте *D. melanogaster* и культуре клеток человека HEK293

УСЛОВНОЕ ОБОЗНАЧЕНИЕ ПРОЕКТА – Dsup

начат 01.01.2021

Тихоходки (Tardigrada)



Обнаружены во всех биомах от Арктики до Антарктики, на вершинах гор, в глубоководных источниках и холодных грязевых источниках на западе Гренландии.

Тихоходки имеют хорошо развитую нервную систему, в которой выделяется мозг, мышечную, пищеварительную и др. системы, состоящие из дифференцированных тканей.



<https://giphy.com/fitenergeticcentrigrandwhitesetter>

Tardigrada относятся к группе наиболее устойчивых к радиации животных на Земле, способных выживать после воздействия как редко- так и плотно ионизирующего излучения

Устойчивость к γ -излучению для некоторых видов организмов

Организм	LD ₅₀ или другие имеющиеся данные	Автор
Номо sapiens	LD _{50/30d} = 2.5–4.5 Gy	Bolus (2001)
Мышь	LD _{50/30d} = 4.5 Gy	Bolus (2001)
Золотая рыбка	LD _{50/30d} = 8 Gy	Bolus (2001)
Таракан	LD _{50/30d} = 50 Gy	Bolus (2001)
<i>Drosophila melanogaster</i> (Insecta)	LD _{50/3} = 1238–1339 Gy	Parashar et al. (2008)
<i>Deinococcus radiodurans</i> (Bacteria)	LD ₅₀ = 10000 Gy	Makarova et al. (2001)
<i>Escherichia coli</i> (кишечная палочка) (Bacteria)	LD ₅₀ = 600 Gy	Krisko and Radman (2010)
Tardigrades	LD ₅₀ = 1270–5000 Gy	Hashimoto and Kunieda (2017)

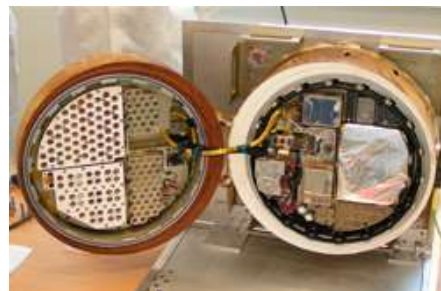
Тихоходки - модельный организм для изучения влияния космических условий на живые организмы

FOTON-M3 mission

TARDIS (Jönsson et al., 2008), RoTaRad (Persson et al., 2011), TARSE (Rebecchi et al., 2011, 2009)

TARDIS (Tardigrades in Space) тихоходки 10 дней находились в условиях космического вакуума (10^{-6} Pa), воздействия космической радиации (100 мГр) и УФ-излучения.

Воздействие вакуума и космической радиации не оказали на выживаемость существенного влияния (Jönsson et al., 2016, 2008).



<http://teamtardigrades.blogspot.com/>

Current Biology



Correspondence

Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit

K. Ingemar Jönsson¹, Elke Rabbow², Ralph O. Schill³, Mats Harms-Ringdahl⁴, Petra Rettberg²

Experiments to estimate the impact of ionizing radiation on the survival rate of tardigrades



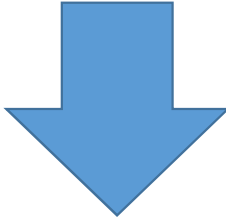
May et al., 1964
x-ray

Jönsson et al., 2005
γ-rays

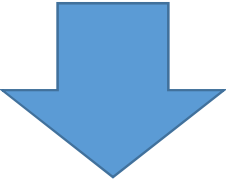
Horikawa et al., 2008, 2006
α-particles

Jönsson and Wojcik, 2017
heavy ions

Nilsson et al., 2010
protons



A high level of radioresistance with $LD_{50} = 4-10$ kGy, depending on the type of radiation and the type of tardigrades involved in the experiment
Actively dividing embryos - $LD_{50} = 509$ Gy in an experiment using α-particles
(Horikawa et al., 2012)

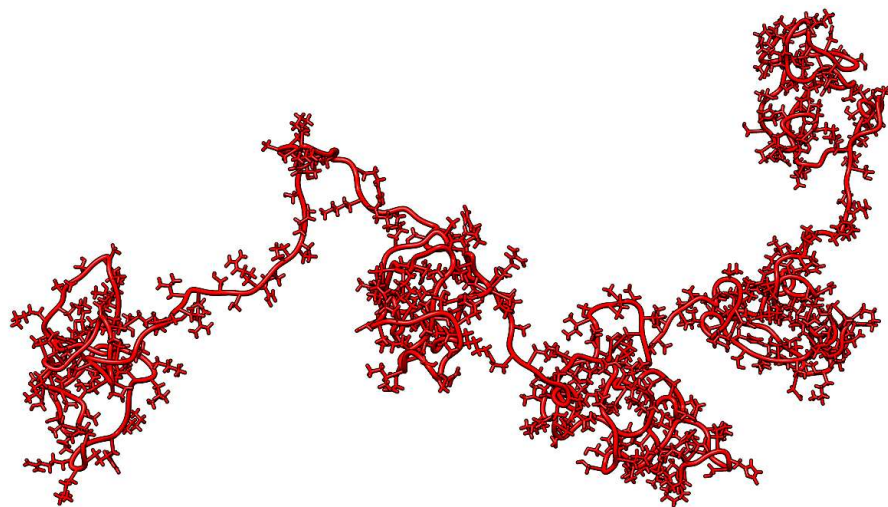


Special protective mechanisms?

Молекулярные механизмы радиорезистентности тихоходок

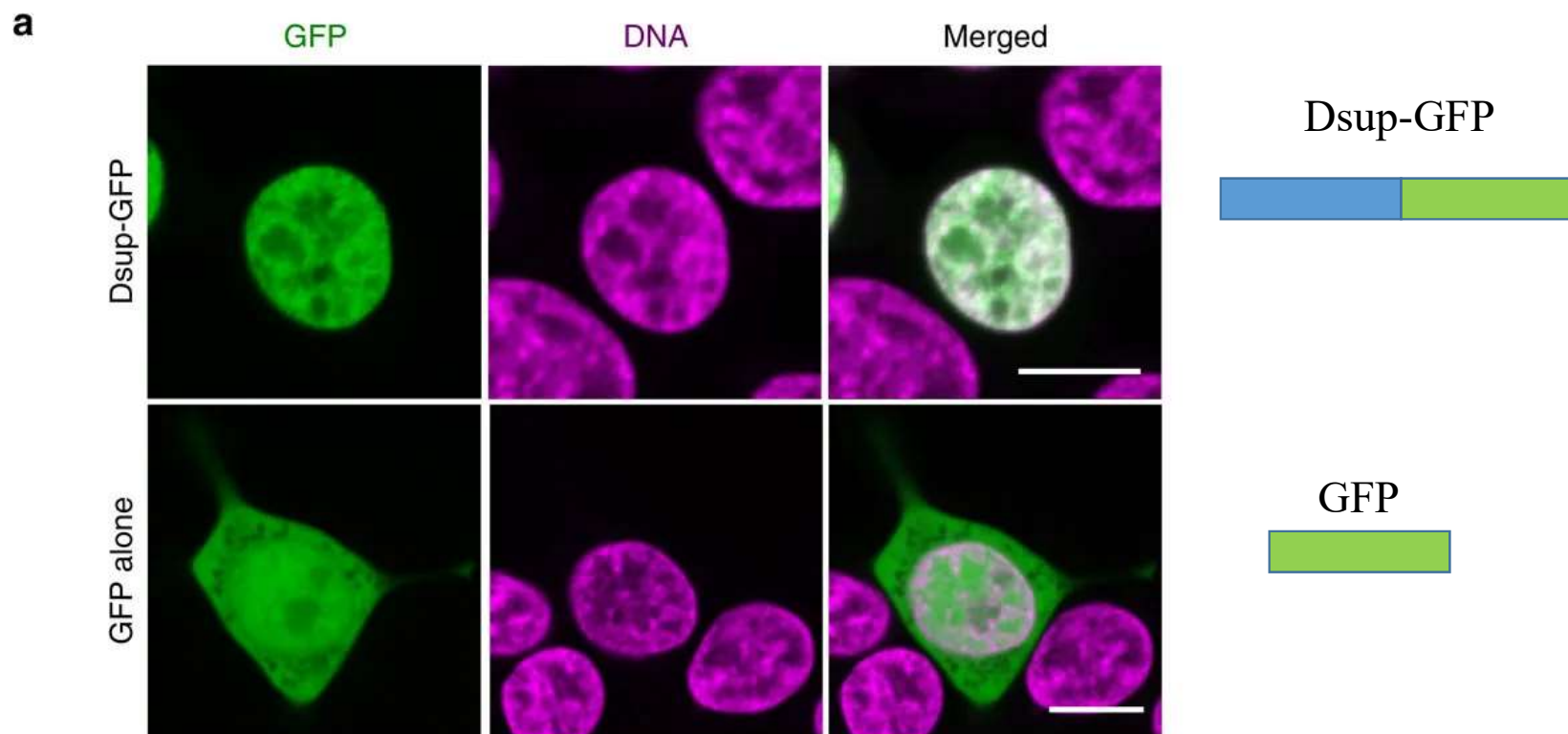
В 2016 году секвенирован геном *Ramazzottius varieornatus* – одного из самых радиорезистентных видов тихоходок (Hashimoto et al., 2016)

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.



