

*Форма открытия (продления) Проекта /
Подпроекта КИП*

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института

_____/_____
“ ____ ” _____ 202_ г.

**НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОДЛЕНИЯ
ПРОЕКТА
ПО НАПРАВЛЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ
В ПРОБЛЕМНО-ТЕМАТИЧЕСКОМ ПЛАНЕ ОИЯИ**

1. Общие сведения о проекте

1.1. Шифр темы – 04-2-1132-2017

1.2. Шифр проекта

1.3. Лаборатория ЛЯП

1.4. Научное направление Науки о жизни

1.5. Наименование проекта

Защита от физико-химических стрессов с помощью белков тихоходок (TARDISS)

1.6. Руководитель проекта - Кравченко Е.В.

1.7. Заместитель руководителя проекта - Рзянина А.В.

2. Научное обоснование и организационная структура

2.1. Аннотация

Целью данного проекта является изучение свойств нового радиопротекторного белка тихоходок Damage suppressor (Dsup), исследование механизмов его действия и разработка схем его применения в ядерной медицине, экологии, астробиологии, биотехнологии и фармацевтике с использованием различных модельных организмов. Белок Dsup является новым белком, открытым в 2016 году в тихоходке *Ramazzottius varieornatus* – одном из самых радиорезистентных видов многоклеточных организмов. В ходе выполнения первой части проекта в 2021-2023 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. Для линий *D.melanogaster*, экспрессирующих *Dsup*, был проведен транскриптомный анализ, выявивший влияние белка Dsup на ряд процессов на клеточном и организменном уровне. В ходе проведенных экспериментов по определению структуры

белка Dsup впервые была произведена оценка физических размеров молекулы белка Dsup, установлены некоторые параметры комплекса ДНК-Dsup и показано существование возможной вторичной структуры белка Dsup. 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.

Следующими задачами данного проекта являются создание регулируемой схемы экспрессии гена, кодирующего белок Dsup, для временного включения Dsup-опосредованной радиопротекции только в нужный отрезок времени на модели линий *D.melanogaster*, оценка влияния белка Dsup на компактизацию хроматина в клетках, изучение стабильности и свойств белка Dsup в ходе воздействия высоких температур и ионизирующего излучения, модификация синтетических носителей белком Dsup для очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей.

Для решения данных задач нами будет использован широкий спектр молекулярно-биологических и биофизических методов: в частности, продуцирование, очистка и хроматография белка, методы SAXS, DLS и кругового дихроизма, АТАС-секвенирование, транскриптомный анализ, методы молекулярного клонирования и редактирования генома.

В результате выполнения проекта впервые будет разработана модельная схема индуцируемого синтеза радиопротекторного белка в живых клетках, произведена оценка стабильности белка Dsup и его влияния на пространственную организацию ДНК в клетке, разработана методика для очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей с помощью белка Dsup.

2.2. Научное обоснование

Главной целью проекта является изучение свойств и возможностей практического применения стресс-протекторных белков тихоходок. В качестве первого изучаемого белка выбран белок Damage suppressor (Dsup). Для него будет проведено исследование механизмов его действия и разработаны возможные схемы применения в ядерной медицине, экологии, астробиологии, биотехнологии и фармацевтике с использованием различных модельных организмов.

В условиях увеличения уровня радиационного фона за счет различных техногенных составляющих, проблемы космического излучения, препятствующего длительному пребыванию живых организмов в космосе, необходимости защиты от радиации здоровых тканей в ходе лучевой терапии злокачественных опухолей и ряда 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.

Представители Tardigrada (тихоходки) относятся к группе наиболее устойчивых к различным видам стресса животных на Земле, в том числе тихоходки способны выживать после воздействия как редко- так и плотно ионизирующего излучения в дозах около 5 кГр.

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).

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. Предполагается, что прямое связывание Dsup с нуклеосомами и формирование диффузной массы белка вокруг хромосомной ДНК создает защиту от активных форм кислорода. Задачами данного проекта являются создание первой регулируемой схемы экспрессии гена, кодирующего белок тихоходок Dsup, для временного включения Dsup-опосредованной радиопротекции только в нужный отрезок времени на модели линий *D.melanogaster*, оценка влияния белка Dsup на компактизацию хроматина в клетках, изучение стабильности и свойств белка Dsup в ходе воздействия высоких температур и ионизирующего излучения, модификация синтетических носителей белком Dsup для очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей.

