

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) и исследование механизмов действия этого белка. В течение 2023 г были выполнены следующие задачи:

1. Изучение структурных свойств белка Dsup. Для проведения экспериментов по определению структурных свойств 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 изучен с помощью методов малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) (ЛНФ ОИЯИ), спектроскопии кругового дихроизма (CD) (МФТИ ОИЯИ), для анализа данных был использован компьютерный анализ, в том числе, с использованием нейросетевых алгоритмов. В результате показано что белок Dsup относится к белкам с внутренней неупорядоченной структурой (IDP), определены его форма, размер (R_g , D_{max}) (рис.1), гибкость (R_{flex}), доли различных компонент вторичной структуры, получены *ab initio* модели молекулы, описано поведение белка в различных физиологических и денатурирующих растворах (рис.2).
2. Изучение параметров комплекса белка Dsup-ДНК. Белок Dsup электростатически взаимодействует с ДНК, образуя комплекс. В качестве модельной была использована кольцевая двуцепочечная ДНК размером около 6000 п.н. Методами малоуглового рентгеновского рассеяния (SAXS) (ЛНФ ОИЯИ), спектроскопии кругового дихроизма (CD) (МФТИ), микроскопического термофореза (МФТИ) были определены некоторые параметры комплекса Dsup-ДНК, выявлены изменения в структуре белке и ДНК при образовании комплекса, определена константа связывания Dsup-ДНК (K_d), произведена оценка плотности связывания.

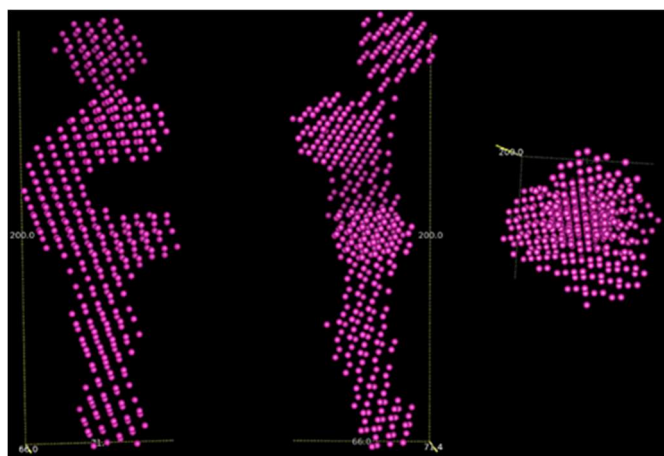


Рис.1. Модель структуры белка Dsup, основанная на экспериментальных данных (DAMMIF package).

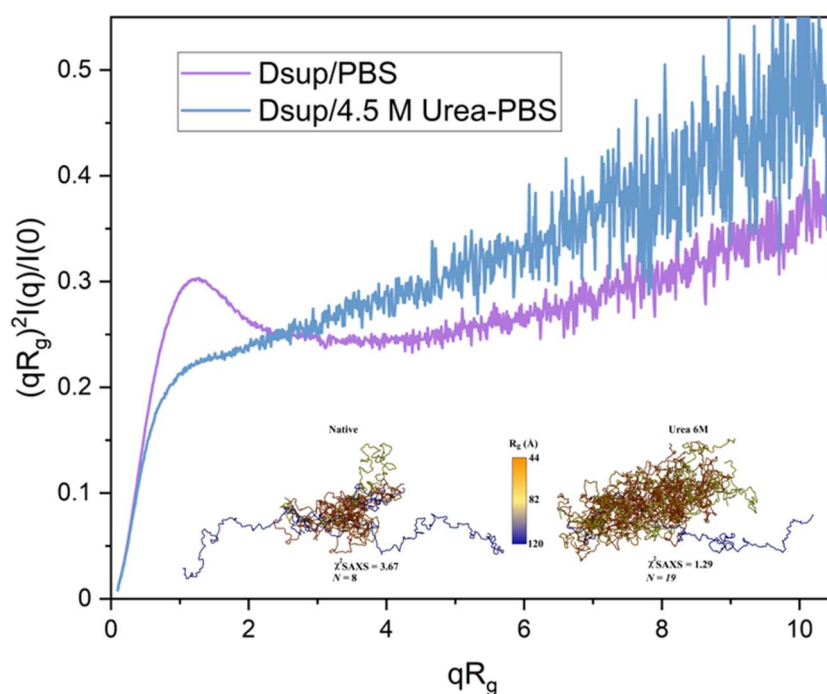


Рис.2. Эффект влияния денатурирующего агента (мочевина 4.5 М) на структурные параметры белка Dsup. Данные малоуглового рассеяния представлены в виде построения Кратки (Kratky plot) и демонстрируют переход белка от природного неупорядоченного к денатурированному состоянию.

3. Comet assay гемоцитов *D.melanogaster*

Для оценки влияния белка Dsup на степень повреждения ядерной ДНК активными формами кислорода, был проведен Comet assay гемоцитов *D.melanogaster* в ходе воздействия перекиси водорода. Было показано значимое снижение ($p < 0.001$) уровня повреждения ДНК активными формами кислорода в гемоцитах,

экспрессирующих Dsup (~17%), что подтверждает протекторные свойства белка Dsup.

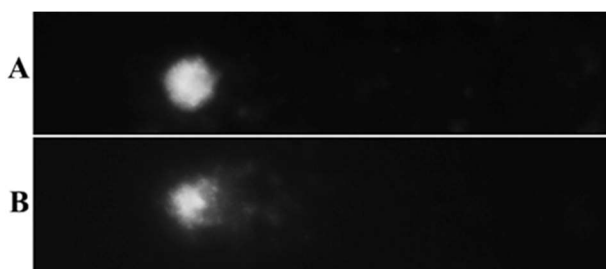


Рис.2. А – undamaged nucleus. В - damaged nucleus with fragmented DNA in comet tail.

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

Публикации:

1. The tardigrade Dsup (damage suppressor) protein enhances radioresistance and oxidative stress tolerance in *D.melanogaster* and acts as an unspecific repressor of transcription. Mikhail Za-rubin, Talyana Azorskaya, Olga Kuldoshina, Sergey Alekseev, Semen Mitrofanov, Elena Kravchenko*. *iScience* (IF - 6.107, Q1). Accepted for publication
2. Unique Radioprotective Damage Suppressor protein (Dsup): Comparative Sequence Analysis M. Zarubin, O. Kuldoshina, E. Kravchenko. *Particles and Nuclei, Letters (PEPAN Letters)* (IF – 0.565, Q4), 2022, 19, № 3(242). p. 212

Международные конференции:

1. M. Zarubin, E. Kravchenko. Radioprotective DNA-binding damage suppressor protein (Dsup) affects the functioning of neural system in *D. melanogaster*, 46th Congress of The Federation of European Biochemical Societies (FEBS). Lisbon, Portugal. 9.07.22-14.07.22
2. Zarubin M., Murugova T., Ivankov O., Ryzhykau Y., Soloviov D., Popov A., Kravchenko E. The insight into structural properties of unique tardigrade radioprotective damage suppressor protein (Dsup). *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology* – BGRS/SB-2022, Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk, Russia, 4.07.22-8.07.2022

Научно-популяризационная деятельность:

1. Фестиваль НАУКА 0+, Тарасов Кирилл, Лекция Защита от радиации с помощью уникального белка тихоходок
2. РИА Новости, подкаст “Мы все умрём. Но это не точно” - Как радиация влияет на ДНК, и чем занимаются молекулярные генетики. Михаил Зарубин и Кирилл Тарасов. (<https://ria.ru/20230112/genetiki-1844187060.html>)