

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата
биологических наук Зарубина Михаила Павловича на тему:
«Радиопротекторные свойства и структурные особенности белка Dsup
тихоходки *Ramazzottius varieornatus*»,
по специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность темы исследования

Диссертация М. П. Зарубина посвящена связи структурных особенностей белка Dsup тихоходки *Ramazzottius varieornatus* с его защитным действием при облучении и окислительном стрессе. Работа объединяет исследования очищенного белка, трансгенных линий *Drosophila melanogaster* и клеточной культуры человека и имеет самостоятельную научную ценность.

Актуальность исследования определяется необходимостью выяснения молекулярных механизмов защиты генетического материала от повреждающих воздействий. Особый интерес представляет участие неупорядоченных белков в этих процессах: отсутствие жёсткой пространственной структуры может обеспечивать адаптивность взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, однако связь конформационных свойств с защитной функцией требует экспериментального обоснования. Для Dsup принципиален вопрос о соотношении непосредственной защиты ДНК и опосредованных эффектов, связанных с изменением экспрессии генов, организации хроматина и клеточного ответа на стресс.

Поставленные задачи соответствуют данной проблеме. Практическую актуальность работе придают перспективы разработки радиопротекторных подходов и материалов для извлечения нуклеиновых кислот.

Структура и содержание диссертации

Диссертация изложена на 110 страницах и включает введение, пять глав, заключение, выводы, благодарности, вспомогательные материалы и список литературы из 298 источников. Во введении сформулированы цель, задачи и положения, выносимые на защиту, охарактеризованы новизна, значимость результатов и личный вклад автора. Структура работы последовательно раскрывает поставленные задачи.

Обзор литературы в первой главе обосновывает выбор Dsup и выделяет нерешённые вопросы о механизме его действия. Во второй главе описаны модельные системы, получение рекомбинантного белка и методы анализа его структуры, биологических эффектов и ДНК-связывающих свойств.

В третьей главе представлены результаты биоинформатического анализа, малоуглового рентгеновского рассеяния и спектроскопии кругового дихроизма. Показано, что Dsup в изученных растворах является преимущественно мономерным неупорядоченным белком, конформационные характеристики которого чувствительны к составу среды. Получены оценки размеров молекулы и конформационного ансамбля. По данным кругового дихроизма доля неупорядоченных участков составляет около 62–66%; при связывании с модельной ДНК существенного изменения вторичной структуры не обнаружено. Эти результаты служат основанием для обсуждения конформационно-гетерогенного характера комплекса Dsup–ДНК.

Четвёртая глава посвящена биологическим эффектам Dsup. Получены четыре экспрессирующие линии *D. melanogaster*, наличие транскрипта и белка подтверждено количественной ПЦР и вестерн-блоттингом.

Установлено повышение устойчивости к пероксиду водорода; для выбранной линии № 1 показано увеличение выживаемости после облучения в дозах 500 и 1000 Гр. Методом ДНК-комет обнаружено снижение повреждений ДНК в гемоцитах личинок при воздействии пероксида водорода. В культуре НЕК293-Dsup выявлено повышение клоногенной выживаемости после протонного облучения. Транскриптомный анализ показал преимущественное снижение экспрессии дифференциально экспрессирующихся генов и отсутствие признаков активации экспрессии генов репарации ДНК и антиоксидантной системы, которая могла бы объяснить защитный эффект в исследованных условиях.

В пятой главе исследованы устойчивость Dsup к облучению и возможность его иммобилизации на трековых мембранах. В сравнении с бычьим сывороточным альбумином белок проявил меньшую склонность к радиационно-индуцированной агрегации. Получен прототип мембранного материала, сохраняющего способность связывать модельную плазмидную ДНК; измеренная адсорбционная ёмкость составила 70 ± 19 мг/м². Заключение и семь выводов обобщают основные результаты исследования.

Научная новизна результатов

Научная новизна состоит в экспериментальной характеристике конформационных свойств Dsup и их сопоставлении с защитными эффектами. Описание конформационного ансамбля и обнаруженное сохранение высокой доли неупорядоченных участков при взаимодействии с ДНК расширяют представления о структурной основе защитной функции.

Существенным результатом является демонстрация защитного действия Dsup в многоклеточном организме с одновременной оценкой физиологических показателей и транскриптома. Сочетание стрессоустойчивости с подавлением экспрессии ряда генов и снижением локомоторной активности выявляет ограничения конститутивной экспрессии белка.

Новые данные о транскриптоме до и после облучения ограничивают применимость объяснения радиопротекции через предварительную активацию экспрессии генов антиоксидантного ответа и репарации. Совокупность результатов поддерживает модель молекулярного экранирования ДНК. Самостоятельную прикладную новизну имеет использование иммобилизованного Dsup для придания трековым мембранам ДНК-связывающих свойств.

Обоснованность и достоверность результатов

Достоверность основных экспериментальных результатов обеспечивается сочетанием взаимодополняющих методов и использованием контрольных систем. Структурные характеристики белка оценены независимыми физическими подходами; получение трансгенных линий подтверждено на уровне РНК и белка; результаты анализа выживаемости сопоставлены с оценкой повреждений ДНК. Для экспериментов на *D. melanogaster* описаны биологические повторы, а для отдельных транскриптомных изменений проведена проверка методом количественной ПЦР. Наличие данных в открытой базе GEO под номером GSE181453, указанное в диссертации, создаёт возможность независимого повторного анализа.