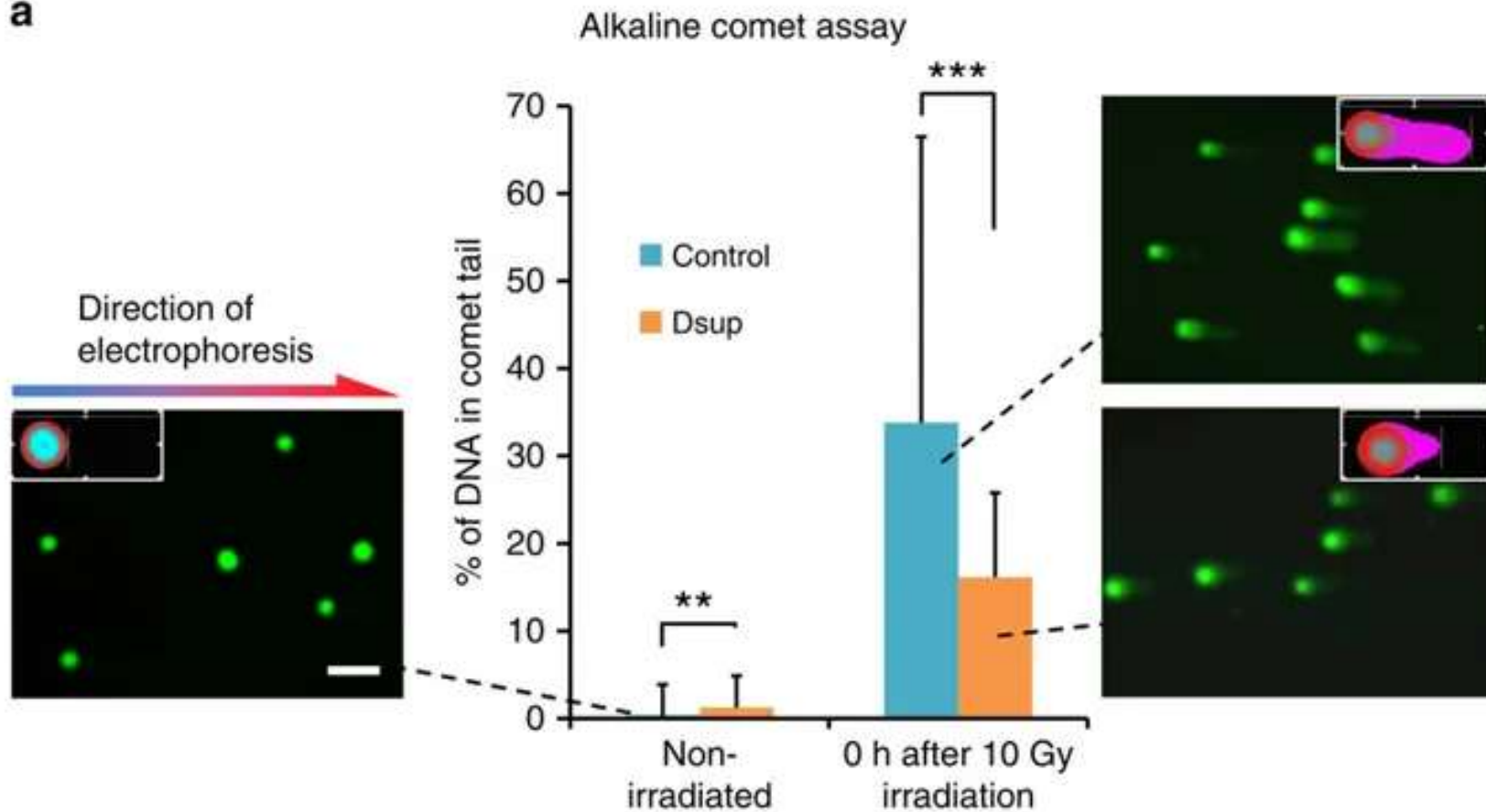
Моделирование с помощью I-TASSER

Hashimoto, T., Horikawa, D., Saito, Y. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. Nat Commun 7, 12808 (2016).



Dsup колокализуется с ядерной ДНК, т.е. работает в ядре

a

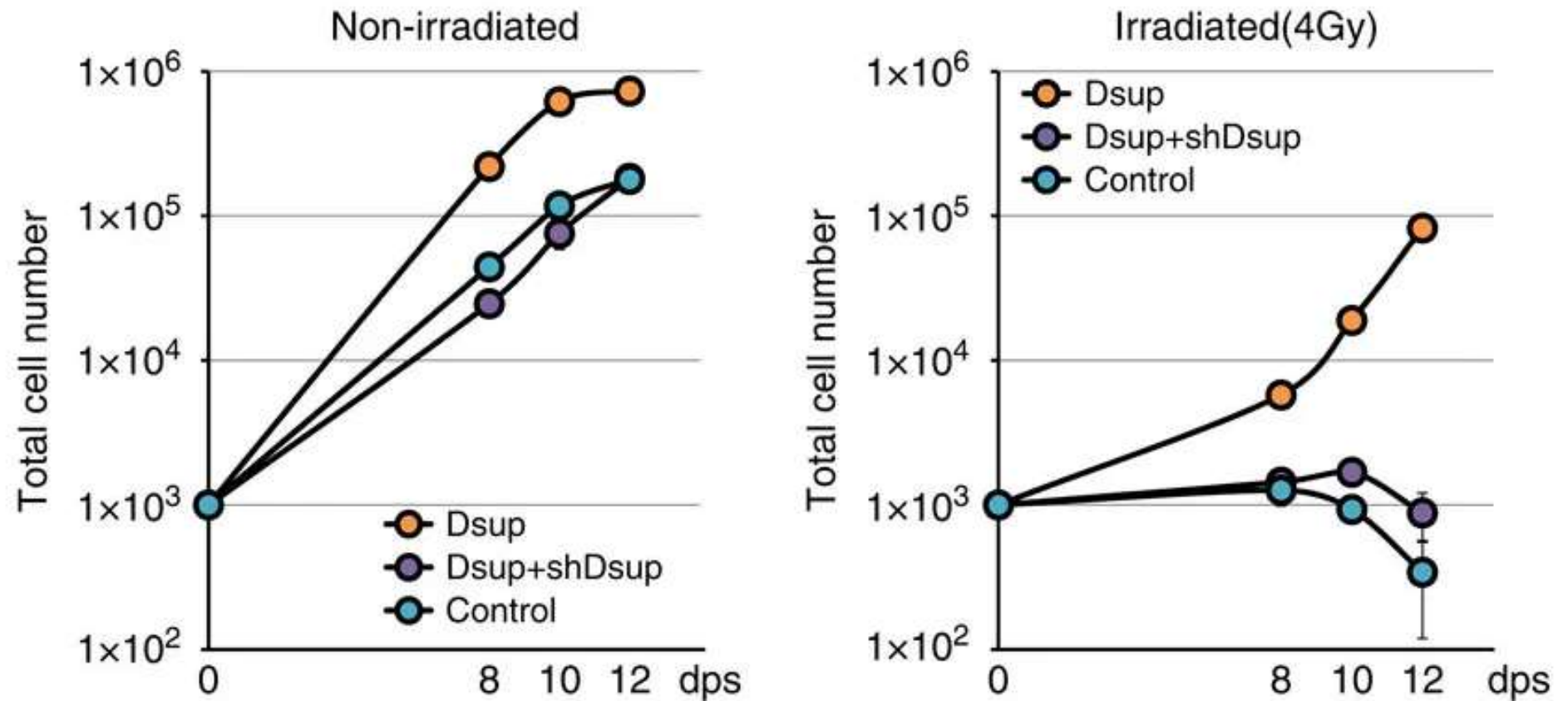


Dsup снижает фрагментацию ДНК в культуре человеческих клеток после воздействия радиации

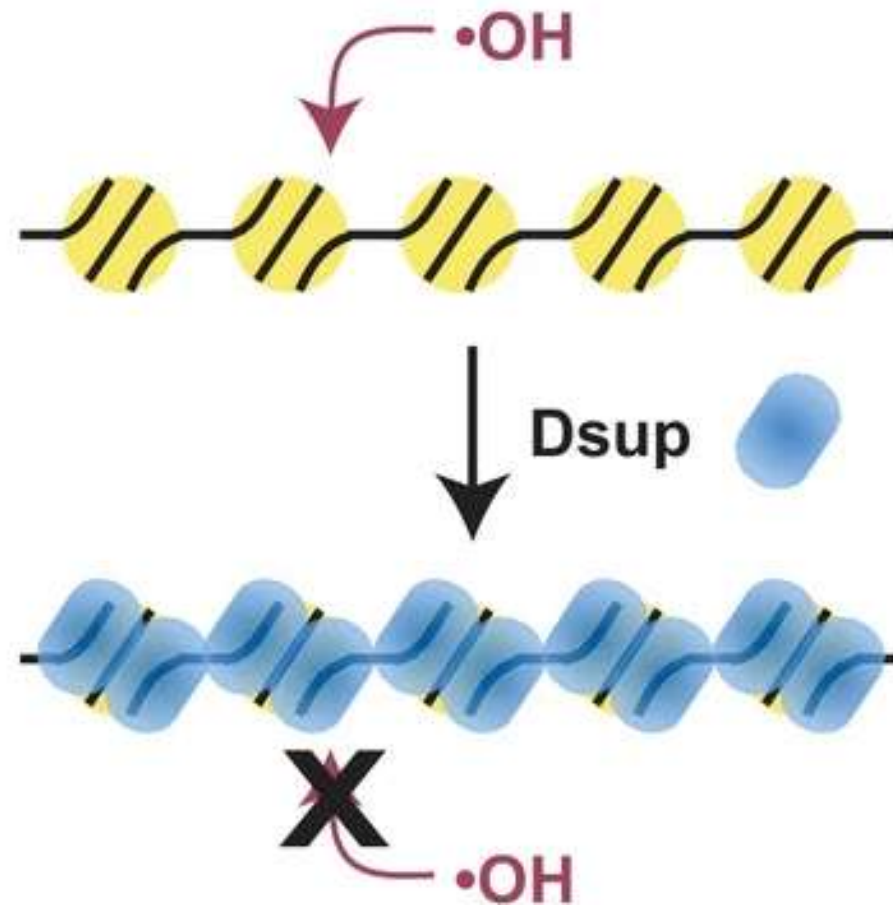
Hashimoto, T., Horikawa, D., Saito, Y. et al. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat Commun* 7, 12808 (2016).

