

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Зарубин Михаил Павлович

Радиопротекторные свойства и структурные особенности белка

Dsup тихоходки *Ramazzottius varieornatus*

Специальность 1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2026

Диссертация подготовлена в Объединенном институте ядерных исследований, Лаборатории ядерных проблем им. В.П. Джелепова, секторе молекулярной генетики клетки

Научные руководители –

*Кравченко Елена Владимировна,
кандидат биологических наук*

*Шишин Евгений Александрович,
доктор физико-математических наук*

Официальные оппоненты –

*Шайтан Алексей Константинович,
доктор физико-математических наук,
член-корреспондент РАН, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, биологических
факультет, кафедра биоинженерии, профессор*

*Коневега Андрей Леонидович,
кандидат физико-математических наук,
Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова Национального
исследовательского центра “Курчатовский
институт”, Отделение молекулярной и
радиационной биофизики, руководитель отделения*

*Гудимчук Никита Борисович,
доктор физико-математических наук,
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, физический факультет,
кафедра биофизики, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «22» октября 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, Биологический факультет, Кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3985>

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Экстремально радиорезистентные организмы были открыты в результате развития атомной и космической отраслей и способны выдерживать высокие дозы ионизирующего излучения ($LD_{50} > 2\,000$ Гр). Наиболее устойчивы к радиации микроорганизмы (бактерии, грибы, археи) с предельной установленной дозой LD_{50} около 20 000 Гр. Среди животных экстремальная радиорезистентность встречается редко и наивысшая у тихоходок с LD_{50} до 6 500 Гр. Такая устойчивость к радиации, как предполагается, является косвенным результатом адаптации к другим физико-химическим стрессам (дегидратации, окислительному стрессу, повышенным температурам). Актуальной задачей является исследование разнообразия радиорезистентных организмов, молекулярных механизмов радиорезистентности, а также разработка на их основе прикладных технологий в биотехнологии и медицине.

Тихоходки, будучи одними из самых устойчивых к физико-химическим стрессам животных, стали модельными организмами для изучения экстремальной радиорезистентности, криптобиоза и в астробиологии. Среди возможных причин устойчивости тихоходок к стрессам можно выделить: (i) способность при неблагоприятных условиях к переходу в состояние криптобиоза с практически полной остановкой метаболизма, (ii) наличие групп неупорядоченных белков (Tardigrade-specific Intrinsically Disordered Proteins, TDP) с защитной ролью, компенсирующих изменения физико-химических условий и участвующих в предотвращении денатурации и окисления биомолекул, стабилизации клеточных компонент и мембран, защите и восстановлении ДНК и других процессах, (iii) эффективная система репарации ДНК, (iv) особенности антиоксидантной системы, (v) способность производить или накапливать протекторные пигменты (беталаины, каратиноиды и т.д.) и сахараиды (трегалоза, сахароза и т.д.), (vi) отложенный апоптоз после выхода из криптобиоза и другие.

Наличие групп специфичных для тихоходок неупорядоченных белков (TDPs) – наиболее изучаемый и ключевой фактор их устойчивости. Особенно интересен белок Damage suppressor (Dsup), обнаруженный у самого радиорезистентного вида тихоходок *Ramazzottius varieornatus*. Белок Dsup обладает радиопротекторными свойствами и обеспечивает защиту ДНК животного при различных физико-химических стрессах. Показано, что Dsup способен значительно повышать устойчивость к ионизирующему излучению и окислительному стрессу клеток, экспрессирующих ген *Dsup*, более того, на его основе разрабатываются радиопротекторные

мРНК-вакцины. Однако конкретные молекулярные детали, касающиеся протекторного механизма белка Dsup, остаются не до конца изученными.

Основной гипотезой для объяснения радиопротекторного действия белка Dsup является его участие в молекулярном экранировании ДНК от активных форм кислорода (АФК), образующихся при радиоллизе воды. Кроме того, есть другая возможная причина радиопротекторного механизма, связанная с активацией белком Dsup процессов антиоксидантной системы и репарации ДНК. Для разрешения данного вопроса требуется установление особенностей взаимодействия белка Dsup с ДНК/хроматином и изучение влияния белка на транскриптом. Препятствием для понимания протекторного механизма на молекулярном уровне является отсутствие экспериментальных данных о структурных особенностях белка Dsup и комплексов Dsup-ДНК. Дальнейшие исследования белка Dsup необходимы для получения новых протекторов, разработки способов повышения устойчивости организмов к физико-химическим стрессам и создания консервантов/стабилизаторов для биологических материалов. Исследованию указанных вопросов посвящена данная работа.

Цель и задачи исследования

Установление радиопротекторного механизма белка Dsup тихоходки *Ramazzottius varieornatus* в модельном животном и определение обеспечивающих его структурных особенностей молекулы белка.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Выявить структурные особенности белка Dsup и комплекса Dsup-ДНК в растворе, обеспечивающие его радиопротекторные свойства, с использованием биоинформатического анализа, малоуглового рентгеновское рассеяния (МУРР) и спектроскопии кругового дихроизма (КД).
2. Выяснить возможность повышения белком Dsup радиорезистентности сложноорганизованного животного на примере *Dsup*-экспрессирующих плодовых мушек *Drosophila melanogaster*. Проверить на данном модельном организме гипотезу о роли молекулярном экранировании ДНК белком Dsup от АФК.
3. Верифицировать возможность влияния белка Dsup на транскрипцию генов антиоксидантной системы и репарации ДНК, как предпосылки радиопротекторного механизма в модельном организме.

4. Используя способность белка Dsup к образованию комплексов с ДНК, проверить возможность создания на основе трековых мембран, модифицированных белком Dsup, прототипа фильтров для извлечения ДНК из сложных растворов.

Научная новизна работы

- Показано, что неупорядоченность структуры белка Dsup является ключевым фактором для образования им нечеткого/конформационно-гетерогенного комплекса с ДНК и устойчивости белка к действию АФК. Эти свойства белка Dsup определяют функционирование механизма молекулярного экранирования ДНК в *Dsup*-экспрессирующих клетках.
- Обнаружено, что белок Dsup является протектором при окислительном стрессе и облучении радиацией в *Dsup*-экспрессирующих сложноорганизованных животных (*D. melanogaster*), что является результатом уменьшения повреждения ДНК при воздействии АФК.
- С помощью транскриптомного анализа сложноорганизованного животного показано, что радиопротекторные свойства белка Dsup не являются результатом активации им экспрессии генов, связанных с ответом модельного животного на радиацию и окислительный стресс.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость результатов, представленного в диссертации исследования, состоит в (i) обосновании протекторного механизма белка Dsup и его согласованности с молекулярным экранированием ДНК от повреждений АФК, (ii) установлении взаимосвязи структурных и протекторных свойств белка Dsup, включая демонстрацию неупорядоченности его структуры и формирование им нечеткого комплекса с ДНК. Глобально, работа вносит вклад в область изучения роли неупорядоченных белков, важных для современной биофизики белка, как фактора устойчивости к экстремальным физико-химическим стрессам и необходимого условия криптобиоза.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в развитии возможностей для использования неупорядоченных белков для получения новых протекторов от физико-химических стрессов на основе молекулярного экранирования ДНК. Так радиопротекторы на основе белка Dsup могут использоваться в радиотерапии, радиационной безопасности и для задач освоения космоса. Подтверждены протекторные свойства белка Dsup в сложноорганизованных животных, возможность получения *Dsup*-экспрессирующих организмов различных уровней организации с повышенной устойчивостью к физико-химическим стрессам

может использоваться при создании продуцентов, биоремедиаторов, биосенсоров. На основе трековых мембран, модифицированных белком Dsup, разработан прототип фильтров для извлечения ДНК из сложных растворов.

Методы и методология исследования

Для решения поставленных в диссертационной работе задач были использованы современные биофизические, молекулярно-биологические и омиксные методы. Структурные свойства белка Dsup исследовали методами, подходящие для исследования неупорядоченных белков, включая *in silico* анализ, малоугловое рассеяние (МУРР) и спектроскопию кругового дихроизма (КД). Транскриптомный анализ *D. melanogaster* был проведен для установления влияния белка Dsup на модельный организм до и после облучения радиацией.

Объекты и предмет исследования

Объектами исследования были *Dsup*-экспрессирующие линии плодовых мушек *D. melanogaster* (#1-4), *Dsup*-экспрессирующие клетки человека HEK293 и рекомбинантный белок Dsup.

