

В диссертационный совет Д 006.027.01  
на базе ФГБНУ «Всероссийского научно-исследовательского  
института сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу Злобина  
Николая Евгеньевича на тему **«Взаимодействие белков с доменом  
холодового шока растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с  
нуклеиновыми кислотами»**, представленной на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.06.- биотехнология (в т. ч. бионанотехнологии)

**Актуальность темы исследования.** Диссертационная работа Н.Е. Злобина «Взаимодействие белков с доменом холодового шока растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с нуклеиновыми кислотами» посвящена исследованию механизма взаимодействия с нуклеиновыми кислотами белков холодового шока арктического растения голушки солонцовой. Как следует из названия, это растение отлично приспособилось к экстремальным условиям высоких широт, в том числе к холодовому шоку.

Целью работы является установление молекулярных механизмов плавления дуплексов ДНК и РНК различной структуры вышеупомянутыми белками, а также их шаперонной активности, идентификация доменов и отдельных аминокислотных остатков в составе белков холодового шока, необходимых для плавления нуклеиновых кислот и шаперонной активности.

В настоящее время существенная часть населения Земли страдает от нехватки продуктов питания, в том числе и растительного происхождения. С учетом существующей тенденции изменения климата, обеднения почв и потери существенных площадей, пригодных для земледелия, возрастает интерес к изучению механизмов защиты растений от различных стрессов, к которым относится, в том числе и холодовой стресс. Ответ на этот стресс

носит комплексный характер, заключающийся в изменении транскрипции значительного числа генов, а также селективной трансляции отдельных мРНК, белковые продукты которых защищают растительные клетки от нежелательных последствий охлаждения. Для того, чтобы происходил синтез таких белков, необходимо плавление нежелательных вторичных и третичных структур в мРНК, эффективно формирующихся при низких температурах, а также образование и сохранение способствующих, например, эффективной трансляции, структур в мРНК, за которое отвечает шаперонная активность белков холодового шока. Понимание механизмов ответа растений на холодовой стресс, а также использование трансгенных технологий, позволяющих синтезировать в клетках сельскохозяйственных культур белки холодового шока их экстремофильных растений позволит повысить эффективность растениеводства и расширить сельскохозяйственный ареал теплолюбивых культур.

Кроме этого, возможно использование рекомбинантных белков холодового шока, особенно тех из них, которые обладают повышенной способностью к плавлению РНК и ДНК, для проведения реакций с участием нуклеиновых кислот *in vitro*. Нередко стабильные вторичные и третичные структуры, формируемые протяженными РНК или ДНК, препятствуют проведению матричных синтезов. Использование рекомбинантных белков холодового шока может быть альтернативным способом устранения нежелательных конформаций нуклеиновых кислот.

Таким образом, данная диссертационная работа является актуальным на сегодняшний день исследованием.

### **Научная новизна и практическая значимость исследований.**

В настоящее время белки холодового шока растений изучены недостаточно хорошо. Охарактеризованы белки холодового шока модельного растения *Arabidopsis thaliana*, а также нескольких важных сельскохозяйственных культур, таких как пшеница и рис. В случае же экстремофильных растений, в лучшем случае, известна структура и число

генов, кодирующих белки холодового шока. Что касается структурных исследований, то они в настоящий момент ограничены структурами доменов и отдельных белков холодового шока бактерий. Белки растений исследованы гораздо хуже.

В диссертационной работе, выполненной Н.Е. Злобиным, представлены новые результаты, обладающие научной и практической значимостью:

- 1) получены рекомбинантные белки *Eutrema salsugineum* EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3, а также отдельные фрагменты этих белков;
- 2) осуществлен дизайн и синтез флуоресцентно меченых олигонуклеотидов (молекулярных маяков) для исследования взаимодействия с рекомбинантными белками *in vitro*;
- 3) исследовано взаимодействие рекомбинантных белков с молекулярными маяками (связывание, ДНК- и РНК-плавящая активность, РНК-шаперонная активность);
- 4) построены модели взаимодействия белков с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum* с нукleinовыми кислотами;
- 5) предложены возможные механизмы функционирования белков с доменом холодового шока в растительных клетках, а также сделаны выводы относительно потенциальной возможности практического применения этих белков в различных сферах биотехнологии.