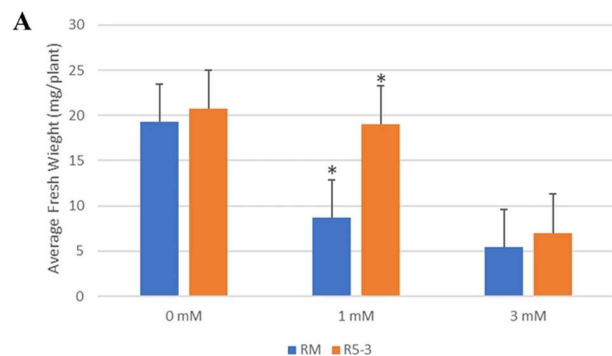
Dsup повышает выживаемость в культуре клеток человека после облучения рентгеновскими лучами

b

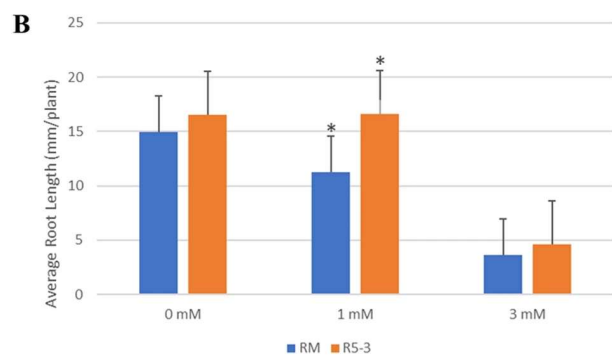


The tardigrade damage suppressor protein binds to nucleosomes and protects DNA from hydroxyl radicals. Elife. 2019. Chavez C, Cruz-Becerra G, Fei J, Kassavetis GA, Kadonaga JT.

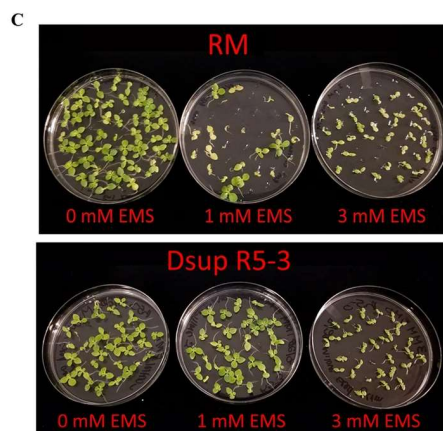




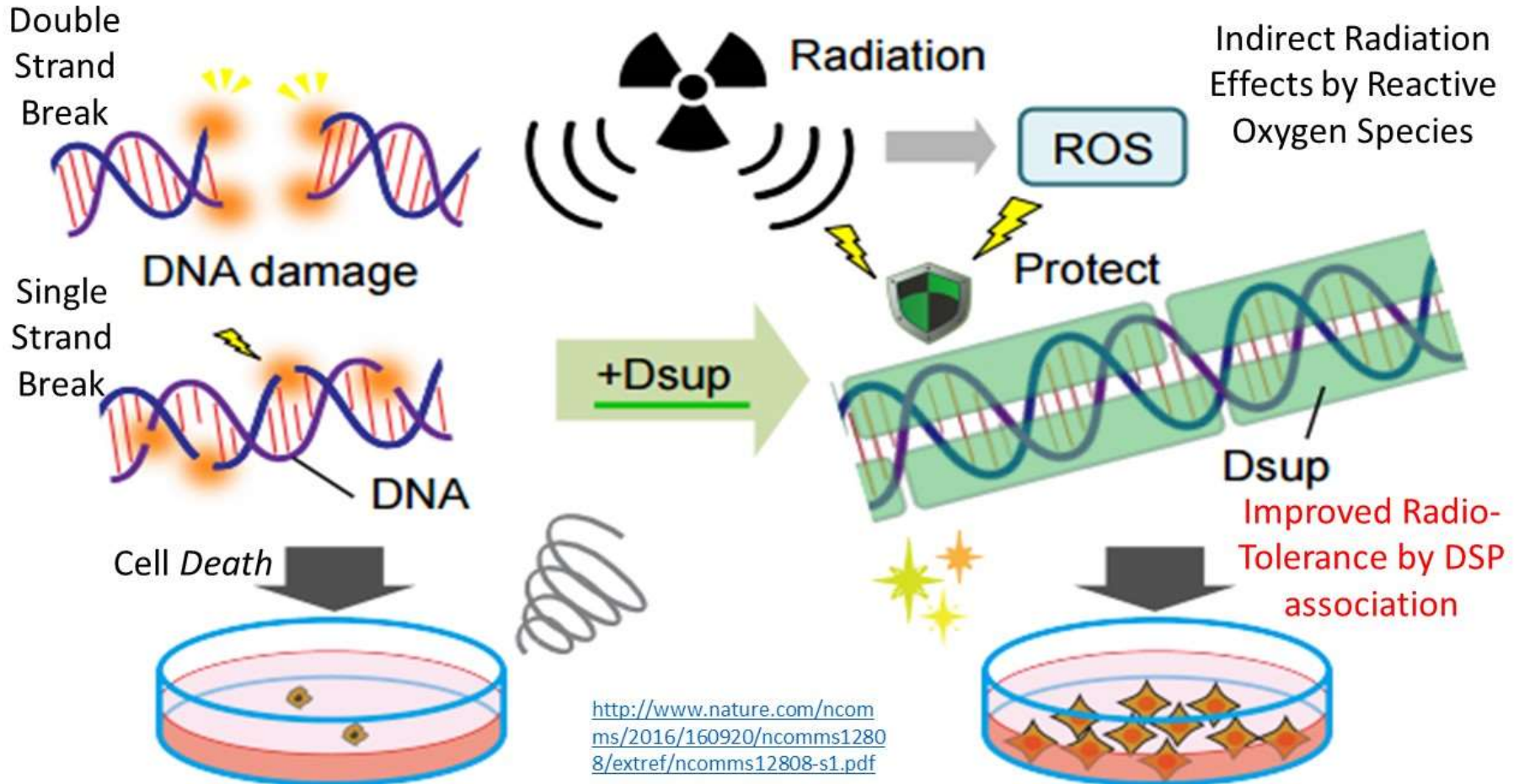
Растения табака, экспрессирующие Dsup, росли лучше контрольных растений на средах, содержащих мутаген этилметан сульфонат (EMS), также после облучения УФ и рентгеновскими лучами.



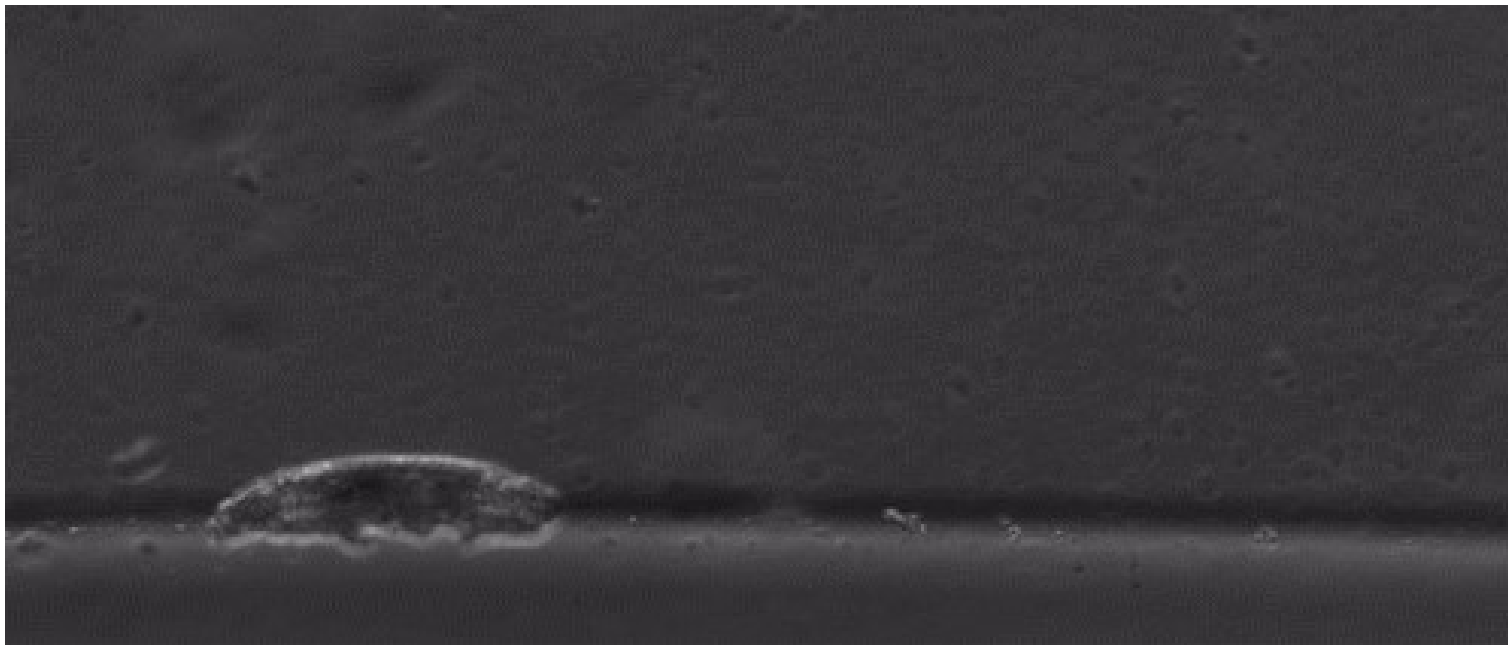
Kirke, J., Jin, XL. & Zhang, XH. Expression of a Tardigrade Dsup Gene Enhances Genome Protection in Plants. *Mol Biotechnol* 62, 563–571 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00273-9>