2.2.1. Создание регулируемой схемы экспрессии гена, кодирующего белок Dsup, в модельном объекте *D.melanogaster*

В ходе предыдущего этапа выполнения проекта нами была продемонстрирована возможность значительного повышения радиорезистентности модельных организмов с помощью белка Dsup. Однако наряду с повышением радиорезистентности нами наблюдались и ряд побочных эффектов, связанных с неспецифической репрессией транскрипции. В случае использования белка Dsup для повышения радиорезистентности растений, бактерий и многих сельскохозяйственных животных эти побочные эффекты значительной роли не играют. Однако для организмов, для которых необходимы быстрые реакции нервной системы на внешние стимулы, предпочтительной схемой радиопротекции, основанной на присутствии в клетках белка Dsup, будет схема регулируемой экспрессии. Это позволит строго регулировать синтез белка в клетках и включать Dsup-опосредованную радиопротекцию только в необходимый отрезок времени. Индуцируемая экспрессия гена позволяет синтезировать белок в ответ на определенный внешний стимул за счет быстрой активации транскрипции гена-мишени, а после устранения стимула индуцируемый ген быстро возвращается в исходное, неактивное состояние.

Для решения этой задачи с помощью методов молекулярного клонирования и редактирования генома будет создана линия *D.melanogaster* экспрессирующая Dsup под контролем промотора гена металлотронеина и проведена оценка базального уровня транскрипции Dsup и уровня транскрипции в случае индукции промотора разными концентрациями соединений меди. Для этих линий *D.melanogaster* также будет проведена оценка радиорезистентности и степени выраженности побочных эффектов до, во время и после индукции экспрессии Dsup.

2.2.2. Оценка влияния белка Dsup на компактизацию хроматина в клетках

Белок Dsup способен неспецифически связываться с нуклеиновыми кислотами за счет электростатических взаимодействий. Поэтому важной задачей является оценка изменения уровня компактизации хроматина, в клетках экспрессирующих Dsup. Это позволит лучше понять механизмы действия этого белка в клетке и оценить его влияние на состояние хроматина в ядре. Для количественной оценки участков открытого хроматина будет использован метод АТАС (Assay for Transposase Accessible Chromatin) секвенирования для эмбрионов *D.melanogaster* конститутивно экспрессирующих Dsup (получены на предыдущем этапе выполнения проекта) и контрольной линии. Полученные данные о степени компактности/открытости хроматина будут дополнены результатами транскриптомного анализа, что позволит сопоставить состояние хроматина с уровнем экспрессии конкретных генов. В результате этих экспериментов будет одновременно описано состояние хроматина и транскриптома в присутствии и отсутствии белка Dsup, что позволит не только охарактеризовать степень влияния Dsup на активный хроматина, но и картировать новые регуляторные элементы в геноме *D.melanogaster*.

2.2.3. Изучение стабильности и свойств белка Dsup в ходе воздействия высоких температур и ионизирующего излучения

Препараты очищенного белка Dsup потенциально могут быть использованы для фармакологии и медицины, как криопротектор, консервант и стабилизатор ДНК\РНК содержащих препаратов и вакцин, а также как протекторный агент при радио- и химиотерапии. Для оценки таких возможностей использования необходимо изучить стабильность и свойства белка Dsup в ходе воздействия высоких температур (60-100⁰С) и ионизирующего излучения. На предыдущем этапе выполнения проекта нами был разработана методика получения концентрированных растворов чистого белка Dsup (~20-30 мг\мл). Такие растворы белка Dsup будут облучены гамма-квантами в дозах 2-5 kGy с использованием установки МТ-25 (ЛЯР ОИЯИ) или нагреты 60-100⁰С, после чего будет произведен анализ структуры белка методами SAXS, DLS и кругового дихроизма (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ), оценка степени его фрагментации (SDS-PAGE, Western blotting) и функциональных характеристик (Dsup-DNA, Dsup-RNA gel mobility shift analysis, изучение комплексообразования Dsup-DNA методами SAXS, DLS и кругового дихроизма (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ)).

2.2.4. Разработка методики и материала для очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей с помощью белка Dsup

Возможность эффективно концентрировать внеклеточную или свободную ДНК и очищать от следов нуклеиновых кислот биологические и биотехнологические жидкости необходима для работы с медицинскими образцами человека при диагностике и проведении медицинских процедур, на биотехнологических и фармацевтических производствах ДНК-содержащих препаратов, в том числе вакцин, при проведении экологического мониторинга и т.д. Белок Dsup, способный неспецифически связывать любые нуклеиновые кислоты является хорошим кандидатом для разработки методики для селективной очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей путем фильтрации больших объемов жидкостей. Для получения пористого селективно фильтрующего материала планируется модифицировать сорбенты и пористые мембраны белком Dsup за счет ковалентных сшивок (глутаровый альдегид) и нековалентных взаимодействий (His-NiNTA). Через модифицированные пористые материалы будет произведена фильтрация образцов, содержащих нуклеиновые кислоты, с оценкой их концентрации в растворе до и после фильтрации, последующей десорбцией нуклеиновых кислот с материала носителя и оценки возможности амплификации сконцентрированных

нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) для дальнейшего анализа. Таким образом, будет разработана методика использования материалов, модифицированных белком Dsup, для концентрирования внеклеточной ДНК из растворов и очистки биологических жидкостей от нуклеиновых кислот. Важно отметить, что данная работа будет относиться к активно развивающемуся в последние годы направлению по созданию функциональных материалов на основе белков экстремофильных организмов и первой, использующей белки тихоходок для этих целей.

