

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»
143025, Московская область, Одинцовский район, Сколково, ул. Новая, д. 100
ОГРН 1115000005922 ИНН/КПП 5032998454/503201001
Тел.: +7 (495) 280-14-81

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Злобина Н. Е. «Взаимодействие белков с доменом холодового шока растения-экстремофита *Eutrema salsaugineum* с нуклеиновыми кислотами», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)."

Изучение молекулярных механизмов адаптации растений к стрессу, в частности, к пониженной температуре, является исключительно актуальной задачей, как для сельского хозяйства, так и с точки зрения фундаментальной науки. Ряд исследований указывает на вовлеченность эволюционно консервативных белков, содержащих домены холодового шока (CSD), в процессы холодовой адаптации у бактерий, животных, и растений, однако механизмы, с помощью которых CSD белки позволяют организмам адаптироваться к стрессу, не вполне понятны. Диссертационная работа Н. Е. Злобина посвящена изучению *in vitro* взаимодействий CSD белков из растения-экстремофита с модельными ДНК и РНК субстратами, изучению влияния отдельных доменов (помимо, собственно, домена холодового шока) этих белков на связывание с нуклеиновыми кислотами, а также анализу их способности плавить и ремоделировать вторичные структуры нуклеиновых кислот *in vitro* и вызывать антитерминацию транскрипции на фактор-независимых терминаторах на бактериальной модели (*Escherichia coli*).

Диссертация Н. Е. Злобина написана по стандартной схеме. Обзор литературы дает достаточно полное представление об адаптации клеток к холодовому шоку и о том, что известно о роли белков CSD в этом процессе. Так как, к сожалению, четкого механистического понимания роли CSD белков в адаптации нет, то обзор, скорее, суммирует имеющиеся, часто разрозненные данные из различных систем и не свободен от повторений. В обзоре довольно много неудачных выражений, возможно, связанных с прямым переводом с английского. В качестве примеров можно упомянуть странные термины, например: «плоскость белковой молекулы» (стр. 23,

что, очевидно не применимо для CSD белков, которые имеют баррельную структуру), «гидрофобный кластер ... положительно заряженный.» (там же). На протяжении всего обзора и самой диссертации генетическая номенклатура неоднократно используется неправильно: («usrA» и «groS²⁷ обозначают белки, а не гены, стр. 27). Как следствие, встречаются такие казусы, как «экспрессия белка..., как на уровне транскрипта, так и на уровне белка» (стр. 34). Наконец, автор использует проценты для измерения «уровня гомологии» (стр. 29 и далее по всему тексту работы), что очевидно неверно, так как гомология — это общность происхождения. Также вызывают сомнения такие фразы, как «растения, в отличие от животных, не способны поддерживать постоянную температуру тела» - речь идет, очевидно, о теплокровных, но в тексте это не указано. С одной стороны, эти огрехи не влияют на общий уровень обзора, но автору следует быть более внимательным к своему тексту.

Что касается собственно экспериментальной работы, то она выполнена на очень хорошем уровне, правда, в основном, с использованием только одного метода флюоресцентных маяков. Тем не менее, он адекватен для решения большинства поставленных задач. В некоторых случаях используются очень высокие соотношения белок:маяк, вплоть до уровня 80:1 (стр. 74). В этом смысле приведение информации о количествах CSD белков в клетках растений и их возможных соотношений с РНК в различных физиологических условиях было бы крайне полезным для того, чтобы поместить полученные автором результаты в биологически релевантный контекст. Однако, такой информации в диссертации не приведено. В этой связи возникает закономерный вопрос о том, насколько используемые в работе соотношения CSD белков и субстратов-маяков отражают ситуацию в клетке. Связанным является вопрос об уровне свернутости различных делеционных вариантов CSD белков, так как для оценки их удельной активности в тестах на связывание и плавление нуклеиновых кислот, необходимо быть уверенным в том, что все они свернуты одинаково, в противном случае возможно сделать неверные выводы.

Результаты диссертационной работы представляют определенный фундаментальный интерес, так как обнаруженные закономерности взаимодействия белков с доменом холодового шока с нуклеиновыми кислотами *in vitro* могут быть использованы при анализе функций этих белков в клетке. Кроме того, поскольку в живых организмах и в частности в растениях имеется ряд белков, по своей структуре схожих с белками с доменом холодового шока, полученные в работе данные могут быть интересны и в этом контексте. К безусловному успеху работы следует отнести использование маяков, отожженных в дистиллированной воде для изучения шаперонной активности CSD белков по изменению флюоресцентного сигнала с

такими пробами в присутствии CSD белков в буферах с увеличенной ионной силой. Насколько мне известно, это оригинальное решение автора, которое может быть очень полезно для ученых, работающих в области белок-нуклеиновых взаимодействий. Практическое применение полученные результаты могут найти при разработке различных методик для молекулярной биологии, включающих работу с нуклеиновыми кислотами, например амплификацию со сложных ДНК и РНК-матриц, формирующих устойчивые вторичные структуры. Результаты диссертационной работы могут быть использованы в различных научно-исследовательских учреждениях биологического профиля, в которых исследуются различные аспекты взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, а также в учебных заведениях для наглядной демонстрации ДНК- и РНК-плавающей и РНК-шаперонной активности белков.

Диссертационная работа Злобина Николая Евгеньевича на тему «Взаимодействие белков с доменом холодового шока растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с нуклеиновыми кислотами» является квалификационной научно-исследовательской работой. Методы, использованные в диссертации, в целом адекватны поставленной цели и задачам исследования. Полученные экспериментальные данные обладают научной новизной и имеют как фундаментальную, так и практическую ценность. Основные результаты и выводы диссертационной работы опубликованы в 3 рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, и апробированы на 3 российских научных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам, выводам и положениям, выносимым на защиту.

Выводы из работы четкие и полностью соответствуют представленным результатам. В целом, 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 завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор, Злобин Николай Евгеньевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии).

Северинов Константин Викторович

д.б.н., профессор

директор Центра наук о жизни

Сколковского института науки и технологий

Адрес: 121205, Россия, г. Москва, ул. Нобеля, д.

Тел: +7(495)280-14-81

e-mail: admissions@skoltech.ru