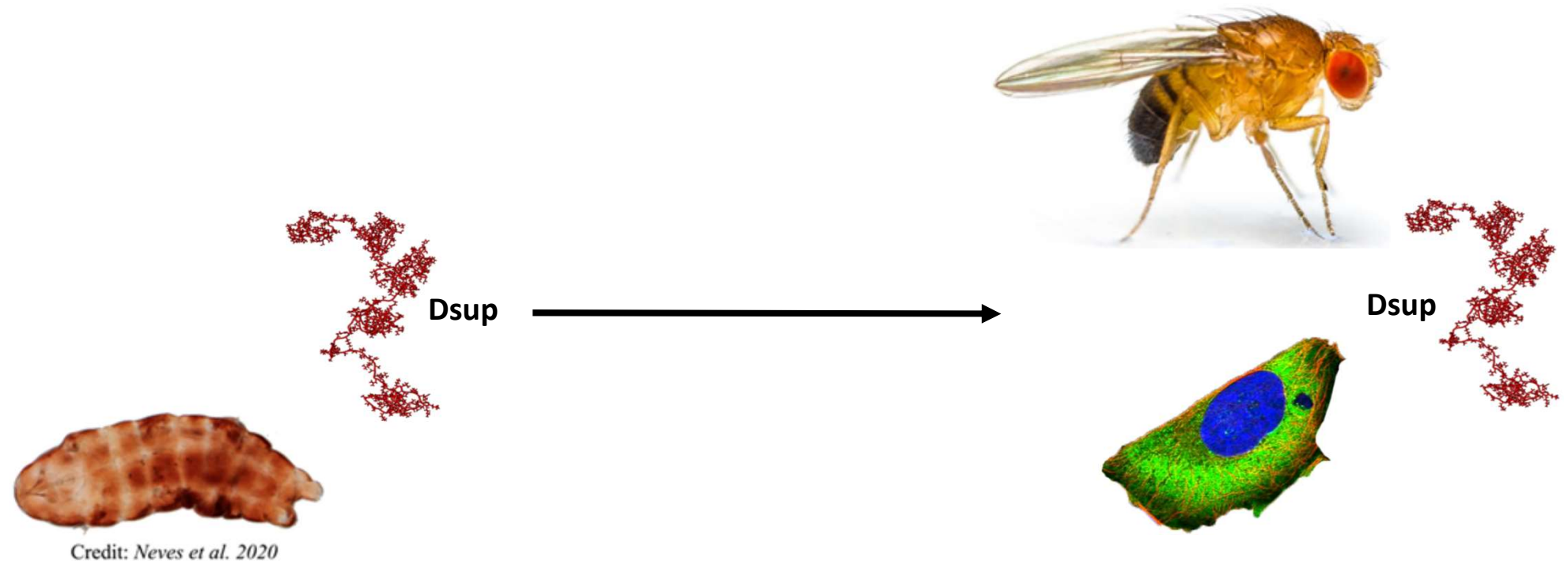
DNA Protection by Dsup Protein from Radiation Damage



- Главными целями наших исследований являются изучение механизмов действия белка Dsup и оценка перспектив его использования для повышения радиорезистентности многоклеточных сложных организмов.



Tardigrades exhibit robust interlimb coordination across walking speeds and terrains Jasmine A. Nirody et al. PNAS 2021



Why is *Drosophila melanogaster* a very common animal model used in genetics studies?



The fruit fly *Drosophila melanogaster* is currently the conceptually best understood animal organism

- Cheap and easy to cultivate in the laboratory
- Contains only 4 chromosomes
- A multicellular organism suitable for simulating many human diseases (Drosophila genome is 60% homologous to that of humans, less redundant, and about 75% of the genes responsible for human diseases have homologs in flies)
- brief generation time (12-14 days), lots of offspring
- availability of powerful genetic tools

An ideal organism for the study of development processes, behavior, neurobiology, genetic diseases and effect of many environmental conditions

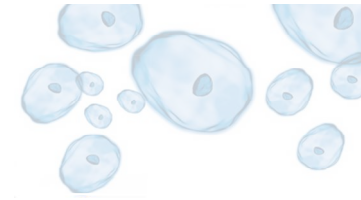


Image Source: J. Craig Venter Institute

NOBEL PRIZE AWARDS FOR FRUIT FLY RESEARCHES:

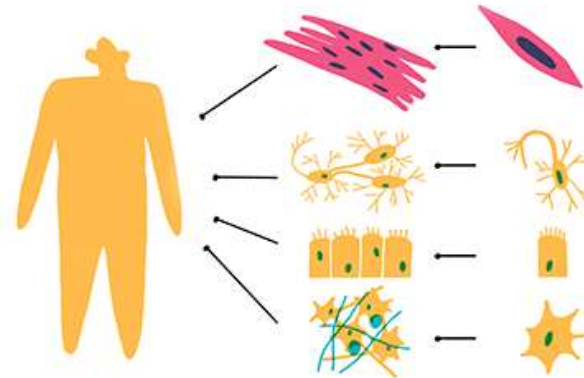
- 1933: Thomas Hunt Morgan – The role played by chromosomes in heredity
- 1946: Hermann Joseph Muller – The production of mutations by means of X-ray irradiation
- 1995: Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, Eric F. Wieschaus – The genetic control of early embryonic development
- 2004 : Richard Axel – Odour receptors and the organization of the olfactory system (mainly rodent work)
- 2011: Jules A. Hoffmann – The activation of innate immunity
- 2017: Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash, Michael W. Young – molecular mechanisms controlling the circadian rhythm

Cell culture model system



BASE ADVANTAGES

- Closest to human model
- No death for research purposes
- Wide range of cultivation conditions can be controlled
- Short-generation period



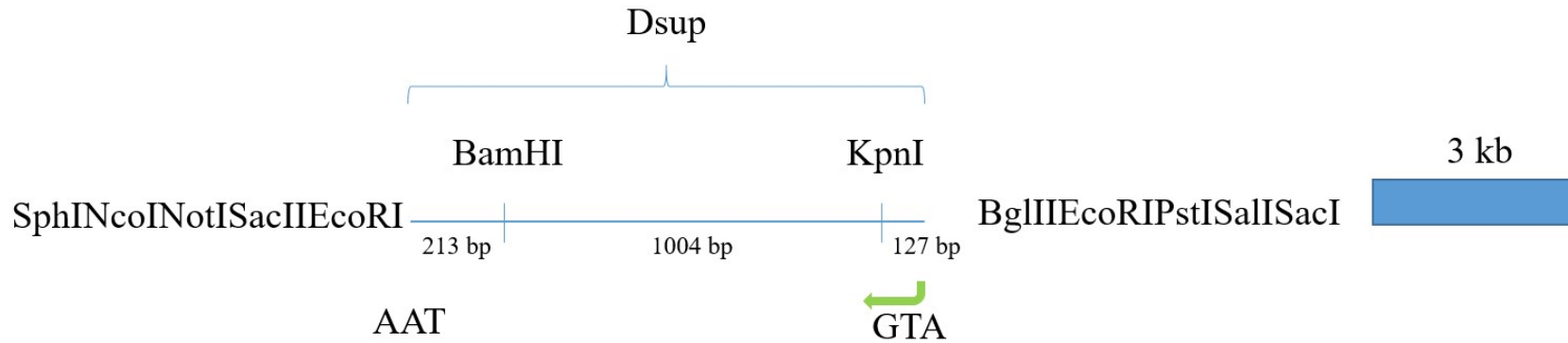
INTERESTING FACTS

- The first successfully cultured cells were Frog nerve fibers
- Polio vaccine was developed through cell culture technique
- First Nobel Prize in cell culture discoveries was awarded to John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller, and Frederick Chapman Robbins, who discovered a method of growing the viruses in monkey kidney cell cultures

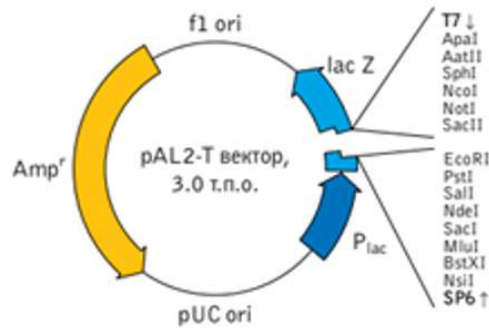
Pictures from: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-kletochnye-tekhnologii>
<https://issuu.com/gabrielprieto3/docs/cellculturebasicseu>

