

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук, профессора Щербакова Анатолия Анисимовича на диссертацию Гусева Юрия Сергеевича «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика»

Диссертация Ю.С. Гусева посвящена установлению закономерностей функционирования бактериального белка VirE2 в процессе переноса Т-ДНК через мембраны в составе транспортируемого комплекса с использованием расчетных и экспериментальных методов исследования.

К началу работ автора диссертации был описан феномен переноса коротких олигонуклеотидов через искусственные мембраны (Dumas et al., 2001, Чумаков с соавт., 2010), но не был выявлен факт, что белок VirE2 способствует процессу транспорта ДНК в животные клетки. Был уже описан феномен переноса Т-ДНК агробактерий через мембраны животных клеток при участии белка VirE2 (Volokhina et al., 2012), однако механизм переноса оцДНК в клетку, опосредованный белком VirE2, мало исследован. Актуальность исследования структуры и функций белка VirE2 *Agrobacterium tumefaciens* связана с изучением возможных механизмов участия белка VirE2 при доставке оцДНК через мембрану в эукариотическую клетку как через поровый комплекс, формируемый этим белком, так и с помощью эндоцитоза, опосредуемого белком VirE2.

В работе проведено сравнительное изучение переноса олигонуклеотидов различной длины в культурах животных клеток HeLa и СПЭВ. Целью работы Гусева Ю.С. явилось изучение возможности белка VirE2 и его комплексов участвовать в процессе транспорта оцДНК через мембраны эукариотической клетки.

Представленная диссертация написана в традиционном стиле и состоит из введения, главы с обзором литературы, главы с указанием использованных материалов и методов исследования, главы с описанием экспериментальных

данных и их обсуждением, выводов, списка цитированной литературы из 142 источников, из которых 130 - зарубежные, приложения. Диссертация содержит 44 рисунка и 6 таблиц.

В «Обзоре литературы» рассмотрен механизм переноса ДНК через мембраны растительной клетки и роль агробактериального белка VirE2 в этом процессе. Дана краткая характеристика переноса ДНК в эукариотические, преимущественно растительные клетки, в том числе способности *Agrobacterium tumefaciens* инфицировать клетки животных. Рассмотрены основные виды эндоцитоза ДНК и различные виды специфических ингибиторов для блокирования всех типов эндоцитоза. Описано применение метода молекулярной динамики и метода нормальных мод для мембранных белков.

Сведения об использованных материалах и методах изложены в главе 2. В ней перечислены использованные в работе оборудование, среды, реактивы, буферные растворы, микроорганизмы и культуры клеток. Приведены методики выделения и очистки белка VirE2, выращивания культур животных клеток. Изложена методология измерения флуоресценции эукариотических клеток после инкубации с белком VirE2 и мечеными олигонуклеотидами. Описана методика статистической обработки множественных данных. Также описаны использованные в работе компьютерные программы и базы данных.

В первых разделах главы «Результаты и обсуждения» представлены результаты моделирования надмолекулярных комплексов на основе белка VirE2 и оцДНК-VirE2 методами молекулярной динамики и нормальных мод, а также изучение переноса олигонуклеотидов в эукариотические клетки в присутствии рекомбинантного белка VirE2. С помощью методов докинга получены стационарные модели комплексов из двух, четырех и шести комплексов белков VirE2, а также модель взаимодействия двух белков VirE2 и оцДНК. Автором выдвинуто предположение, что в комплексе из двух и четырех белков VirE2 возможно образование канала, у которого функционирование поры схоже с воротным механизмом потенциал-

зависимых ионных каналов при изменении электрического поля (натриевые, калиевые каналы).

С помощью метода молекулярной динамики в разделе 3.8 установлено, что модель белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при времени моделирования до 500 пс. Также установлено, что структура белка VirE1 обладает наибольшей подвижностью.

С помощью метода нормальных мод в разделе 3.9 оценены колебательные движения модели из белков VirE2-VirE1, комплекса из двух и четырех белков VirE2.

Полученные автором результаты позволяют получить представление о возможном механизме функционирования порового комплекса из белков VirE2.

Проведенные в разделе 3.11 автором исследования по переносу FAM-меченной оцДНК в клетки HeLa и СПЭВ показали, что рекомбинантный белок VirE2 способствует накоплению коротких (24 н.о.) синтетических олигонуклеотидов в клетках HeLa, но не в клетках СПЭВ.

Автор делает в диссертации заключение о том, что белок VirE2 играет одну из ключевых ролей в процессе переноса оцДНК в клетку-хозяина. Возможно, белок VirE2 участвует в процессе переноса Т-ДНК через мембраны, формируя канал в липидной мембране.

Таким образом, анализ диссертационной работы в целом позволяет подтвердить новизну научных положений, отраженных в диссертации.

Практическая значимость работы представляет несомненный интерес с точки зрения анализа доставки генов в животные клетки и технологий генотерапии.

Диссертационная работа Ю.С. Гусева представляет собой законченный самостоятельный научно-исследовательский труд, выполненный автором в соавторстве с Мазилковым В.И., Волохиной И.В. и Чумаковым М.И., непосредственно в лаборатории биоинженерии Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

Выводы адекватны и суммируют полученные результаты исследований. Степень обоснованности выводов, а также их достоверность не вызывают сомнений, поскольку результаты получены на основе ряда независимых экспериментов, статистически обчислены и сопоставлены с данными литературы. Результаты исследований по теме диссертации опубликованы в 12 печатных изданиях, в том числе в 4-х статьях в рецензируемых изданиях.

Автореферат и научные публикации отражают основное содержание работы. Автореферат оформлен в соответствии с необходимыми требованиями и хорошо иллюстрирован.

Полученные данные соответствуют высокому научному уровню, однако, имеются следующие пожелания и замечания.

1. Автором проведена молекулярная динамика комплекса белков VirE2-VirE1. Установлено, что структура белка VirE1 обладает наибольшей подвижностью. Однако, автор уделяет мало внимания интерпретации данного результата.

2. Также автором показано, что клетки HeLa и СПЭВ по-разному накапливают нуклеотиды после блокировки дыхания. Хотелось бы услышать объяснение данного факта.

Представленные замечания не меняют положительного отношения к диссертационной работе Ю.С. Гусева. Полученные автором результаты и сделанные выводы имеют как фундаментальный, так и прикладной интерес.

Содержание диссертации соответствует п. 3 и п. 7 паспорта специальности 03.01.02 – биофизика.

В заключение отмечу, что диссертационная работа Гусева Юрия Сергеевича «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки» является завершенной научно-квалифицированной работой и по актуальности, научной новизне, практической значимости соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»,


утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
аграрный университет им. Н.И. Вавилова»,
кафедра микробиологии, биотехнологии и химии,
профессор кафедры
410012 г. Саратов, Театральная пл., 1,
тел. (8452) 69-24-41,
e-mail: Scherbakov.2014@yandex.ru



А.А. Щербаков

Подпись д.б.н., проф. А.А. Щербакова заверяю.
Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
аграрный университет имени Н.И. Вавилова»



А.П. Муравлев

Саратов, «16» июня 2014г.