Ожидаемые результаты:

1. Создание регулируемой схемы экспрессии гена, кодирующего белок Dsup, в модельном объекте *D.melanogaster* для разработки управляемой системы временного повышения радиорезистентности всего организма
2. Оценка влияния белка Dsup на компактизацию хроматина в клетках для установления фундаментальных характеристик работы белка Dsup и картирование новых регуляторных элементов в геноме *D.melanogaster*
3. Получение данных о стабильности и свойствах белка Dsup в ходе воздействия высоких температур и ионизирующего излучения для оценки применения этого белка для фармакологии и медицины, как криопротектора, консерванта и стабилизатора вакцин и других ДНК\РНК содержащих препаратов, а также как протекторного агента при радио- и химиотерапии.
4. Разработка методики и материала для очистки растворов от нуклеиновых кислот и концентрирования ДНК и РНК из различных биологических жидкостей с помощью белка Dsup

В ходе реализации проекта планируются 2 публикации в российских рецензируемых журналах и 3 публикации в иностранных журналах, индексируемых WoS (Q1,Q2); защита магистерской и кандидатской работ.

Риски: сложности с доставкой импортных реагентов для проведения молекулярно-биологических работ

2.3. Предполагаемый срок выполнения

2024-2028 годы

Этапы работы	Содержание работ
2024 г.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Создание линии <i>D.melanogaster</i>, экспрессирующей <i>Dsup</i> под контролем промотора гена металлотioneина и оценка базального уровня транскрипции <i>Dsup</i> и уровня транскрипции в случае индукции промотора разными концентрациями соединений меди. 2. Продуцирование белка Dsup в клетках <i>E.coli</i>, выделение и очистка белка Dsup. 3. Облучение растворов белка Dsup гамма-квантами в дозах 2-5 kGy с использованием установки МТ-25 (ЛЯР ОИЯИ) или нагревание 60-100⁰С, анализ структуры белка методами SAXS, DLS, кругового дихроизма (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ), оценка степени его фрагментации (SDS-PAGE, Western blotting)
2025 г.	<ol style="list-style-type: none"> 4. Оценка радиорезистентности и степени выраженности побочных эффектов до, во время и после индукции экспрессии <i>Dsup</i> для линии

	<p><i>D.melanogaster</i>, экспрессирующей <i>Dsup</i> под контролем промотора гена металлотионеина.</p> <p>5. Оценка радиорезистентности линии <i>D.melanogaster</i>, экспрессирующей <i>Dsup</i> под контролем промотора гена металлотионеина, после индукции транскрипции и облучения γ-квантами на установке МТ-25 (ЛЯР ОИЯИ) в дозах 500-1000 Gy.</p>
2026 г.	<p>6. АТАС секвенирование эмбрионов <i>D.melanogaster</i>, экспрессирующих <i>Dsup</i>, и контрольной линии. Биоинформатический анализ данных</p> <p>7. Транскриптомный анализ эмбрионов <i>D.melanogaster</i>, экспрессирующих <i>Dsup</i>, и контрольной линии. Биоинформатический анализ данных</p>
2027 г.	<p>8. Продуцирование белка <i>Dsup</i> в клетках <i>E.coli</i>, выделение и очистка белка <i>Dsup</i>. Выделение молекул ДНК разных размеров.</p> <p>9. Облучение комплексов <i>Dsup</i>-ДНК гамма-квантами в дозах 2-5 kGy с использованием установки МТ-25 (ЛЯР ОИЯИ) или нагревание 60-1000С, <i>Dsup</i>-DNA, <i>Dsup</i>-RNA gel mobility shift analysis, изучение комплексообразования <i>Dsup</i>-DNA методами SAXS, DLS и кругового дихроизма (ЛНФ ОИЯИ, МФТИ)</p>
2028	<p>10. Модификация сорбентов и пористых мембран белком <i>Dsup</i> за счет ковалентных сшивок (глутаровый альдегид) и нековалентных взаимодействий (His-NiNTA).</p> <p>11. Фильтрация образцов, содержащих нуклеиновые кислоты, с оценкой их концентрации в растворе до и после фильтрации, последующей десорбцией нуклеиновых кислот с материала носителя и оценки возможности амплификации сконцентрированных нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) для дальнейшего анализа.</p>

2.4. Участвующие лаборатории ОИЯИ

ЛЯП.