Optimization and synthesis of DNA sequence encoding a Dsup protein

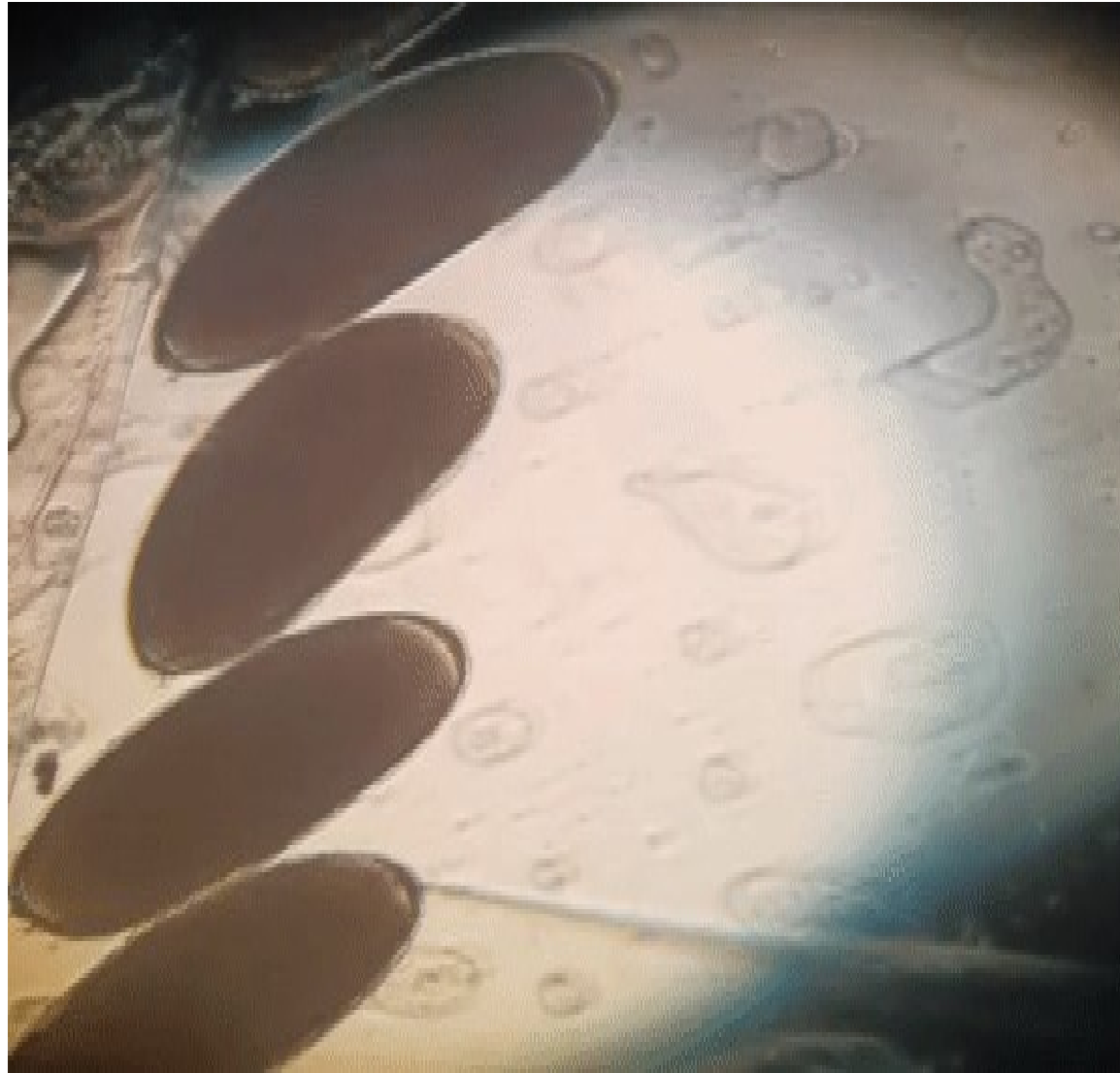
pAL2-Dsup



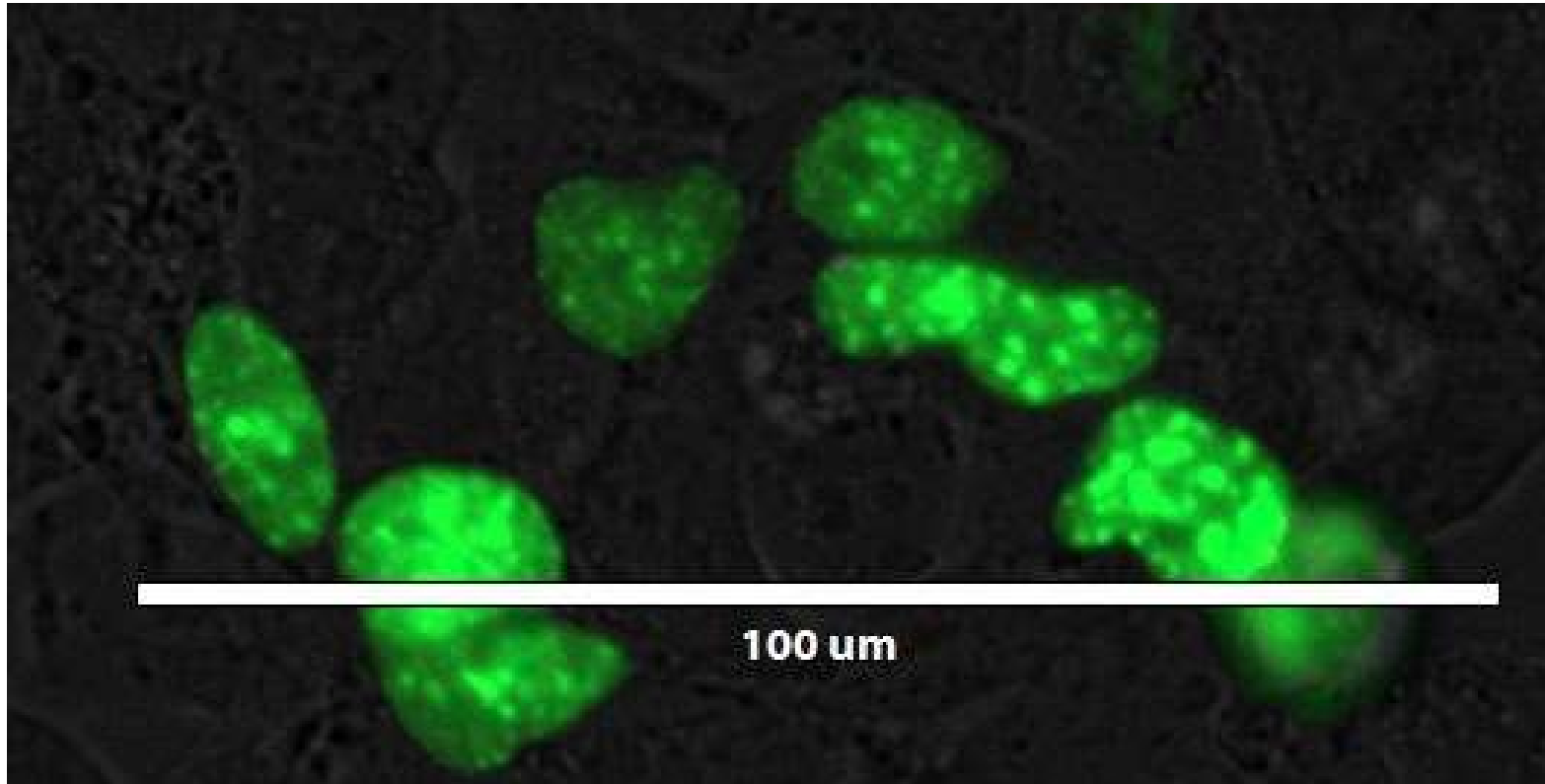
The source of the Dsup protein is the 1338 bp DNA sequence encoding the Dsup protein (LC050827.1), that was optimized for the *D. melanogaster* genome for a stable high level of synthesis of this protein.



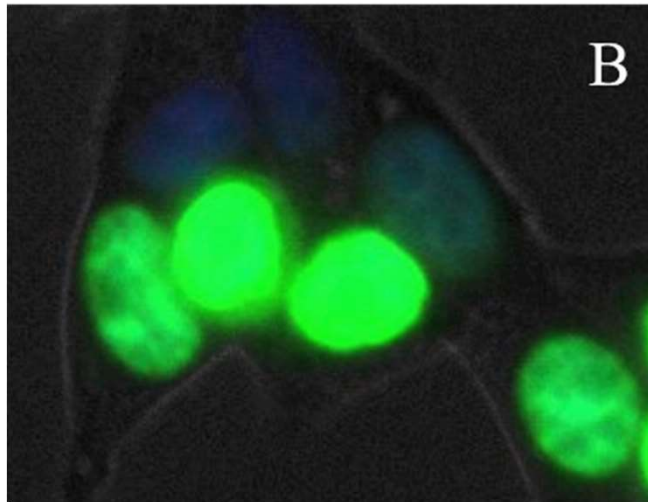
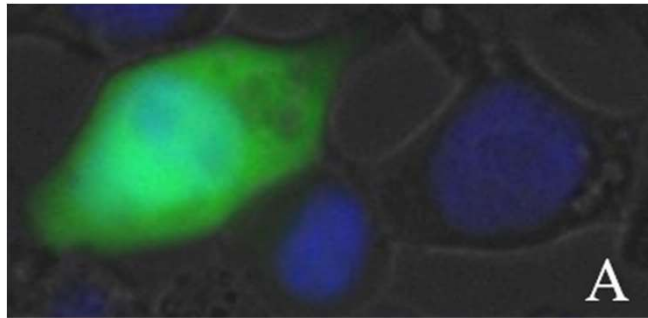
- synthesized
- tested for correct synthesis using sequencing