Предметом диссертационного исследования был радиопротекторный механизм и прикладные свойства белка Dsup.

Положения, выносимые на защиту

1. Радиопротекторный механизм белка Dsup связан с молекулярным экранированием ДНК от АФК, образующихся при радиолизе, и является результатом того, что неупорядоченный гибкий белок формирует нечеткий/конформационно-гетерогенный комплекс Dsup-ДНК и устойчив к действию АФК.
2. Белок Dsup является протектором в сложноорганизованных животных, что подтверждалось увеличением выживаемости при окислительном стрессе и облучении гамма-квантами с дозами до 1000 Гр, а также сокращением повреждений ДНК. При этом радиопротекторные свойства белка Dsup определяются молекулярным экранированием, а не транскрипционной регуляцией антиоксидантного ответа и репарации ДНК.

Степень достоверности и апробации работы

Для получения результатов диссертационного исследования использовались взаимодополняющие современные экспериментальные методы. Результаты диссертации опубликованы в 7 научных статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для

защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук. На разработанный материал фильтров был получен патент (RU2838994C1).

Результаты диссертации докладывались на международных и всероссийских конференциях, публиковались в их тезисах: “Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ” 2025, “MWN” 2025, “Biomembranes” 2024, “Актуальные проблемы радиационной биологии. Конференция научного совета РАН по радиобиологии” 2024, “International Conference on Space Biology and Aerospace Medicine” 2023, “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology” 2022, “46th FEBS Congress” 2022, “45th FEBS Congress” 2021, “13th EBSA” 2021, “EMBO|EMBL Symposium: Transcription and RNA Meet DNA Replication and Reparation” 2021.

Личный вклад автора

Представленные в диссертации результаты и защищаемые положения получены при непосредственном участии соискателя совместно с коллективом соавторов. Личный вклад соискателя заключается в: изучении влияния белка Dsup на модельные организмы и его протекторных свойств [1, 4]; проведении транскриптомного анализа модельных животных до/после облучения ионизирующим излучением с последующим биоинформатическим анализом и интерпретацией полученных данных [1, 6]; исследовании структурных свойств белка Dsup и его комплекса с ДНК в различных растворах методами малоуглового рентгеновского рассеяния (участие в подготовке образцов и измерениях, анализ данных, формулирование выводов), спектроскопии кругового дихроизма (подготовка образцов, анализ данных, формулирование выводов), *in silico* анализа свойств белка (подбор программ, анализ данных, формулирование выводов) [2, 5]; разработке и получении фильтров на основе трековых мембран, изучении их функциональных характеристик [3, 5, 7]; написании статей и патента; представлении результатов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора (Глава 1), описания материалов и методов исследования (Глава 2), результатов и их обсуждения (Главы 3-5), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 298 ссылок на источники. Работа содержит 111 страниц текста, 30 рисунков и 13 таблиц.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и задачи диссертационной работы.

В **обзоре литературы (Глава 1)** представлены исследования экстремально радиорезистентных организмов. Выделены уникальные случаи радиорезистентности среди животных, в особенности, тихоходок, являющихся одними из самых экстремотолерантных животных на Земле. Показано как тихоходки стали модельными организмами для исследований криптобиоза и воздействия физико-химических стрессов. Описаны известные на данный момент причины экстремальной устойчивости тихоходок и выделено особое значение групп неупорядоченных белков тихоходок (TDP). Представлена основная информация о белке тихоходок Dsup и его протекторном механизме.

Глава 2 посвящена описанию материалов и методов, использованных в диссертационной работе.

На основе аминокислотной последовательности белка Dsup анализировались особенности аминокислотного состава, распределения заряженных/гидрофобных аминокислот (EMBOSS, PONDR, CIDER, Composition Profiler), состав сопоставлялся с выборками неупорядоченных белков (график Уверского, база DisProt). Предсказывались расположение неупорядоченных регионов в белке (RIDAO: PONDR VLXT/VSL2/VL3/FIT, IUPred, MDP), предпочтительные конформации молекулы на основе фазовой диаграммы Даса-Паппу (CIDER), склонность белка к жидкостному фазовому переходу и переходу в более структурированное состояние (FuzPred), регионы молекулярного распознавания (FuzDrop-ANCHOR), сайты фосфорилирования (DEPP, NetPhos 3.1) и сайты карбонилирования (CarSite-II, CarSPred 2.0).

Рекомбинантный белок Dsup, меченный гистидином (6xHisTag), получали в кишечной палочке *E. coli* штамма BL21 (DE3), содержащей плазмиду pCold-I-Dsup (Addgene #90021). Белок Dsup был выделен и очищен из лизата с использованием набора Ni-NTA Fast Start Kit (QIAGEN) для меченых гистидином белков, затем белок очищали на эксклюзионном хроматографе NGC Quest 10 Plus Chromatography System (BioRad) с колонкой ENrich SEC 650 (BioRad).

Измерения белка Dsup в различных растворах методами МУРР проводились на дифрактометре Xeuss 3.0 Xenocs SAXS/WAXS (ЛНФ ОИЯИ). Метод МУРР основан на исследовании профиля упругого рассеяния монохроматического рентгеновского излучения, в нашем случае с $\lambda_{\text{рент. излуч.}} =$

1.5419 Å (от микрофокусного источника GeniX3D CuK α), на неоднородностях вещества путем регистрации рассеянного излучения на детекторе. Анализ данных МУРР проведен в программных пакетах Xenocs XSACT 2.4., SASfit, ATSAS 3.2.1. и на сервере ATSAS-online, конформационный ансамбль белка моделировался с помощью метода оптимизированных ансамблей в EOM 3.0.

Измерения спектров КД проведены на спектрометре J-1100 Circular Dichroism (Jasco). Содержание вторичных структур в белке Dsup было рассчитано на сервере DichroWeb с помощью алгоритмов ContinLL и CDSSTR (сети 4, 7, 180), подходящих для неупорядоченных белков.

Свойства белка Dsup изучались в деионизованной воде (КД и МУРР), растворе ФСБ (КД и МУРР), воде и ФСБ с добавлением денатуранта/мочевины (КД и МУРР), в присутствии десольватирующего агента 2,2,2-трифторэтанола (КД) и в составе комплекса с плазмидной ДНК *pCold-I-Dsup* размером 5694 п.о. (КД).

Эксперименты по определению продолжительности жизни *D. melanogaster* проводились в 3 и более повторях с группами из 50 организмов одного пола и возраста 2-3 дня. Устойчивость к окислительному стрессу *D. melanogaster* исследовалась при добавлении в питательную среду 9 % пероксида водорода. Радиорезистентность *D. melanogaster* изучалась после γ -облучения на микротроне МТ-25 (ЛЯР ОИЯИ) с поглощенными дозами 500, 1000, 1500 Гр и при уровне дозы ~ 0.3 Гр/с (дозиметрия реального времени: ионизационная камера SNC600с). Радиопротекторные свойства белка Dsup в клетках человека HEK293 были исследованы (колоногенный тест) после облучения высокоэнергетическими протонами (p^+ : 150 МэВ, в пике Брэгга, доза 1-5 Гр с уровнем ~ 0.01 Гр/с), используемыми при проведении процедур радиотерапии на МТК Фазотрона (ЛЯП ОИЯИ). Параметры пучка контролировались клиническим дозиметром PTW UNIDOS-E (PTW-Freiburg) с ионизационной камерой TM30013.

Методом ДНК-комет (“щелочной”) определяли влияние белка Dsup на уровень повреждений ядерной ДНК из клеток гемолимфы личинок *D. melanogaster* при действии пероксида водорода. Для этого с образцом из 50 личинок проводили электрофорез в агарозном геле на предметном стекле, ДНК окрашивали (DAPI), изображения ядер получали на установке EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher) и затем анализировали (%-ДНК в хвосте кометы) в программе TriTek CometScore v2.0.0.38.