С научной точки зрения наибольшую ценность представляют новые данные о способности белков EsCSDP1, EsCSDP2, EsCSDP3 дестабилизировать (плавить) вторичные структуры в молекулах ДНК и РНК с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. При этом, ДНК- и РНК-плавящая активность коррелирует с количеством «цинковых пальцев» в С-концевой части белков. Доказано, что все три белка EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 обладают РНК-шаперонной активностью, самой высокой - EsCSDP2. Установлено, что домены

холодового шока из различных белков растений *Eutrema salsugineum* и *Arabidopsis thaliana* обладают различной биологической активностью при гетерологичной экспрессии в бактериальных клетках, причем это различие обусловлено точечными аминокислотными заменами в N-концевых частях этих доменов.

Наибольшую практическую значимость имеет доказательство высокой ДНК-плавящей и РНК-плавящей активности, а также термостабильности белков с доменом холодового шока EsCSDP1 - EsCSDP3. Это позволяет рассматривать их возможное применение в реакциях амплификации ДНК- или РНК-матриц, склонных к образованию стабильных вторичных структур, с целью повышения специфичности и выхода продуктов матричных реакций.

### **Обоснованность и достоверность полученных результатов.**

Представленная работа является примером хорошо спланированного и обоснованного, логичного научного исследования. Автор подобрал и синтезировал наборы, т.н. маяков, представляющих собой флуоресцирующие дуплексы ДНК и РНК, интенсивность флуоресценции которых снижается при плавлении или расплетании двухцепочечных участков. Используя препараты высокочищенных рекомбинантных белков с доменами холодового шока и цинковыми пальцами EsCSDP1 - EsCSDP3, автор всесторонне изучил механистические особенности взаимодействия этих белков с маяками из нуклеиновых кислот, определил плавящую и шаперонную активность, детерминанты в маяках и белках, обеспечивающие связывание и активность белков. Эти результаты, полученные в бесклеточной системе были существенно дополнены изучением активности исследуемых белков в штамме кишечной палочки, лишенном белков с доменами холодового шока. Кроме того был проведен мутационный анализ с использованием делеционных мутантов, отдельных доменов холодового шока или цинковых пальцев, а также точечных мутантов по N-концевой половине белков EsCSDP1 - EsCSDP3. В результате установлены основные молекулярные

детерминанты, обеспечивающие плавящую и шаперонную активность белков с доменами холодового шока.

Эксперименты выполнены на высоком уровне в достаточном количестве повторностей, результаты статистически достоверны, ясно проиллюстрированы, выводы полностью соответствуют результатам. Результаты работы представлены на российских и международных конференциях, опубликованы в двух рецензируемых зарубежных журналах.

### **Рекомендации по использованию результатов.**

Научные результаты могут служить базой для исследования возможностей использования белков (или доменов) холодового шока для создания растений с повышенной устойчивостью к низким температурам. Кроме того, полученные рекомбинантные белки можно тестировать на предмет применимости в реакциях, требующих наеспецифического плавления нуклеиновых кислот для повышения эффективности матричных синтезов.

### **Краткая характеристика содержания диссертационной работы.**

Диссертационная работа Н.Е. Злобина состоит из введения, обзора литературы, содержащего 5 разделов, методической части, результатов (7 частей), обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Введение информирует читателя об актуальности исследования, его цели, задачах, новизне, научной и практической значимости, основных выносимых на защиту положениях.

Обзор литературы логично сегментирован на несколько разделов, которые знакомят читателя с общей проблемой защиты организмов от низких температур, особенностями защитных механизмов растений, а также проблемой аберрантного фолдинга нуклеиновых кислот при низких температурах. После этого автор обоснованно переходит к молекулярным деталям плавления и сворачивания нуклеиновых кислот под действием специализированных белков с доменами холодового шока. Автор детально анализирует существующую литературу, ссылаясь на 151 источник,

подробно рассматривает данные о белках холодового шока прокариот эукариот, а затем, более детально – растений на примере *Arabidopsis* и *Eutrema*. Обзор содержит необходимую для понимания работы информацию, написан понятным грамотным языком, достаточно минималистично проиллюстрирован.