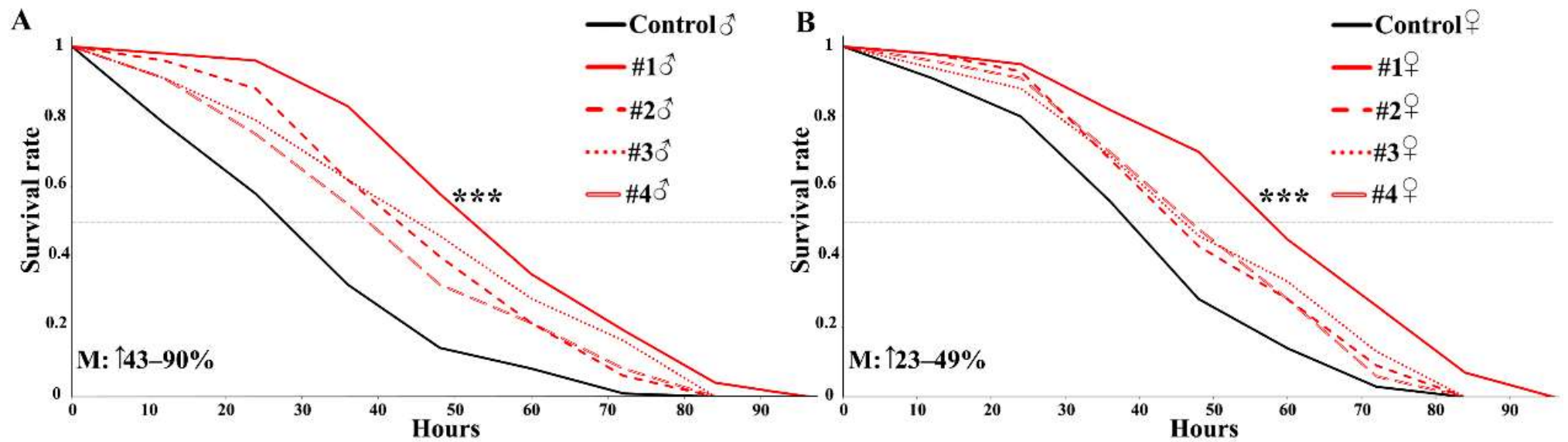


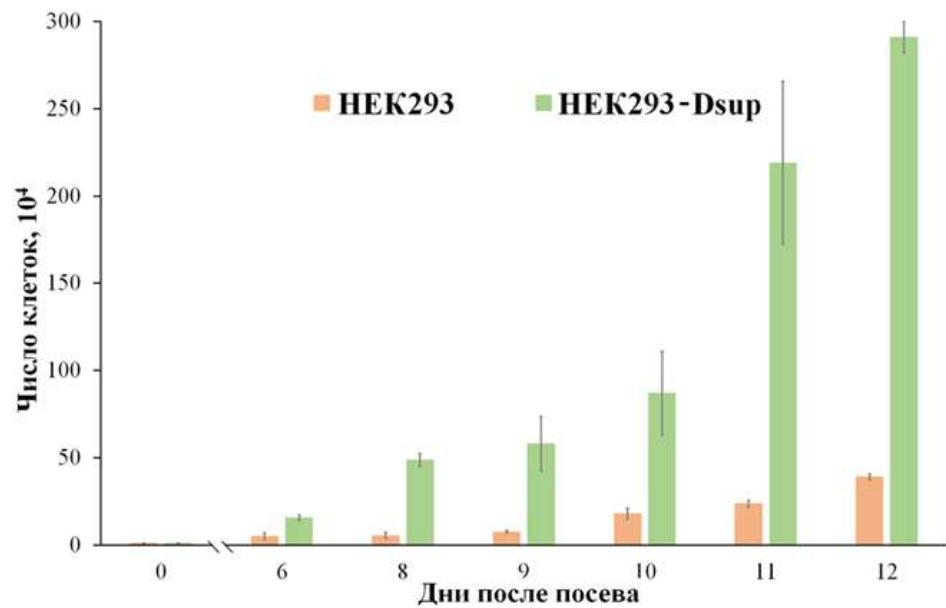
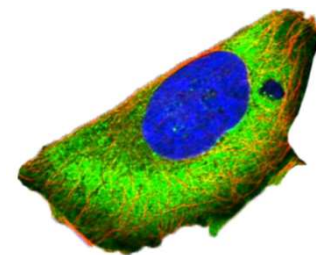
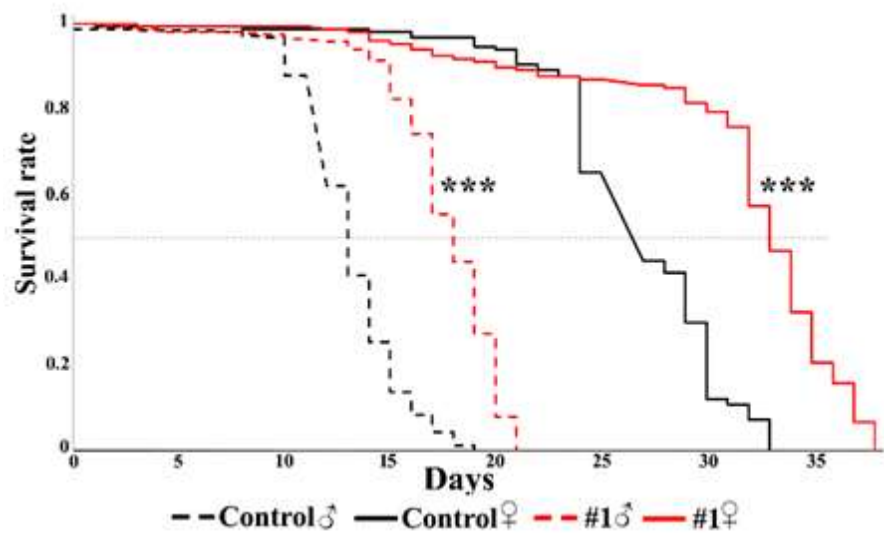
DLNP JINR Sector of Molecular Genetics of the Cell



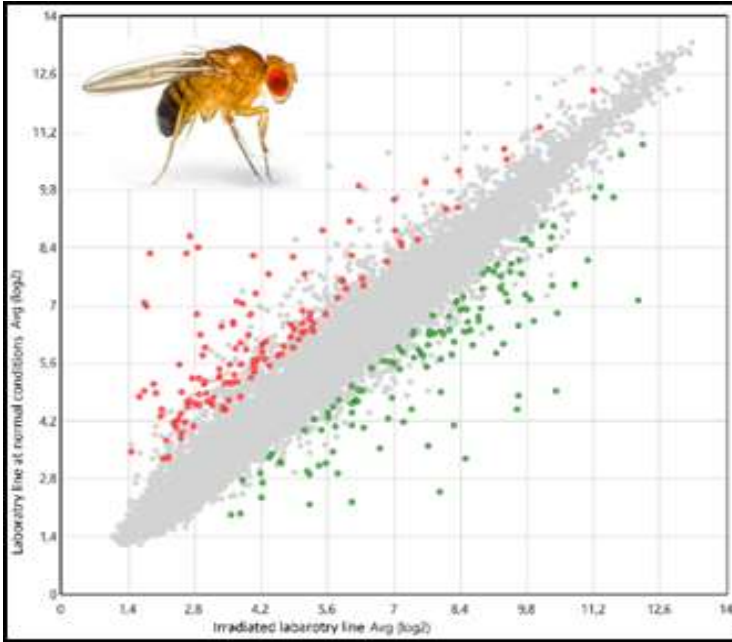
In Fig. B the complete coincidence of the green fluorescent signal from GFP-Dsup and the blue fluorescent signal from DNA located in the nucleus indicates nuclear localization of GFP-Dsup







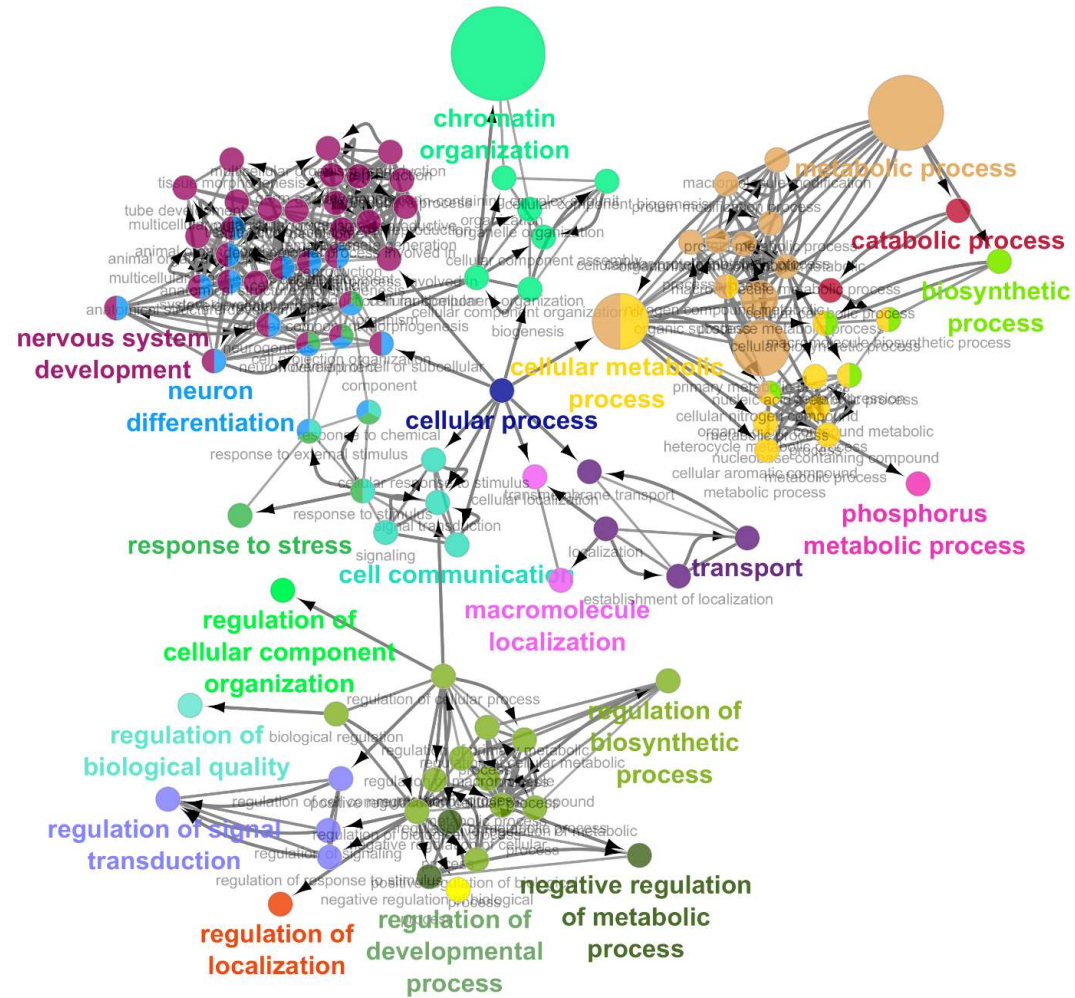
For the gene instructions to be carried out DNA must be transcribed into RNA. A transcriptome is a collection of all the RNA present in cells, which reflects the current state of all processes occurring in the organism