Влияние белка Dsup на транскриптом *D. melanogaster* исследовалось до и после облучения γ -облучения на микротроне МТ-25 с поглощенной дозой 1000 Гр (через 1 час). Транскриптомный анализ проводился с использованием системы Affymetrix GeneChip System, набора GeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kit и микрочипов GeneChip Drosophila Genome 2.0 Arrays (Thermo Fisher). Биоинформатический анализ включал определение дифференциально экспрессирующихся генов и их функций (TAC 4.0.2.), обогащенных биологических процессов для этих генов и кодируемых ими белковых доменов (DAVID 6.8), основных метаболических путей по базе Reactome и построение биологических сетей на основе иерархии биологических процессов в Cytoscape 3.7.1. ClueGO 2.5.6.

Разработка материала для извлечения ДНК из растворов состояла из: (i) исследования стабильности и склонности к агрегации белка Dsup после облучения γ -излучением (1000-10000 Гр) с помощью электрофореза и МУРР, (ii) получения функционализированных белком Dsup полиэтилентерефталатных (ПЭТ) трековых мембран (диаметр пор 0.1–4.5 мкм) в ходе трехстадийного синтеза и ковалентного сшивания белка Dsup через глутаральдегидные группы (ТМ_{мод}-Dsup: ПЭТ-Al(OH)₃-АПТЭС-ГА-Dsup), (iii) характеристики полученного материала сканирующей электронной микроскопией (Hitachi SU8020) и измерением ζ -потенциала, (iv) изучения десорбции белка Dsup и сорбция на полученных трековых мембранах модельной ДНК (плазмида *pCold-I-Dsup*, 5694 п.о.).

Глава 3 посвящена исследованию структурных свойств белка Dsup. В Разделе 3.1 описан *in silico* анализ свойств белка Dsup, который состоял из анализа аминокислотной последовательности белка, предсказаний неупорядоченных регионов и других свойств белка. Белок Dsup имеет повышенное содержание аминокислот, характерных для неупорядоченных белков (*Рис. 1А*). Так, на долю серина, глицина, лизина и треонина приходится 69.8% из 445 аминокислот, в белке отсутствуют серосодержащие и ароматические аминокислоты. У белка Dsup 26.7 % заряженных аминокислот, которые распределены по белку (κ -параметр – 0.1479, высокое смешивание), общий положительный заряд (+23 при pH 7; pI 10.56), высокая гидрофильность (шкала Кайта-Дулиттла – 3.51), а также соотношение в белке этих параметров характерно для неупорядоченных белков (*Рис. 1Б*). Предсказание профиля неупорядоченности белка Dsup показало, что доля неструктурированных регионов превышает 79%, причем структурированные регионы располагаются преимущественно в центральном и N-концевом регионах белка (*Рис. 1В*).

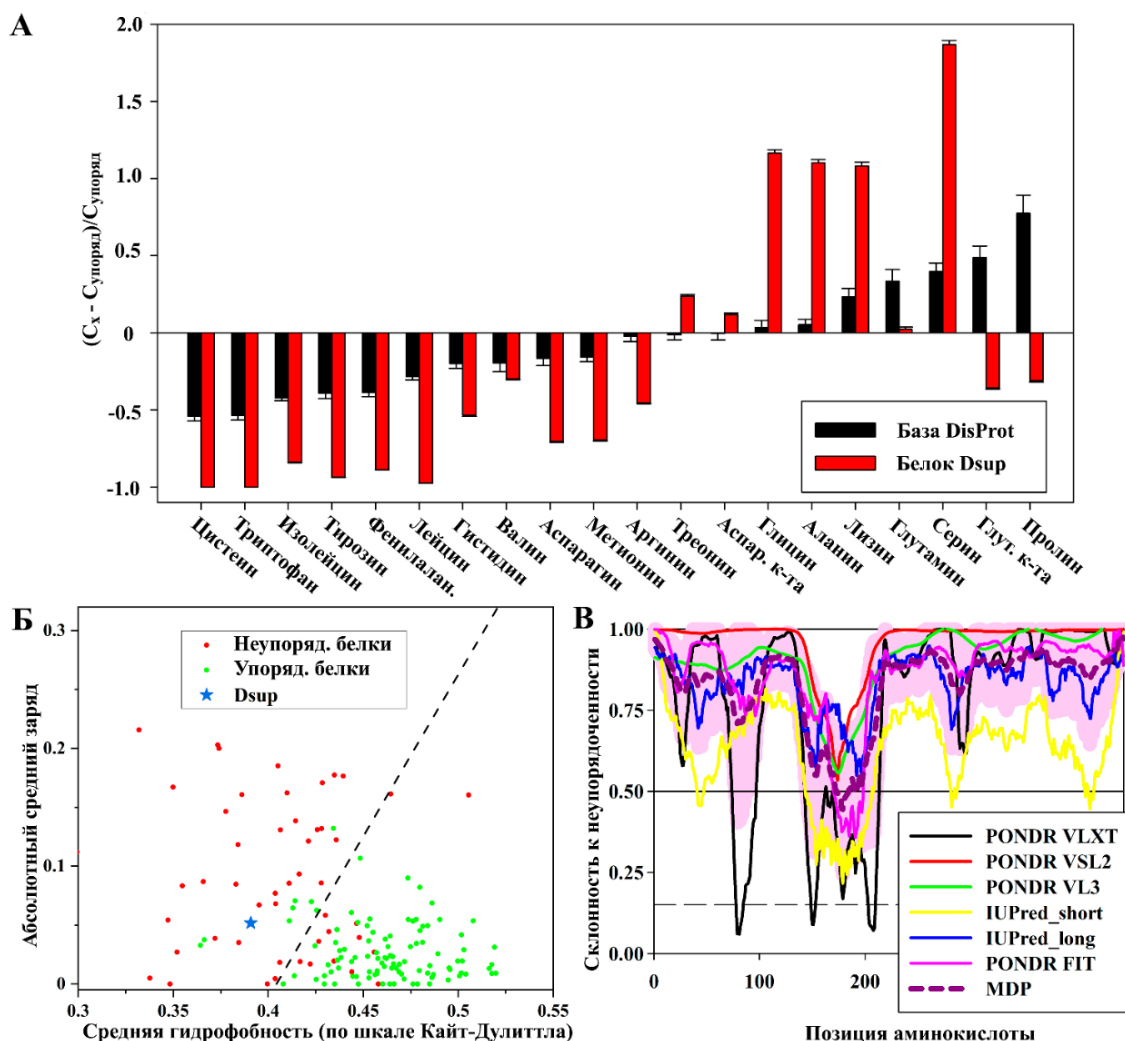


Рисунок 1. Анализ неупорядоченности белка Dsup методами биоинформатики. (А) Сравнение аминокислотного состава белка Dsup (красные столбцы) с данными базы неупорядоченных белков DisProt (черные столбцы). Аминокислоты отсортированы по склонности к формированию неструктурированных регионов, данные представлены как $(C_x - C_{\text{order}})/C_{\text{order}}$, где C_x - содержание данного типа аминокислот, C_{order} - содержание аминокислот в сети белков Protein Databank Select. Положительное значение – относительное обогащение, отрицательное значение – обеднение, стандартные отклонения – для более 10000 итераций перебора. (Б) График Уверского, визуализирующий свойства белка Dsup (синий) среди наборов неупорядоченных (красный) и упорядоченных белков (зеленый). (В) Предсказание склонности к неупорядоченности белка Dsup на основе группы алгоритмов, ее значение более 0.5 – неупорядоченный регион, более 0.15 – гибкий регион, менее 0.5 – структурированный регион.

Часть конформационных свойств белка Dsup и его физико-химических особенностей были предсказаны исходя из аминокислотного состава. Фазовая диаграмма Даса-Паппу относит белок Dsup к Янусовым последовательностям, существующим в вытянутой и клубковой (компактной) форме, что впоследствии согласовалось с результатами МУРР. Для белка предсказана высокая предрасположенность к жидкостному фазовому переходу ($p_{\text{LLPS}}=0.9997$) с участием двух

длинных регионов, формирующих капли (1–166, 194–445), данный процесс может быть важен для взаимодействия белка Dsup с хроматином.

Белок не склонен к переходу в более структурированное состояние при взаимодействии с другими молекулами, что согласовалось с результатами КД (*см. ниже*). В белке предсказаны регионы с множественными режимами связывания (138–145, 164–175, 177–195) и регионы, участвующие в молекулярном узнавании (1–8, 41–56, 79–86, 93–106, 136–178, 185–210, 250–295, 300–338, 346–397, 408–445), что предполагает участие большей части белка в межмолекулярном взаимодействии и т.д. Предсказание сайтов посттрансляционной модификации показало, что (а) фосфорилирование, влияющее на структурные свойства белка, его взаимодействия с ДНК и другими молекулами, с большей вероятностью происходит в неструктурированных регионах белка Dsup (N- и C-концевых), (б) карбонилирование, одно из основных типов модификации белков при взаимодействии с АФК, менее вероятно в центральных регионах и вероятнее в N-концевой части белка, обогащенной аргинином, лизином, пролином и треонином.