2.4.1. Потребности в ресурсах МИВК

Вычислительные ресурсы	Распределение по годам				
	1 год	2 год	3 год	4 год	5 год
Хранение данных (ТБ)					
- EOS	-	-	-	-	-
- Ленты	6	6	6	6	6
Tier 1 (ядро-час)	-	-	-	-	-
Tier 2 (ядро-час)	-	-	-	-	-
СК «Говорун» (ядро-час)					
- CPU	20000	20000	20000	20000	20000
- GPU	3000	3000	3000	3000	3000
Облака (CPU ядер)					

2.5. Участвующие страны, научные и научно-образовательные организации

Организация	Страна	Город	Участники	Тип соглашения
-				
-				

2.6. Организации-соисполнители

3. Кадровое обеспечение

3.1. Кадровые потребности в течение первого года реализации

№№ п/п	Категория работника	Основной персонал, сумма FTE	Ассоциированный персонал, сумма FTE
1.	научные работники	3,2	-
2.	инженеры	3	-
3.	специалисты	-	-
4.	служащие	-	-
5.	рабочие	1	-
	Итого:	7,2	-

3.2. Доступные кадровые ресурсы

3.2.1. Основной персонал ОИЯИ

№№ п/п	Категория работников	ФИО	Подразделение	Должность	Сумма FTE
1.	научные работники	Кравченко Е.В.	ЛЯП СМГК	Начальник сектора	1
		Рзянина А.В.	ЛЯП ОФ	С.н.с.	0.2
		Зарубин М.П.	ЛЯП СМГК	М.н.с.	1
		Кулдошина О.А.	ЛЯП СМГК	М.н.с.	1
2.	инженеры	Азорская Т.О.	ЛЯП СМГК	Инженер	1
		Тарасов К.А.	ЛЯП СМГК	Инженер	1
		Яхненко А.С.	ЛЯП СМГК	Инженер	1
3.	специалисты	-	-	-	-
4.	рабочие	Дубовик Я.В.	ЛЯП СМГК	Лаборант	1
	Итого:				7.2

3.2.2. Ассоциированный персонал ОИЯИ

№№ п/п	Категория работников	Организация-партнер	Сумма FTE
1.	научные работники	-	-
2.	инженеры	-	-
3.	специалисты	-	-
4.	рабочие	-	-
	Итого:	-	-

4. Финансовое обеспечение

4.1. Полная сметная стоимость проекта

250 kUSD

4.2. Внебюджетные источники финансирования

-

Руководитель проекта _____/_____/_____

Дата представления проекта в ДНОД _____

Дата решения НТС Лаборатории _____, номер документа _____

Год начала проекта _____

(для продлеваемых проектов) — год начала работ по проекту _____

**Предлагаемый план-график и необходимые ресурсы для осуществления
Проекта**

Наименования затрат, ресурсов, источников финансирования		Стоимость (тыс. долл.) потребности в ресурсах	Стоимость, распределение по годам				
			1 год	2 год	3 год	4 год	5 год
	Международное сотрудничество (МНТС)	25	5	5	5	5	5
	Материалы	225	45	45	45	45	45
	Оборудование и услуги сторонних организаций (пуско-наладочные работы)	-					
	Пуско-наладочные работы	-					
	Услуги научно- исследовательских организаций	-					
	Приобретение программного обеспечения	-					
	Проектирование/строительство	-					
	Сервисные расходы (планируются в случае прямой принадлежности к проекту)	-					
Необходимые ресурсы	Нормо-час	Ресурсы					
		– сумма FTE,	40	7.2	8.2	8.2	8.2
		– ускорителя (MT-25, ЛЯР)	400	80	80	80	80
		– реактора	-				
Источники финансирования	Бюджетные средства	Бюджет ОИЯИ (<i>статьи бюджета</i>)	250	50	50	50	50
	Внебюджет (доп. смета)	Вклады соисполнителей Средства по договорам с заказчиками Другие источники финансирования	-				

Руководитель проекта / подпроекта КИП _____ / _____ /

Экономист Лаборатории _____ / _____ /

ЛИСТ СОГЛАСОВАНИЙ ПРОЕКТА / ПОДПРОЕКТА КИП

Проект ЗАЩИТА ОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СТРЕССОВ С ПОМОЩЬЮ БЕЛКОВ
ТИХОХОДОК

TARDISS

Тема 04-2-1132-2017

Руководитель проекта Кравченко Елена Владимировна

СОГЛАСОВАНО

ВИЦЕ-ДИРЕКТОР ИНСТИТУТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИНСТИТУТА

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ДИРЕКТОР ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ГЛАВНЫЙ ИНЖЕНЕР ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ ЛАБОРАТОРИИ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛЬ ТЕМЫ / КИП

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА /
ПОДПРОЕКТА КИП

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

ОДОБРЕН ПКК ПО НАПРАВЛЕНИЮ

ПОДПИСЬ

ФИО

ДАТА