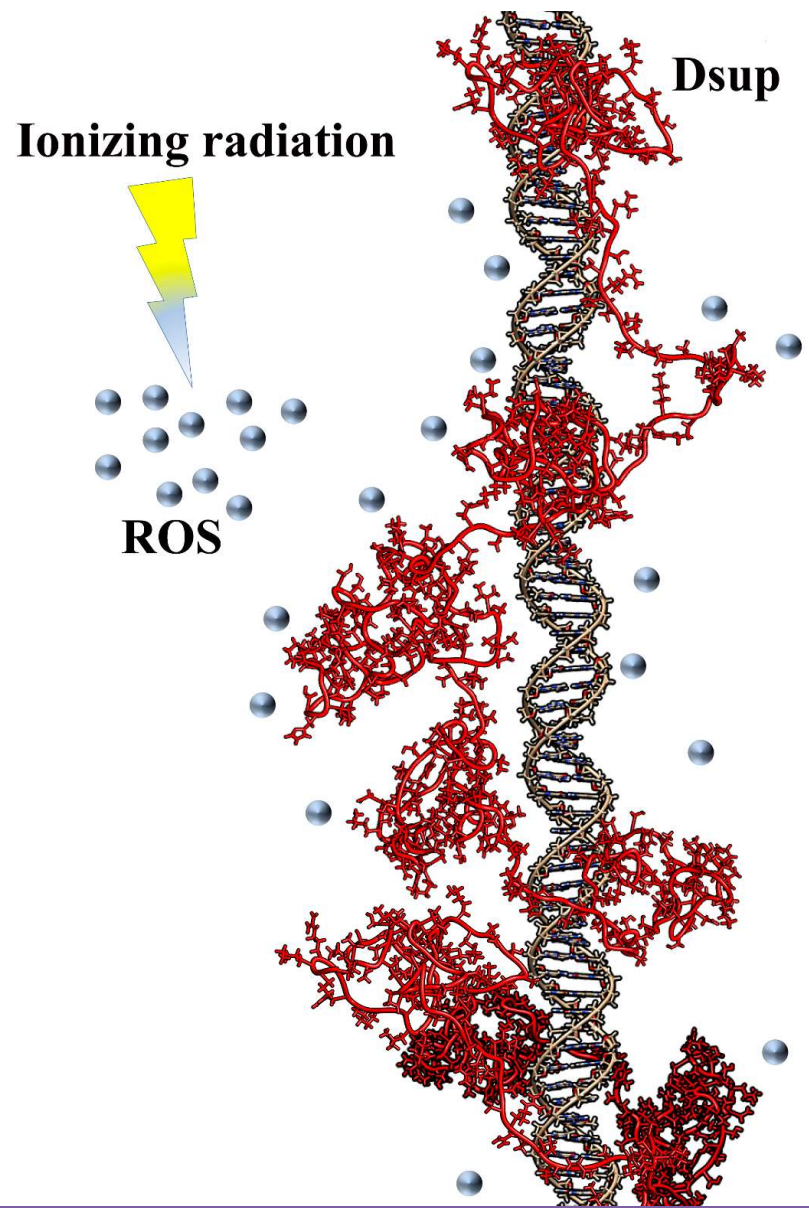


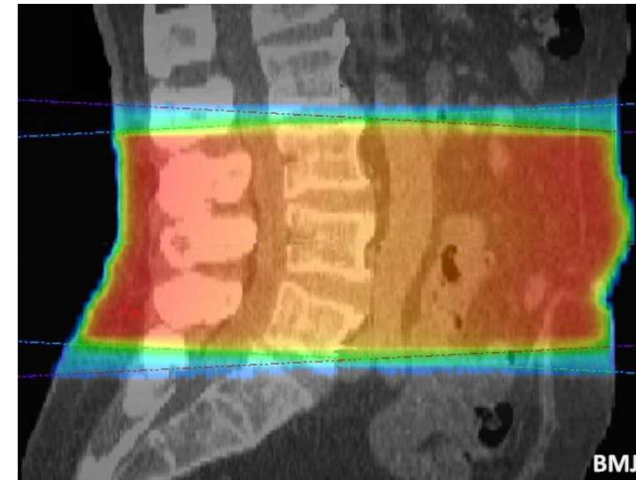
Transcriptome analysis of Dsup expressing and control Drosophila lines demonstrated effect of Dsup protein on expression of genes involved in chromatin organization, regulation of transcription and neural system functioning

BP GO Identifier	BP GO term	Number of genes	P-value
GO:0006334	nucleosome assembly	42	<0,001
GO:0016321	female meiosis chromosome segregation	24	<0,001
GO:0006352	DNA-templated transcription, initiation	19	<0,001
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	19	<0,001
GO:0051298	centrosome duplication	21	<0,001
GO:0050808	synapse organization	13	<0,001
GO:0002121	inter-male aggressive behavior	10	0,001
GO:0048065	male courtship behavior, veined wing extension	3	0,006
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	31	0,007
GO:0042067	establishment of ommatidial planar polarity	6	0,011
GO:0007411	axon guidance	17	0,012
GO:0007601	visual perception	8	0,014
GO:0007218	neuropeptide signaling pathway	8	0,017
GO:0035023	regulation of Rho protein signal transduction	4	0,020
GO:0035317	imaginal disc-derived wing hair organization	5	0,023
GO:0019722	calcium-mediated signaling	4	0,025
GO:0007367	segment polarity determination	6	0,027
GO:0006351	transcription, DNA-templated	27	0,027
GO:0007042	lysosomal lumen acidification	3	0,028
GO:0007186	G-protein coupled receptor signaling pathway	13	0,034
GO:0001738	morphogenesis of a polarized epithelium	4	0,035
GO:0007464	R3/R4 cell fate commitment	4	0,035
GO:0007157	heterophilic cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	5	0,043
GO:0016318	ommatidial rotation	5	0,043
GO:0007476	imaginal disc-derived wing morphogenesis	17	0,045
GO:0045197	establishment or maintenance of epithelial cell apical/basal polarity	4	0,048

Сеть биологических процессов, на которые оказал влияние белок Dsup





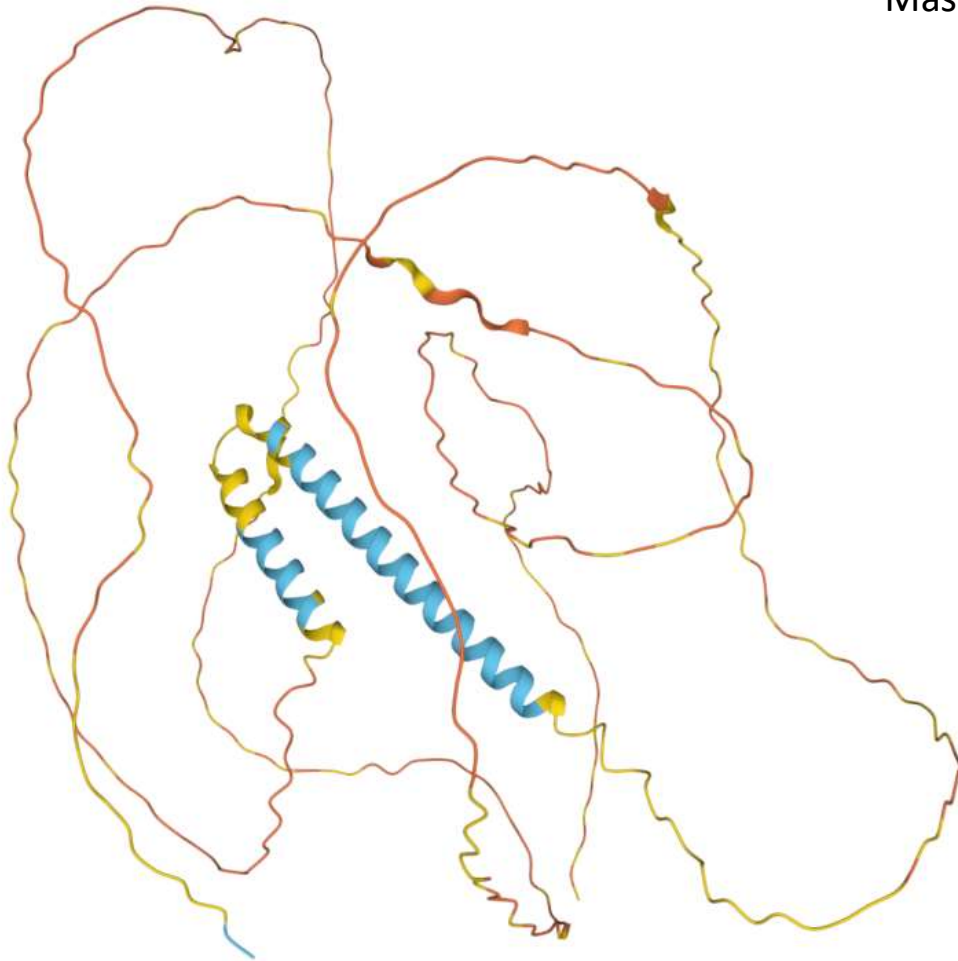


Может применяться:

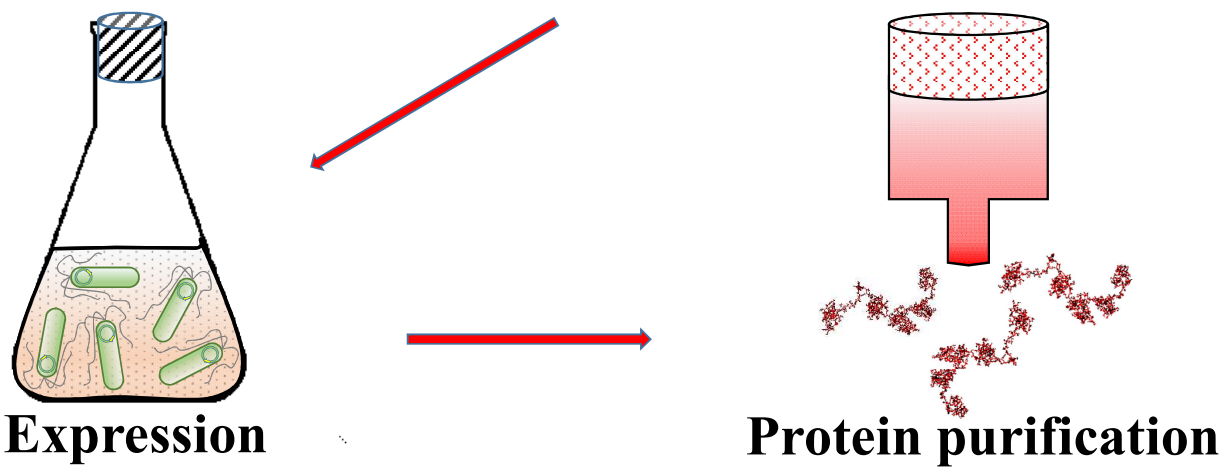
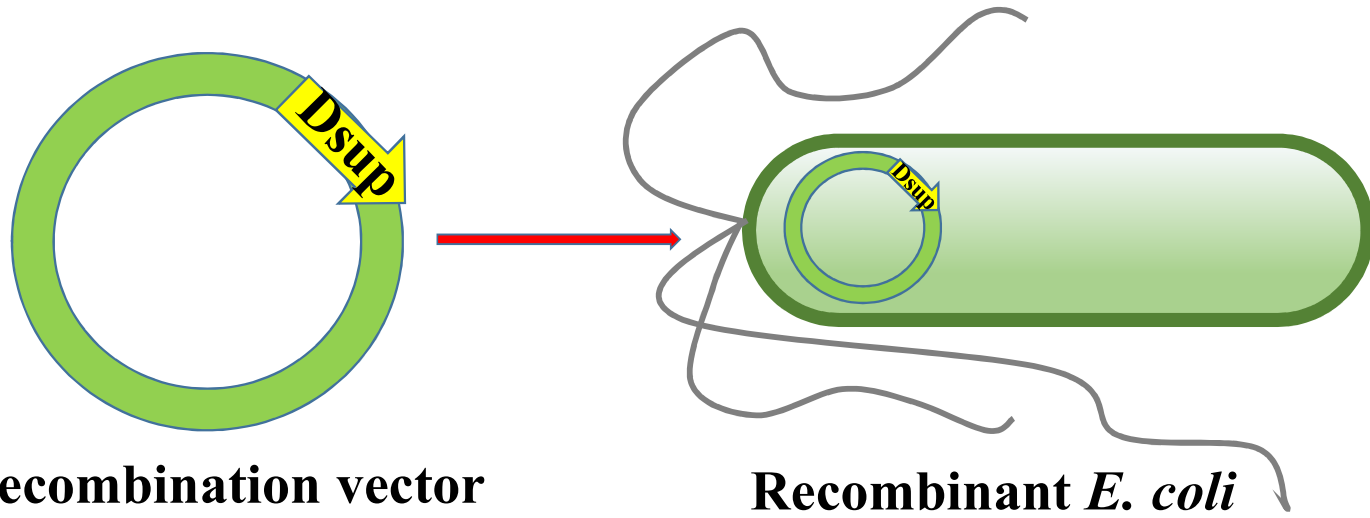
- для временного повышения радиорезистентности
- для защиты окружающих опухоль тканей при радиотерапии
 - для пилотируемой космонавтики
- в качестве ДНК-протектора при длительной криоконсервации биологических материалов