В Разделе 3.2. описаны результаты исследования белка Dsup в различных растворах (вода, ФСБ, вода-мочевина, ФСБ-мочевина) методом малоуглового рентгеновского рассеяния. По данным МУРР (*Рис. 2*), белок Dsup в растворе является мономерной гибкой молекулой вытянутой/стержнообразной формы. Свойства Dsup характерны для неглобулярных и сильно неупорядоченных белков: график Кратки без колоколообразной формы (*Рис. 2Б*), значения рассчитанных коэффициентов Флори ($R_g = R_0 N^{\nu}$, $\nu_{\text{денатурир.}} \sim 0.6 > \nu_{\text{Dsup}} \sim 0.5 (\sim \nu_{\text{случ. клубка)}) > \nu_{\text{глобулярн.}} \sim 0.33$) и размеры молекулы для 445 аминокислот ($R_g: 53\text{--}63 \text{ \AA}$ и $D_{\text{max}}: 200\text{--}265 \text{ \AA}$). Показано влияние внешнего окружения на компактность молекулы Dsup: $D_{\text{m}}, R_{\text{g Dsup-ФСБ}} < D_{\text{m}}, R_{\text{g Dsup-H}_2\text{O}} < D_{\text{m}}, R_{\text{g Dsup-ФСБ-Мочевина}}/D_{\text{m}}, R_{\text{g Dsup-Мочевина}}$, то есть в растворе ФСБ белок Dsup более компактный, а его помещение в деионизованную воду и добавление денатурирующего агента (мочевины) приводило к формированию менее плотной и более вытянутой молекулы, что согласуется с данными КД (*см. ниже*).

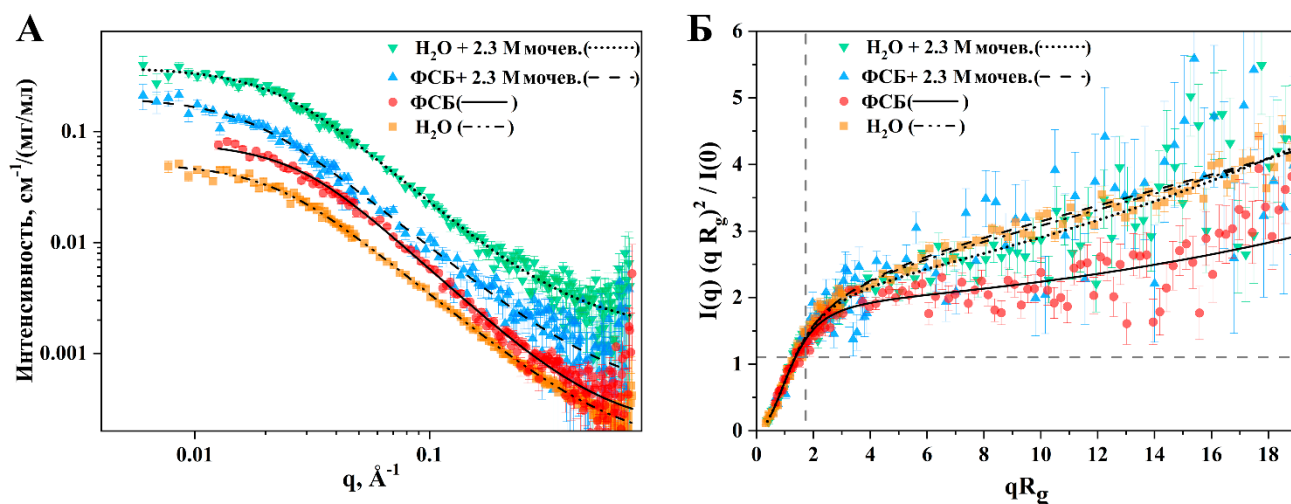


Рисунок 2. Влияние различных условий раствора на молекулярные свойства белка Dsup по данным МУРР: ионная сила раствора (вода (оранжевый) и ФСБ (красный)) и присутствие денатурирующего агента (мочевина в воде (зеленый) и в ФСБ (синий)). Данные представлены (А) со сдвигом по у-оси в формате log–log координат и (Б) в виде графика Кратки. Линии, фитирующие экспериментальные данные (черный), получены с помощью приближения Гауссова клубка.

Из данных МУРР в программах DAMMIF и DAMAVER, получены *ab initio* модели белка Dsup (низкого разрешения), соответствующие наиболее вероятному для всех конформаций расположению атомов в молекуле и имеющие линейные размеры $200 \times 80 \text{ \AA}$ в растворе ФСБ и $270 \times 80 \text{ \AA}$ в воде. Гибкий и неупорядоченный белок Dsup в растворе существует во множестве конформаций, а кривые МУРР для такого белка являются суперпозицией рассеяния от всех его конформаций, поэтому на основе данных МУРР было осуществлено моделирование конформационного ансамбля белка (ЕОМ:метод оптимизации ансамблей). Моделирование включало отбор по качеству аппроксимации экспериментальных данных МУРР теоретическими кривыми (Рис. 3А), полученными для 10 000 случайных моделей из 445 зерен-аминокислот (Рис. 3Б), и минимизацию числа моделей. Были получены финальные ансамбли белка Dsup из 7 моделей для раствора ФСБ (Рис. 3В) и 6 моделей для воды. Качество фитирования экспериментальных данных для финальных ансамблей составило по значению χ^2 – 1.468 и 1.342 соответственно. Значения R_g моделей были в диапазоне 45–130 $\text{\AA}$, и отобранные модели имели бимодальное распределение по размерам (Рис. 3Б), то есть ансамбль состоит из вытянутых и компактных конформаций ($R_{g \text{ средн.}} \sim 90 \text{ \AA}$; $R_{g \text{ макс.(1)}} \sim 50 \text{ \AA}$; $R_{g \text{ макс.(2)}} \sim 100 \text{ \AA}$), а расчет показал высокую гибкость молекулы ($R_{\text{flex}} \sim 88\text{--}89\%$). Это может означать высокую вероятность слабых внутри- и межмолекулярных взаимодействий с сильным влиянием на структуру белка его повышенных концентраций в растворе.