Материалы и методы написаны достаточно детально, позволяя в случае необходимости, воспроизвести проведенные автором эксперименты.

Результаты содержат огромный объем экспериментальных данных, представленных в виде графиков и диаграмм. Автор сначала характеризует ДНК-плавящую активность белков холодового шока EsCSDP1 - EsCSDP3, постепенно углубляясь в молекулярные детали, определяющие взаимодействие белков с ДНК, а также доменов белков, необходимых или достаточных для плавящей активности. От ДНК автор переходит к РНК, характеризую шаперонную активность с использованием оригинального РНК-маяка, который может существовать в нескольких конформациях. В заключение определена биологическая активность исследуемых белков в гетерологической бактериальной системе с использованием мутантного штамма кишечной палочки, лишенного белков холодового шока.

Обсуждение сравнивает полученные автором результаты с информацией полученной на других белках этого семейства ранее, детально анализирует полученные результаты, делая вполне обоснованное заключение и выводы.

В целом, диссертационная работа Н.Е. Злобина является **законченным научным исследованием, решающим актуальные задачи изучения структуры и функций белков с доменами холодового шока экстремофильных растений.**

Несмотря на достоинства работы, следует выделить ряд замечаний и пожеланий:

- 1) Несмотря на отличное оформление и грамотное изложение, при внимательном прочтении можно обнаружить немало

пунктуационных и грамматических ошибок, повторов слов и отдельных фраз (не заслуживает перечисления);

- 2) Невозможно разобраться с подписью и информацией в Рис. 3.30. Вероятно что-то перепутано;
- 3) Есть вопрос по списку литературы. Отсутствуют ссылки на работы после 2015-2016 года. Есть единственная ссылка на статью 2017 года. Неужели с этого времени не было опубликовано ни одной работы по белкам с доменами холодового шока? Или результаты этих работ могут поставить под сомнение научную новизну проведенного исследования?
- 4) На мой взгляд, литературный обзор, посвященный особенностям структурной организации белков с доменами холодового шока, должен содержать больше иллюстраций, позволяющих читателям сравнить особенности трехмерных структур, понять, как именно эти домены связывают нуклеиновые кислоты. Не сомневаюсь, что эту важную для понимания работы информацию сейчас нетрудно найти в открытых ресурсах сети интернет;
- 5) Биологическую активность белков с доменами холодового шока акторы оценивали в тесте по способности мутантных кишечных палочек рости при пониженных температурах при сверхпродукции резличных белков и отдельных доменов. Результаты теста являются достаточно неожиданными, поскольку только один из трех исследованных белков «спасал» бактерии от холода. Автор почему-то не привели информацию о том, соизмеримы ли количества рекомбинантных белков, синтезируемых в бактериях, между собой, не происходит ли деградация этих белков в используемом штамме и т.д. В некоторой степени, отсутствие столь важной информации ставит под сомнение интерпретацию результатов теста. Хочется получить более подробную информацию или, хотя бы, обсуждение полученных неожиданных результатов;

6) Несомненно, тест в бактериях – это отличный способ оценки биологической активности. Пробовал ли автор оценить активность своих белков в более адекватной модели с использованием клеток растений?

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования Н.Е. Злобина.

**Общее заключение.** Основные результаты диссертации опубликованы в 6 научных работах, в том числе 3 научных статьях в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК.

Результаты диссертации многократно апробированы на конференциях и научных семинарах, автореферат и опубликованные работы достаточно полно отражают значимость проблемы и результаты исследований.

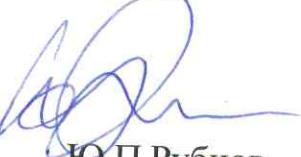
Уровень решаемых задач соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.06.- Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии).

Диссертационная работа «Взаимодействие белков с доменом холодового шока растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с нуклеиновыми кислотами» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Злобин Николай Евгеньевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент,

к.х.н., с.н.с. Лаборатории молекулярной онкологии

ФГБУН Института биоорганической химии  
им.ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

  
Ю.П.Рубцов

Ученый секретарь

*28 августа 2019*

ФГБУН Института биоорганической химии  
им.ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

д. ф.-м. н., руководитель Лаборатории молекулярной биофизики

В.А.Олейников