Length:445

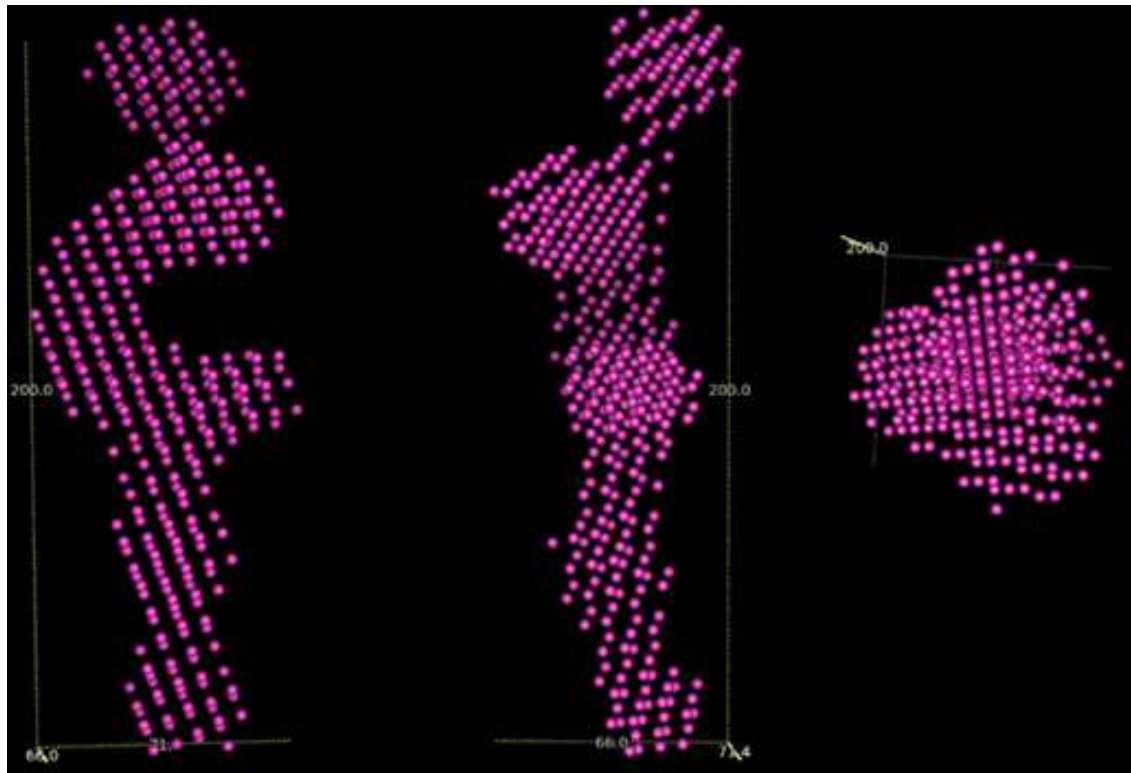
Mass (Da):42,848



```
10 20 30 40 50
MASTHQSSSTE PSSTGKSEET KKDASQGSQ DSKNVTVTKG TGSSATSAAI
60 70 80 90 100
VKTGGSQKGD SSTTAGSSST QGQKFSTTPT DPKTFSSDQK EKSKSPAKEV
110 120 130 140 150
PSGGDSKSG DTKSQSDAKS SGQSQGQSKD SGKSSSDSSK SHSVIGAVKD
160 170 180 190 200
VVAGAKDVAG KAVEDAPSIM HTAVDAVKNA ATTVKDVASS AASTVAEKVV
210 220 230 240 250
DAYHSVVDK TDDKKEGEHS GDKKDDSKAG SSGSQGGDNK KSEGETSGQA
260 270 280 290 300
ESSSGNEGAA PAKGRGRGRP PAAAKGVAKG AAKGAAASKG AKSGAESSKG
310 320 330 340 350
GEQSSGDIEM ADASSKGGSD QRDSAATVGE GGASGSEGGA KKGRGRGAGK
360 370 380 390 400
KADAGDTSAE PPRSSRLTS SGTGAGSAPA AAKGGAKRAA SSSSTPSNAK
410 420 430 440
KQATGGAGKA AATKATAAKS AASKAPQNGA GAKKKGGKAG GRKRK
```



SAXS (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ, ESRF Гренобль, Франция), SANS (ЛНФ ОИЯИ) и DLS (ЛНФ ОИЯИ).



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

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

Dsup не относится к глобулярным белкам и для него 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.

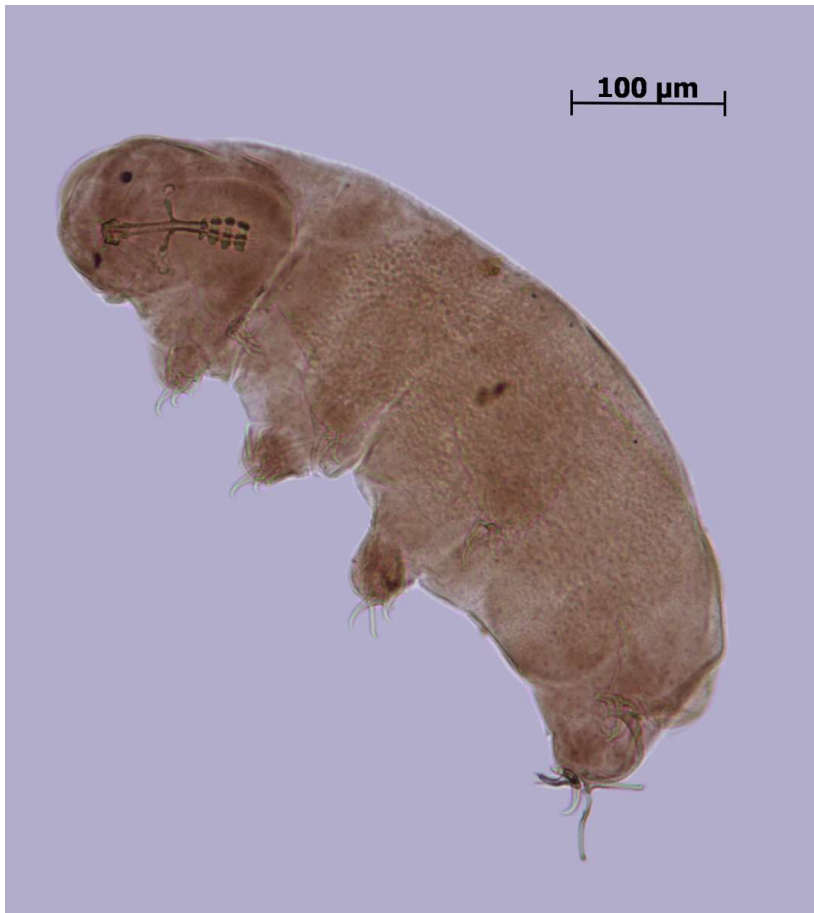


SAXS Xeuss 3.0, LNP JINR

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

МТТ тест - измерение активности NAD(P)H-dependent oxidoreductase, которые являются индикатором митохондриального дыхания и косвенно служат для оценки клеточной энергетической емкости клетки, жизнеспособности клеток и их пролиферативной способности.

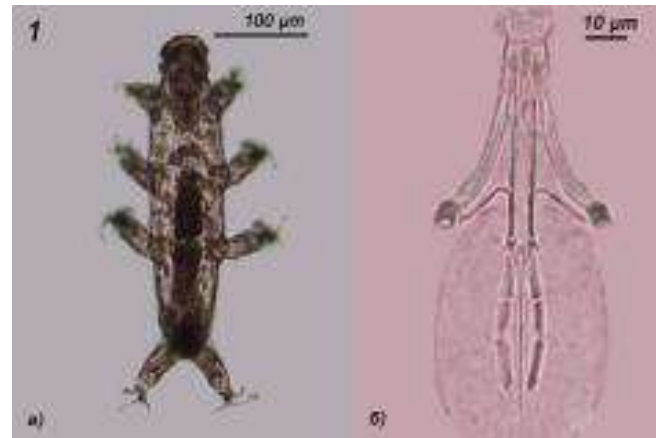
Каспазы – протеолитические ферменты, присутствующие в клетке в виде предшественников - важные участники процесса апоптоза (запрограммированной клеточной гибели).



Grevenius baicalensis



Bertolanius markevichi



Vladimirobius irregibilis

Форма №24

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

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="450 745 1783 842">1. Продуцирование белка Dsup в клетках <i>E.coli</i>, выделение и очистка белка Dsup.<li data-bbox="450 850 1783 948">2. Определение вторичной структуры белка Dsup с помощью методов SAXS, DLS и кругового дихроизма<li data-bbox="450 956 1783 1155">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.

Форма № 26

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

Форма № 29

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	

List of publications and conferences where the results were presented:

1. The tardigrade Dsup (damage suppressor) protein enhances radioresistance and oxidative stress tolerance of *D.melanogaster* and acts as an unspecific repressor of transcription. Mikhail Zarubin, Olga Kuldoshina, Sergey Alekseev, Semen Mitrofanov, Elena Kravchenko (under review)
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.