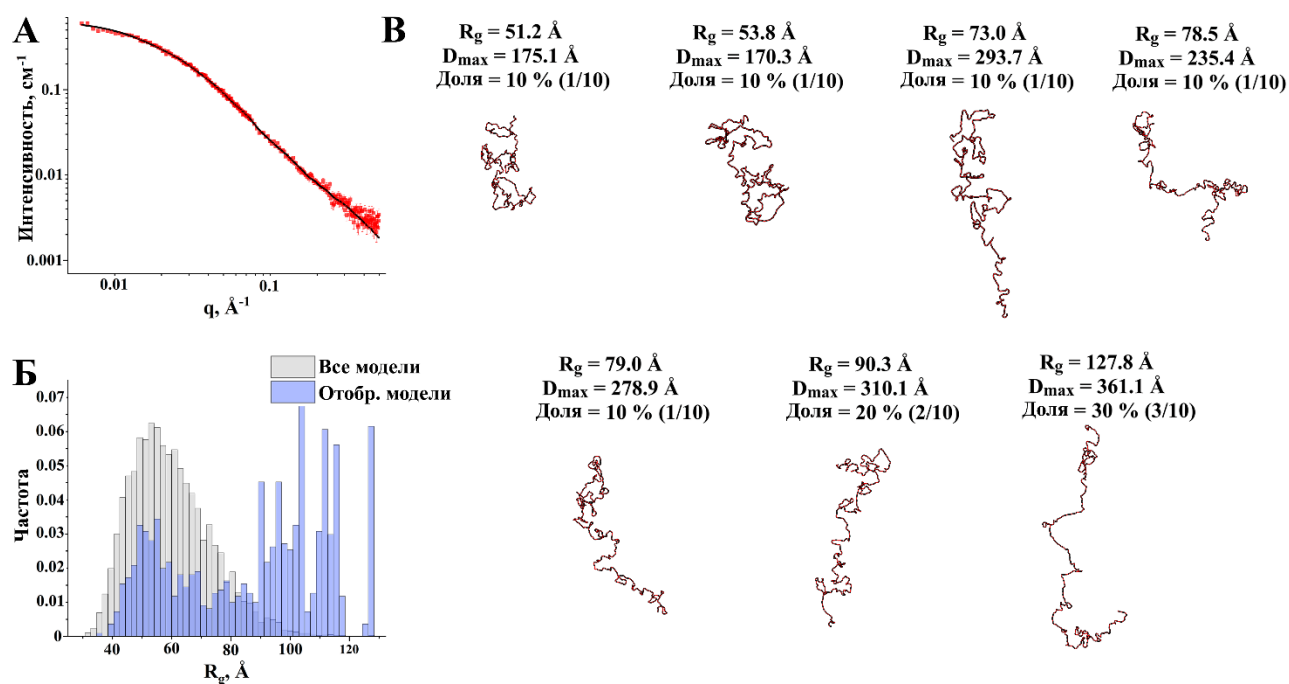


Рисунок 3. Конформационный ансамбль белка Dsup в растворе ФСБ, полученный моделированием на основе данных МУРР по методу оптимизированных ансамблей (ЕОМ): (А) фитирование экспериментальных данных объединенной кривой для конформационного ансамбля (черный), (Б) распределение по размерам R_g для набора случайных моделей (серый) и полученных в ходе моделирования (синий), (В) модели финального ансамбля и их характеристики.

В Разделе 3.3. представлены результаты исследования белка Dsup в различных растворах (ФСБ, вода, ФСБ-мочевина, вода-мочевина, трифторэтанол) методом спектроскопии кругового дихроизма (Рис. 4А). По данным КД, белок Dsup содержит 62–66% неупорядоченных регионов, 5–7% α -спиралей и 30–31% β -листов, что позволяет отнести белок к группе специфичных для тихоходок неупорядоченных белков (TDPs). Добавление десольватирующего агента (трифторэтанола), моделирующее безводные условия и процесс ангидробиоза в тихоходках, приводило к переходу белка Dsup из преимущественно неструктурированного состояния к α -спирализованному, что ранее наблюдалось для других специфичных неупорядоченных белков тихоходок как LEA, SAHS, CAHS, EtAHS.

Анализ дифференциальных спектров КД (разница между сигналами комплекса и его компонент) показал, что содержание вторичных структур и неупорядоченных регионов в белке Dsup остается неизменным при взаимодействии с ДНК (Рис. 4Б). Полученный результат и предсказанное отсутствие у белка склонности к переходам в более структурированное состояние при взаимодействиях с другими молекулами позволили отнести комплекс Dsup-ДНК к нечетким или структурно-гетерогенным комплексам неупорядоченных белков. Такой тип

взаимодействия предполагает множественные взаимозаменяемые межмолекулярные контакты, сохранение у неупорядоченных белков в составе комплекса гибкости и конформационной подвижности. Такой тип комплекса Dsup-ДНК сочетается с неспецифичностью (подтверждено электрофорезом и др.) и достаточно высокой эффективностью взаимодействия белка со свободной ДНК и нуклеосомами. Предположительно, такие неупорядоченные ДНК-связывающие белки (Dsup, гистон Н1 и др.) могут служить основой для разработки протекторов, участвующих в молекулярном экранировании ДНК от АФК.

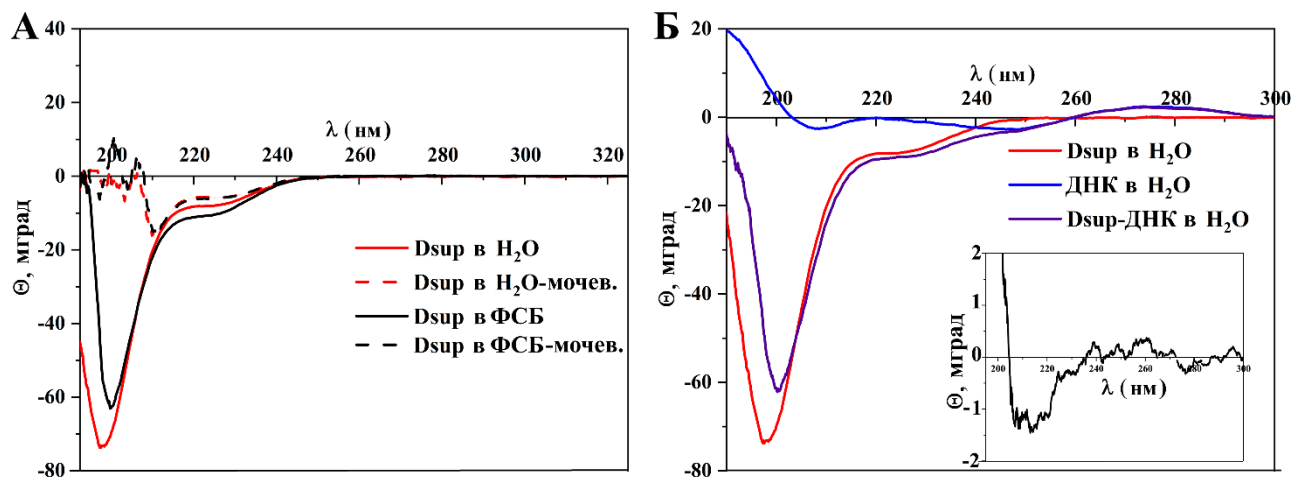


Рисунок 4. Исследование вторичной структуры белка Dsup по данным спектроскопии КД: (А) влияние на нее различных растворов (вода и ФСБ) – при нативных и денатурирующих условиях (мочевина), (Б) влияние на белок взаимодействия с модельной ДНК и дифференциальный спектр (вставка), полученный вычитанием из сигнала комплекса сигналов белка Dsup и ДНК.

В **Главе 4** представлено исследование *in vivo* белка Dsup и его протекторных свойств в модельных организмах: (Раздел 4.1) подтверждение получения Dsup-экспрессирующих *D. melanogaster*, исследование влияния белка Dsup на продолжительность жизни и локомоторную активность (тест на отрицательный гравитаксис), определение возможности повышения устойчивости к физико-химическим стрессам *D. melanogaster* (пероксид водорода, γ -облучение) и культур клеток человека HEK293 (протонная радиотерапия), оценивание ДНК-протекторных свойств Dsup в *D. melanogaster* по методу ДНК-комет, (Раздел 4.2) изучение влияния белка Dsup на транскриптом *D. melanogaster*, (Раздел 4.3) изучение влияния белка Dsup на транскриптом *D. melanogaster* после облучения γ -излучением, то есть радиационный ответ дрозофил.

Сначала во всех линиях *D. melanogaster* (#1-4) были подтверждены экспрессия гена Dsup (количественная ПЦР) и наличие белка Dsup в организмах (вестерн-блоттинг). У линии #1

продолжительность жизни по отношению к контролю не менялась (логранговый тест: $p > 0.05$) и повышалась средняя продолжительность жизни самок на $\sim 7.5\%$ (тест Фишера: $p < 0.01$). Тест на отрицательный гравитаксис в первой версии (пересечения отметки на высоте 10 см за 10 с) показал сокращение по отношению к контролю локомоторной активности для линий #2–4 (тест Даннета: $p < 0.05$), а во второй версии (пересечения отметки на высоте 12 см за 8 с) показал сокращение локомоторной активности для всех линий #1–4 (тест Даннета: $p < 0.001$). Таким образом, показана возможность получения *Dsup*-экспрессирующих *D. melanogaster* со стабильной и/или незначительно изменяющейся продолжительностью жизни и локомоторной активностью.

Для всех *Dsup*-экспрессирующих линий *D. melanogaster* обоих полов показано увеличение продолжительности жизни при действии пероксида водорода (логранговый тест: $p < 0.001$), увеличение показателей средней продолжительности жизни для самцов (43–90%) и самок (23–49%), а также увеличение возраста 90%-гибели (Рис. 5А и 5Б). Показано наличие взаимосвязи уровня экспрессии гена *Dsup* в *D. melanogaster* обоих полов с устойчивостью к пероксиду водорода, так продолжительность жизни организмов обоих полов линии #1 гомозиготной по гену *Dsup* увеличивалась (логранговый тест: $p < 0.001$) и не менялась у линии #1/+ гетерозиготной по гену *Dsup* (логранговый тест: $p > 0.05$).