Полученные данные обосновывают повышение стрессоустойчивости при экспрессии Dsup и поддерживают предложенную интерпретацию защитного механизма. При этом наблюдение защитного эффекта следует отличать от определения вклада всех возможных молекулярных процессов.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость заключается в развитии представлений о связи неупорядоченности белка, взаимодействия с нуклеиновыми кислотами и защиты ДНК. Результаты создают основу для исследования динамических комплексов белок–ДНК и соотношения защитных и регуляторных эффектов.

Практическая значимость определяется получением модельных систем для изучения радиопротекции и созданием прототипа ДНК-связывающего мембранного материала. Эти результаты могут использоваться в дальнейших исследованиях радиобиологической защиты и биотехнологии нуклеиновых кислот. Эксперименты с НЕК293 обосновывают продолжение клеточных исследований; переход к медицинскому применению предполагает отдельную проверку эффективности, избирательности и безопасности на соответствующих моделях. Для мембранного материала следующим этапом является оценка работы с биологическими жидкостями и извлечения связанной ДНК.

Публикации и личный вклад автора

В диссертации приведён перечень семи статей, отражающих результаты исследований, и сведения о патенте RU2838994C1 на материал фильтров для извлечения ДНК. Основные направления работы представлены в публикациях в журналах iScience, Scientific Reports,

Biotechnology Progress и других изданиях. Приведены сведения об апробации результатов на российских и международных научных конференциях. По тематике перечисленных публикаций прослеживается связь с основными экспериментальными разделами диссертации.

Согласно разделу о личном вкладе, М. П. Зарубин участвовал в исследовании протекторных свойств Dsup *in vivo*, проведении и интерпретации транскриптомного анализа, изучении структурных свойств белка, разработке мембранного материала, подготовке статей и патента. Представленный комплекс исследований свидетельствует о владении автором методами экспериментальной биофизики и анализа биологических данных.

Замечания и вопросы к диссертационной работе

При общей положительной оценке работы считаю необходимым обсудить следующие вопросы и уточнения.

1. В работе показано снижение повреждений ДНК при действии пероксида водорода и повышение выживаемости после облучения, однако эти результаты сами по себе не определяют относительный вклад непосредственного экранирования, перестройки хроматина и репарации. Желательно уточнить, какие наблюдения специфически подтверждают экранирование и какие дополнительные эксперименты позволят разграничить указанные процессы. В частности, представляют интерес измерения первичных повреждений непосредственно после облучения и их последующей динамики.

2. Сохранение вторичной структуры Dsup при связывании с ДНК согласуется с предложенной моделью нечеткого комплекса, но не является

прямым измерением конформационной подвижности связанного белка. Следует точнее разграничить экспериментально установленные свойства и выводы, полученные на основе их интерпретации и биоинформатического предсказания. Какие измерения динамики комплекса могли бы непосредственно подтвердить сохранение высокой подвижности Dsup после связывания с ДНК?

3. По рисункам 10-11: требует разъяснения, насколько выбранный подход к фитированию кривых малоуглового рассеяния с помощью 7 конформаций позволяет реально описать имеющийся конформационный ансамбль. Кажется странным, что доли трех произвольных вытянутых конформаций составляют 50%. На графике Б синяя кривая флуктуирует сильно – с чем это связано? Может ли быть так, что бимодальность является артефактом фитирования небольшим количеством конформаций?

4. По рисунку 4 – необходимо дать пояснения тому, что такое абсолютный средний заряд и интересно было бы сравнить предсказания неструктурированности с предсказанием rLDDT метрики программы АльфаФолд.

5. Транскриптом после облучения исследован через один час при дозе 1000 Гр. Поэтому отсутствие активации соответствующих генов в этой точке не исключает иных временных профилей ответа или изменения активности белков без изменения количества транскриптов. Вывод о роли репарации и антиоксидантной системы целесообразно ограничить условиями проведенного анализа. Кроме того, следует пояснить учёт множественных сравнений при отборе дифференциально экспрессирующихся генов и влияние использования разных трансгенных линий в качестве повторов.

6. Эксперименты с мембранами проведены на растворах модельной плазмидной ДНК длиной 5694 пары оснований при сравнительно высоких концентрациях. Утверждение о перспективности материала для извлечения внеклеточной ДНК из сложных биологических жидкостей требует дополнительной проверки. Следует обсудить влияние длины фрагментов, состава среды и конкурирующей сорбции, а также условия элюции, сохранность выделяемой ДНК и возможность повторного использования материала.

7. Отдельного исправления требует представление количественных данных. В таблице 8 (с. 67) для самцов после облучения дозой 1000 Гр приведены значения средней продолжительности жизни 1,6 и 5,5 суток, которым соответствует увеличение примерно в 3,44 раза, то есть прирост около 244%. Указанные в таблице, тексте и выводах «+343%» смешивают отношение к контролю и относительный прирост. Необходимо согласовать числовые значения и обозначения показателей. Текст также нуждается в редакционной вычитке отдельных опечаток и грамматических неточностей.

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.2. Биофизика (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно

требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Зарубин Михаил Павлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент:

член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук, профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Биологический факультет, Кафедра биоинженерии.

Шайтан Алексей Константинович

Подпись:



Дата подписания: 12.10.2026.

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Биологический факультет, Кафедра биоинженерии.

Контактные данные:

Тел.: +7(495)9395965; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова

Шайтана Алексея Константиновича удостоверяю:

