

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук
(ИБ РАН)

ул. Институтская, д. 4, г. Пущино, Московская обл., 142290
Тел./факс +7(495)514-02-18; факс +7(4967)318-435 E-mail: protres@vega.protres.ru
ОКПО 02699748, ОГРН 1025007773262, ИНН/КПП 5039001220/503901001

25. апр. 2019, 95/01-60

На № _____ от _____

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт белка Российской академии наук
(ИБ РАН)



доктор биологических наук

В.А. Колб

«25» апреля 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы диссертационной работы

Повышение устойчивости растительных организмов к абиотическим стрессам уже в течение нескольких десятилетий является предметом пристального внимания ученых не только в прикладных исследованиях, но и с точки зрения фундаментальной науки. Среди всего многообразия абиотических стрессовых факторов в средней полосе особое значение имеет воздействие на растение пониженных температур. В значительной степени это связано с тем, что большинство культурных растений, возделываемых в областях средней полосы, были в свое время интродуцированы из регионов с более теплым климатом, и системы холодоустойчивости у них могут не быть развиты в достаточной степени. Перспективным средством повышения устойчивости сельскохозяйственных растений к неблагоприятным факторам окружающей среды является повышение экспрессии генов «холодоустойчивости». К настоящему моменту установлено, что снижение температуры окружающей среды вызывает изменение экспрессии сотен генов, однако роль большинства из них, а также механизм функционирования соответствующих белков в стрессовом ответе, не известны. Диссертационная работа Злобина Николая Евгеньевича посвящена одной из таких групп генов, кодирующих белки с доменом холодового шока. Они были обнаружены в различных организмах, в том числе и у высших растений. Известные функции этих белков определяются взаимодействием с нуклеиновыми кислотами. Важная роль белков с доменом холодового шока в адаптации растений к низкотемпературному стрессу подтверждена рядом работ. Тем не менее, некоторые значимые аспекты функционирования этих белков в растительной клетке остаются практически неизученными. Наиболее критичным из них является молекулярный механизм, за счет которого белки с доменом холодового шока оказывают свое влияние на адаптацию растения к пониженным температурам. Основной целью диссертанта было определение молекулярного механизма взаимодействия белков с доменом холодового шока из растения-экстремофита *Eutrema salsugineum* с нуклеиновыми кислотами, что позволило бы сделать выводы относительно потенциальной возможности практического применения этих белков в различных сферах биотехнологии.

Таким образом, диссертационная работа представляет собой актуальное исследование, результаты которого будут востребованы в биотехнологической отрасли.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, изложена на 124 страницах по традиционной схеме. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов

исследования, представление результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 151 источник, из которых 145 — на иностранном языке.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ доступных литературных источников по тематике изучаемой проблемы (глава 1). В обзоре литературы описывается действие пониженных температур на растительный организм, поднимается проблема правильного сворачивания цепи РНК в условиях пониженной температуры и функционирования РНК-шаперонов. Наконец, подробно излагается информация о белках холодового шока про- и эукариот как об основном объекте исследования диссертации.

В целом обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования (глава 2). В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Дано описание генно-инженерных методов, использованных для наработки рекомбинантных белков. Представлен спектр физико-химических методов по определению ДНК/РНК-плавящей и отжигающей активности белков, а также по определению констант их связывания с нуклеиновыми кислотами. Кроме того, приведено описание функционального анализа белков с доменом холодового шока *Eutrema salsugineum* в тестах по комплементации роста холодоустойчивого штамма VX04 *E. coli*. Методы описаны достаточно подробно, ясно, что без труда позволит их воспроизвести в случае необходимости.

Глава 3 посвящена изложению результатов исследования. Она включает 8 разделов, каждый из которых посвящен отдельной задаче исследования. Экспериментальная часть хорошо спланирована, что позволило решить поставленные в ходе работы задачи. С применением различных модельных систем *in vitro* и *in vivo* было исследовано взаимодействие белков с доменом холодового шока EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 из растения *E. salsugineum* с нуклеиновыми кислотами. Каждый из этих белков содержит в своем составе несколько центров взаимодействия с нуклеиновыми кислотами — домен холодового шока в N-концевой части и несколько мотивов «цинковых пальцев»

(6, 2 и 7, соответственно) в С-концевой части. Была показана способность этих белков плавить вторичные структуры в молекулах ДНК и РНК с различной последовательностью нуклеотидов и пространственной структурой. Для плавления вторичной структуры белкам с доменом холодового шока требовался одноцепочечный участок, находящийся в 3'-положении от этой структуры. Оптимальная длина этого участка составляет не менее 8 нуклеотидов. При этом, ДНК- и РНК-плавящая активность зависела от количества «цинковых пальцев» в С-концевой части белков. Была разработана новая система для измерения РНК-шаперонной активности белков *in vitro*, с помощью которой было доказано, что все три белка EsCSDP1, EsCSDP2 и EsCSDP3 обладают РНК-шаперонной активностью, но наибольшей – EsCSDP2. Кроме того, было установлено, что домены холодового шока из различных белков растений *E. salsugineum* и *A. thaliana* обладают различной биологической активностью при гетерологичной экспрессии в бактериальных клетках, причем это различие обуславливалось единичными аминокислотными заменами, располагающимися главным образом ближе к N-концу этих доменов.

В разделе «Обсуждение» Николай Евгеньевич Злобин обобщил полученные экспериментальные данные, обосновал основные положения работы, отметил возможность практического использования полученных результатов.

Раздел «Выводы» содержит 5 утверждений, которые не вызывают существенных нареканий.

Оценка оформления диссертационной работы

Диссертационная работа Н.Е.Злобина, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные и литературные данные представлены на 37 рисунках и в 4 таблицах. Большая часть их относится к главе, посвященной результатам исследования, в главе «Обзор литературы» рисунков явно не хватает.

Научная и практическая значимость результатов

Полученные Николаем Евгеньевичем Злобиным результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярно-биологических механизмах устойчивости растений к пониженным температурам. Поскольку для белков с доменом холодового шока EsCSDP1 и EsCSDP3 была показана высокая ДНК- и РНК-плавящая активность, а также термостабильность, перспективным представляется применение этих белков в различных молекулярно-биологических реакциях для амплификации с ДНК- или РНК-матриц, склонных к образованию вторичных структур, с целью повышения

специфичности и выхода продукта этих реакций. Научные положения исследований рекомендуется использовать в качестве учебного материала по дисциплинам: биотехнология, генетическая инженерия, молекулярная биология. Кроме того, обзор литературы диссертационной работы Н.Е.Злобина представляет несомненный интерес для широкого круга читателей и после некоторой доработки заслуживает быть опубликованным.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований репрезентативной выборки образцов, применение классических генно-инженерных, биохимических и современных молекулярно-генетических и физико-химических методов подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Н.Е. Злобина, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биотехнологического и образовательного профиля, занимающихся изучением РНК-белковых взаимодействий, а также при чтении спецкурсов по генетике, биотехнологии и молекулярной биологии.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Н.Е. Злобина опубликованы в 6 работах (в том числе 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК России). Результаты исследований апробированы на Российских и Международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При критическом рассмотрении диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. Мало рисунков в обзоре литературе, что затрудняет восприятие текста. По крайней мере, не хватает рисунка, на котором сравнивалась бы доменная организация белков с доменом холодового шока из бактерий, растений и животных.
2. Подпись к рисунку 3.30 не соответствует этому рисунку.

3. В работе очень много сокращений, но нет общего списка использованных сокращений с их расшифровкой.
4. Требуется более четкое разъяснение, что имеется в виду под «РНК-шаперонной активностью» белка. Это совокупность РНК-паяющей и РНК-отжигающей активности или что-то другое?
5. В опытах по комплементации роста бактерий *E. coli* холодочувствительного штамма ВХ04 не хватает контрольных данных об уровне экспрессии различных доменов холодого шока. Не исключено, что они могут экспрессироваться по-разному, чем можно объяснить разное их влияние на рост культуры *E. coli*.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей очень хорошее впечатление.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора — Николая Евгеньевича Злобина. Очевидно, что автором проделана большая работа. Все части исследования осуществлены и изложены в последовательности, отражающей логику реализации конечной цели всей работы. Диссертантом использованы современные и классические методы молекулярной биологии, биохимии и микробиологии. Н.Е. Злобин хорошо знаком с литературой по теме диссертации. Список использованной литературы составляет 151 работу, большинство из которых на английском языке. Следует отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокий уровень исполнения, что положительно характеризует самого исследователя. Все вышеизложенное свидетельствует о соответствии соискателя Н.Е. Злобина ученой степени, на которую он претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Злобина Николая Евгеньевича на тему: «Взаимодействие белков с доменом холодого шока растения-экстремофита *Extrema Salsugineum* с нуклеиновыми кислотами» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области биотехнологии. По актуальности

темы, новизне результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Считаем, что автор Злобин Николай Евгеньевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук (ФГБУН ИБ РАН) от «23» апреля 2019 г.

Руководитель группы

регуляции биосинтеза белка ИБ РАН,

доктор биологических наук,

профессор, академик РАН

Овчинников Лев Павлович

старший научный сотрудник группы

регуляции биосинтеза белка ИБ РАН,

кандидат биологических наук

Лябин Дмитрий Николаевич



Подпись *Овчинников Л. П.*
Зав. кафедрой *Лябин Д. Н.*
Подпись *Лябин Д. Н.*
25.04.2019.