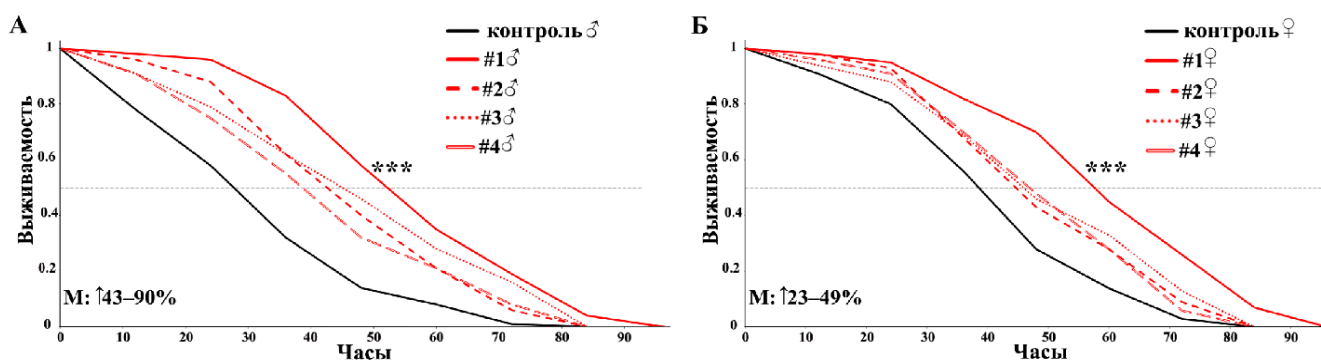


Рисунок 5. Исследование влияния белка *Dsup* на устойчивость к действию пероксида водорода различных линий *D. melanogaster*. Повышение устойчивости к действию пероксида водорода в *Dsup*-экспрессирующих организмах (#1–4) по отношению к контролю для организмов обоих полов: (А) самцы и (Б) самки. Данные выживаемости объединены между повторами. М – средняя продолжительность жизни. Логранговый тест: *** – $p < 0.001$, НЗ – различие незначительно.

Основная доля повреждений, вносимых ионизирующим излучением в живых организмах, вызвана его косвенным действием, то есть АФК и их продуктами, образующимися при радиолизе водной среды клеток. Поэтому для исследования радиопротекторных свойств белка

Dsup в *D. melanogaster* была выбрана Dsup-экспрессирующая линия (#1) с максимальной устойчивостью к действию пероксида водорода, постоянной общей продолжительностью жизни и повышенной устойчивостью ДНК к повреждениям от АФК (Рис. 5, 6А и 7). Организмы облучались γ -излучением с поглощенными дозами 500, 1000, 1500 Гр (Рис. 6Б, 6В и 6Г). При дозе 500 Гр для Dsup-экспрессирующих организмов наблюдалось (Рис. 6Б) увеличение выживаемости по сравнению с контролем (логранговый тест: $p < 0.001$), средней продолжительности жизни ($\sigma - +40\%$, $\phi - +25\%$; тест Фишера: $p < 0.001$), максимальной продолжительности жизни (тест Фишера: $p < 0.01$) и возраста 90%-гибели организмов ($\sigma - +33\%$, $\phi - +17\%$; тест Фишера: $p < 0.05$). При дозе 1000 Гр ($\sim LD_{50}$ для *D. melanogaster*) для Dsup-экспрессирующих организмов установлено (Рис. 6В) увеличение по сравнению с контролем выживаемости самок (логранговый тест: $p < 0.001$) и средней продолжительности жизни организмов обоих полов ($\sigma - +343\%$, $\phi - +16\%$; тест Фишера: $p < 0.01$). При дозе 1500 Гр ($\sim LD_{100}$ для *D. melanogaster*) значимых различий в выживаемости организмов этих линий обнаружено не было (Рис. 6Г). Также были проведены эксперименты для определения возможности использования белка Dsup как радиопротектора для клеток человека (HEK293) при протонной радиотерапии (p^+ , 150 МэВ, пик Брэгга, дозы 1-5 Гр), которые показали значительное увеличение выживаемости Dsup-экспрессирующих клеток по сравнению с контролем.

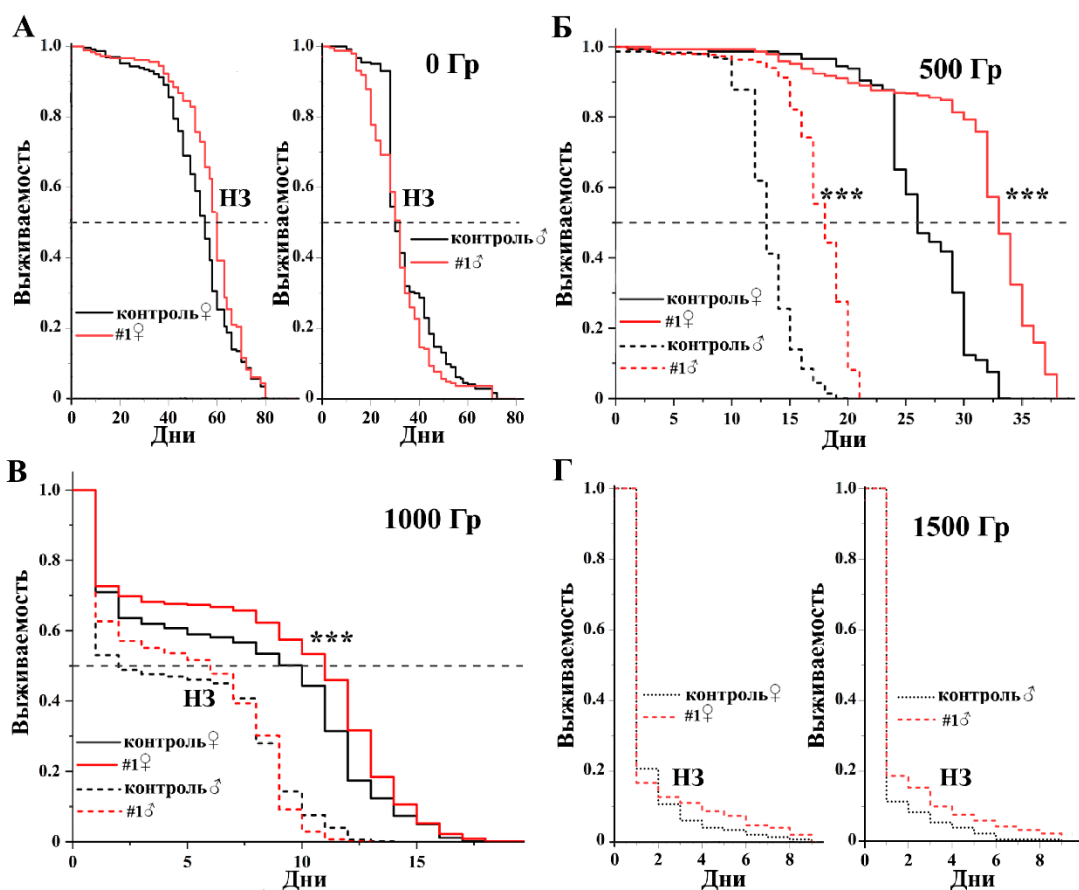


Рисунок 6. Исследование общей продолжительности жизни и радиорезистентности при облучении γ -излучением контрольной и *Dsup*-экспрессирующей (#1) линий *D. melanogaster*. Было установлено повышение радиорезистентности *Dsup*-экспрессирующей линии. Данные выживаемости (кривые Каплана-Мейера) для обоих полов объединены между повторами: (А) исходная и после облучения дозами (Б) 500, (В) 1000, (Г) 1500 Гр. М – средняя продолжительность жизни. Логранговый критерий: *** – $p < 0.001$, H3 – различие незначительно.

С помощью метода ДНК-комет для *Dsup*-экспрессирующих *D. melanogaster* показано (Рис. 7А и 7Б) снижение по сравнению с контролем числа повреждений ДНК из-за пероксида водорода (меньше на ~18 %, тест Стьюдента: $p < 0.05$). Это подтверждает взаимосвязь протекторного механизма белка *Dsup* в *D. melanogaster* со снижением числа АФК-индуцированных повреждений ДНК и согласуется с основной гипотезой о причине протекторного действия белка *Dsup*.

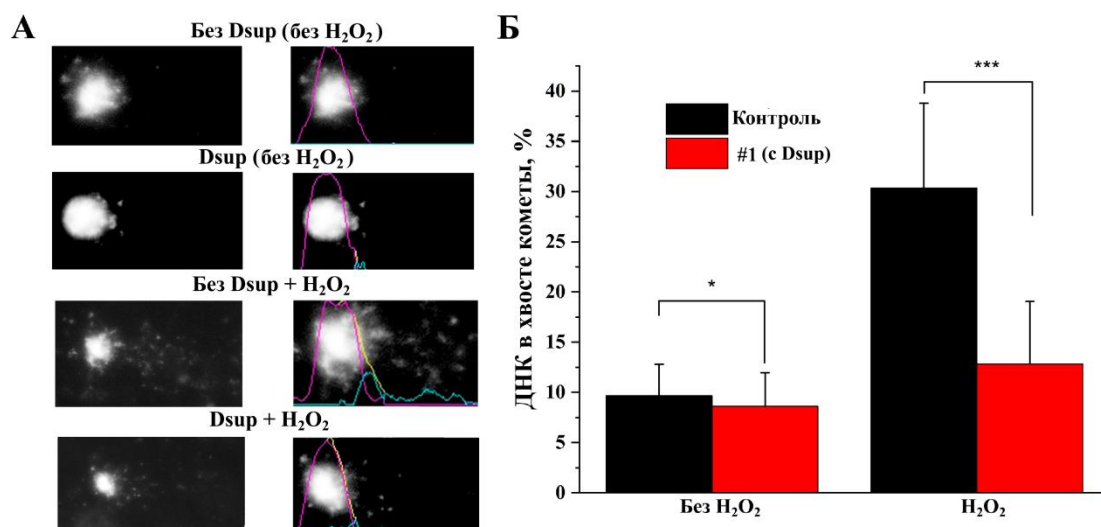


Рисунок 7. Исследование протекторных свойств белка Dsup к пероксиду водорода по методу ДНК-комет с клетками гемолимфы из личинок *D. melanogaster*. (А) Примеры изображений комет, использованных в анализе, по которым определяли часть ДНК в хвосте кометы. (Б) Сокращение из-за белка Dsup фрагментации ядерной ДНК при действии пероксида водорода по отношению к контролю. Данные представлены как стандартное отклонение от среднего и сравнивалась по критерию Стьюдента: *** – $p < 0.001$, * – $p < 0.05$.

В Разделе 4.2. представлены исследования влияния белка Dsup на транскриптом *D. melanogaster*. Дифференциально экспрессирующиеся гены определялись для объединенного набора транскриптомных данных *Dsup*-экспрессирующих линий 1-4# (для снижения влияния места встройки гена *Dsup* в геном) по отношению к контролю. По результатам транскриптомного анализа, Dsup снижал активность большого числа генов (733) *D. melanogaster*, то есть 99.73% от общего числа изменивших экспрессию. При выбранном критерии отбора (> 2 -кратное изменение, F-тест: $p < 0.01$) изменения экспрессии генов из выборки не превышали 4 раз. Был сделан вывод о том, что Dsup является неспецифичным репрессором транскрипции.

Для полученного набора генов были определены обогащенные категории биологических процессов (DAVID BP GO). Dsup влиял на активность генов пространственной организации ДНК на различных уровнях (нуклеосомы-хроматин-хромосомы), регуляцию транскрипции, регуляцию клеточных метаболических процессов, функционирование нервной системы, поведенческие процессы и морфогенез. На основе полученного набора генов построена сеть биологических процессов, на которые повлиял белок Dsup (Рис. 8). Также для полученного набора генов были определены обогащенные категории, кодируемых ими функциональных белковых доменов (DAVID PD GO). Были обогащены категорий укладки гистонов, гистонов H3

и H4, TATA-боксов (TAF), цинковых пальцев, BTB/POZ, PDZ, кинезиновых, иммуноглобулиновых и других доменов. Анализ биологических путей Reactome показал обогащение категорий метилирования и ацетилирования гистонов, энзиматической модификации хроматина и др.

Рисунок 8. Сеть обогащенных биологических процессов для набора дифференциально экспрессирующихся генов в *D. melanogaster*, демонстрирующая влияние белка Dsup на транскриптом *D. melanogaster*. Белок Dsup был неспецифичным репрессором транскрипции и оказывал влияние на биологические процессы организации ДНК на различных уровнях (красный), регуляции транскрипции и функционирования нервной системы, однако активации из-за белка Dsup процессов антиоксидантного ответа и репарации ДНК не наблюдалось.

Таким образом, белок тихоходок Dsup был неспецифичным репрессором транскрипции в *D. melanogaster*, что может быть вызвано конкуренцией Dsup с другими хроматиновыми белками за связывание с ДНК, его влиянием на открытость и/или динамику хроматина. Некоторый вклад в изменения транскрипции может вносить и установленный неспецифичный характер взаимодействия белка Dsup с нуклеотидными последовательностями как ДНК так и РНК. Предположительно, сокращение локомоторной активности у части *Dsup*-экспрессирующих линий может быть связано с сокращением экспрессии генов регуляции функционирования нервной системы, что наблюдались в случае сверхэкспрессии генов неупорядоченных ДНК-связывающих белков (Tau, FUS, TDP43, HMGN). Таким образом, у

Dsup-экспрессирующих *D. melanogaster* в отсутствие стресса не наблюдалось активации из-за белка *Dsup* процессов антиоксидантного ответа и репарации ДНК, которые могли бы быть альтернативной причиной повышения устойчивости к исследуемым физико-химическим стрессам.

В Разделе 4.3 представлены результаты транскриптомного анализа *D. melanogaster*, облученных дозой γ -излучения в 1000 Гр, при которой наблюдалось протекторное действие белка *Dsup*. Анализировались ответы на радиацию (1000 против 0 Гр) независимо для *Dsup*-экспрессирующих и контрольных организмов, а также различия в экспрессии между облученными *Dsup*-экспрессирующими и контрольными организмами. Раздельный анализ ответов на радиацию (1000 против 0 Гр) показал существенно меньшие изменения у организмов с белком *Dsup*, у которых 520 генов были дифференциально экспрессированы по сравнению с 980 генами у контроля. Сравнение облученных *Dsup*-экспрессирующих и контрольных организмов, показало снижение экспрессии 432 генов (> 2 -раз, F-тест: $p < 0.01$), что составляло 99.3% от общего числа дифференциально экспрессирующихся генов. Таким образом, белок *Dsup* в *D. melanogaster*, облученных γ -излучением с дозой 1000 Гр, был неспецифичным репрессором транскрипции, одновременно сокращая повреждения ДНК и увеличивая выживаемость (Рис. 6В). Анализ обогащенных биологических процессов (DAVID BP GO) для полученного набора генов позволил сделать вывод о меньшей из-за белка *Dsup* экспрессии генов, связанных с репарацией, репликацией, рекомбинацией ДНК, сворачиванием белков, нейрогенезом, иммунным ответом. На основе этого был сделан вывод, что белок *Dsup* не участвует в активации репарации ДНК и антиоксидантной системы, что ограничивает возможную роль этих процессов в радиопротекторном механизме.

В Главе 5 представлено исследование возможностей использования белка тихоходок *Dsup* для создания фильтрующих материалов для выделения, концентрирования и хранения ДНК. Использование белков из экстремофильных и экстремотолерантных организмов благодаря их повышенной стабильности, функциональности в широком диапазоне условий и иных особенностей является перспективным подходом при разработке новых материалов.

В Разделе 5.1. представлено исследование устойчивости белка *Dsup* в растворе к облучению γ -излучением (1 000 – 10 000 Гр). По данным электрофореза и МУРР, *Dsup* оказался существенно стабильнее контрольного белка БСА, не был подвержен значительной радиационно-индуцированной деградации и агрегации. Это позволяет предполагать, что *Dsup* может

сохранять функцию радиопротектора и стабилизатора ДНК при облучении такими высокими дозами.

В Разделе 5.2. представлено получение материала для извлечения ДНК на основе трековых мембран, модифицированных белком тихоходок Dsup. Было предположено, что белок Dsup может быть использован для придания ДНК-связывающих свойств различным фильтрующим материалам. В качестве основы фильтрующего материала использовались ПЭТ трековые мембраны с размером пор 0.1 – 4.5 мкм. Мембраны модифицировали путем ковалентного связывания белка Dsup с поверхностью; полученный материал ТМ_{мод}-Dsup имел формулу ПЭТ-Al(OH)₃-АПТЭС-ГА-Dsup. Эксперименты с фильтрованием через полученные мембраны показали: (а) белок Dsup стабильно связывается с поверхностью мембран (не десорбируется), (б) иммобилизованный белок Dsup сохраняет способность взаимодействовать с ДНК и (в) модификация белком Dsup придает материалу свойство связывать ДНК из раствора. Адсорбционная емкость модифицированных трековых мембран (ТМ_{мод}-Dsup) для модельной ДНК составила 70 ± 19 мг/м² (масс. соотнош. Dsup:ДНК ~ 2.45) по сравнению ее отсутствием у исходного материала (< 5 мг/м²). Полученный прототип материала (ТМ_{мод}-Dsup) может быть использован в дальнейшем для разработки фильтров для извлечения и хранения ДНК.

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе для изучения радиопротекторного механизма белка Dsup тихоходки *R. varieornatus* проведено взаимодополняющее исследование *in vivo* со сложноорганизованным животным (*D. melanogaster*) и *in vitro* структурных особенностей белка и комплекса Dsup-ДНК в растворе. Это позволило установить протекторные свойства белка Dsup и показать его влияние на организм модельного животного, что также способствует практическим применениям данного механизма. Транскриптомный анализ *D. melanogaster* позволил ввести ограничения на роль в увеличении радиорезистентности активации экспрессии генов антиоксидантного ответа и репарации ДНК. Проведение первого структурного исследования белка Dsup позволило связать протекторный механизм со свойствами неупорядоченного белка и образованием нечеткого/конформационно-гетерогенного комплекса с ДНК. Полученные данные согласуются и более полно объясняют то, что защитное действие белка Dsup вызвано молекулярным экранированием ДНК от АФК, то есть снижением повреждений из-за радикалов за счет ограничения их диффузии, закрытия сайтов на ДНК для их атаки и взаимодействия с самим белком.

Выводы

1. Исследование структурных свойств белка Dsup (МУРР, КД, *in silico* анализ) позволило отнести его к группе специфичных для тихоходок неупорядоченных белков (TDPs): показано, что он содержит 62–66% неупорядоченных регионов, 5–7% α -спиралей и 30–31% β -листов. Белок в растворе является гибкой ($R_{flex} \sim 88$ –89%) вытянутой мономерной молекулой ($R_g \sim 53$ –59 Å, $D_m \sim 200$ Å), для которого проведено моделирование конформационного ансамбля методом ЕОМ. Показано влияние на белок Dsup таких факторов как различная ионная сила, денатурация, десольватация. Установлено, что молекула белка стабильна и одновременно чувствительна к внешним условиям (Янусова последовательность, расширение/уплотнение), предрасположена к жидкостному фазовому переходу ($p_{LLPS}=0.9997$) и посттрансляционным модификациям, особенно, в неупорядоченных регионах.
2. Молекулярное экранирование обеспечивается формированием нечеткого/конформационно-гетерогенного комплекса Dsup-ДНК, то есть в его составе белок сохраняет неупорядоченность и высокую конформационную подвижность.
3. Белок тихоходок Dsup повышает устойчивость к действию пероксида водорода (ПЖ_{50%} ♂:+43-90%; ♀:+23-49%) и облучению γ -излучением с дозами 500 Гр (ПЖ_{50%} ♂:+40%; ♀:+25%) и 1000 Гр (ПЖ_{50%} ♂:+343%; ♀:+16%) модельных Dsup-экспрессирующих животных, *D. melanogaster*, причем показана взаимосвязь протекторного механизма со снижением числа АФК-индуцированных повреждений ДНК (молекулярное экранирование) и уровнем экспрессии гена Dsup в организме.
4. Транскриптомный анализ *D. melanogaster* до и после облучения радиацией показал, что из-за белка Dsup была снижена экспрессия 733 и 432 генов соответственно, таким образом, белок Dsup был неспецифичным репрессором транскрипции и не активировал/подавлял ряд биологических процессов связанных с ДНК (транскрипция, репарация, рекомбинация, репликация), что объяснялось сверхэкспрессией гена Dsup и конкуренцией белка Dsup с другими белками за взаимодействие с ДНК.
5. На *D. melanogaster*, облученных с дозой 1000 Гр, при которой наблюдалось радиопротекторное действие белка Dsup, при помощи транскриптомного анализа показано, что механизм защиты от радиации не связан с активацией экспрессии генов репарации ДНК и антиоксидантной системы.

6. Белок Dsup является стабильным и способен при иммобилизации придавать ДНК-связывающие свойства пористым материалам. Для извлечения и концентрирования ДНК из сложных растворов были разработаны фильтры из ПЭТ трековых мембран (поры 0.3-4.5 мкм), модифицированных белком Dsup, адсорбционная емкость материала составила 70 ± 19 мг/м².

7. Белок Dsup и сходные ДНК-связывающие неупорядоченные белки, осуществляющие молекулярное экранирование, перспективны для разработки протекторов от различных физико-химических стрессов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Основные публикации Зарубина Михаила Павловича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки):

1. **Zarubin M.**, Azorskaya T., Kuldoshina O., Alekseev S., Mitrofanov S., Kravchenko E. The tardigrade Dsup protein enhances radioresistance in *Drosophila melanogaster* and acts as an unspecific repressor of transcription // iScience. — 2023. — Vol. 26. — № 7. — P. 106998. EDN: SKNETT, импакт-фактор: 4.5 (JIF), объем: 1.82 п.л.

2. **Zarubin M.**, Murugova T., Ryzhykau Y., Ivankov O., Uversky V., Kravchenko E. Structural study of the intrinsically disordered tardigrade damage suppressor protein (Dsup) and its complex with DNA // Scientific Reports. — 2024. — Vol. 14. — № 1. — P. 22910. EDN: BNMHPR, импакт-фактор: 4.9 (JIF), объем: 1.70 п.л.

3. **Zarubin M.**, Andreev E., Kravchenko E., Pinaeva U., Nechaev A., Apel P. Developing tardigrade-inspired material: Track membranes functionalized with Dsup protein for cell-free DNA isolation // Biotechnology Progress. — 2024. — Vol. 40. — № 5. — P. e3478. EDN: DLPZHH, импакт-фактор: 2.8 (JIF), объем: 1.17 п.л.

4. Rzyanina A., Kravchenko E., **Zarubin M.**, Mytsin G. Tardigrade Dsup protein protects human cells during proton radiotherapy // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. — 2025. — Vol. 19. — № 4. — Pp. 487-490. EDN: CMRJOU, импакт-фактор: 0.6 (JIF), объем: 0.43 п.л.

5. **Зарубин М.П.**, Низамиева А.Ф., Алексеев С.И., Митрофанов С.В., Горшкова Ю.Е., Кравченко Е.В. Радиопротекторный белок тихоходок Dsup (Damage suppressor) устойчив к воздействию высоких доз ионизирующего излучения // Вестник Московского университета. Серия 3: Физика. Астрономия. — 2024. — № 1. — С. 2410702. EDN: EOOFUF Импакт-фактор 0.516 (РИНЦ).

6. **Zarubin M.**, Kuldoshina O., Kravchenko E. Unique Radioprotective Damage Suppressor Protein (Dsup): Comparative Sequence Analysis // Physics of Particles and Nuclei Letters. — 2022. — Vol. 19. — № 3. — Pp. 309-311. EDN: NPVPJI, импакт-фактор: 0.5 (JIF), объем: 0.25 п.л.

7. Semenov A., Yakimov B., Rubekina A., Gorin D., Drachev V., **Zarubin M.**, Velikanov A., Lademann J., Fadeev V., Priezzhev A., Darvin M., Shirshin E. The oxidation-induced autofluorescence hypothesis: red edge excitation and implications for metabolic imaging // Molecules. — 2020. — Vol. 25. — № 8. — P. 1863. EDN: WULTOE, импакт-фактор: 5.1 (JIF), объем: 1.71 п.л.