

ОТЗЫВ

официального оппонента Федорина Дмитрия Николаевича 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

Работа Ю.С. Гусева посвящена исследованию роли белка VirE2 в процессе переноса агробактериальной Т-ДНК через искусственные и клеточные мембраны. Экономическое значение генетической инженерии очень велико, поскольку в настоящее время получением и испытанием генетически модифицированных растений занимаются сотни коммерческих фирм во всем мире, во всем мире выращивается растений на более 150 млн. га, полученных с помощью технологии переноса функциональных генов в составе агробактериальной Т-ДНК. При этом механизм переноса до конца не ясен, в частности, изучение переноса Т-ДНК через мембраны клетки-реципиента, установление роли белка VirE2 в этом процессе, безусловно, является одной из актуальных задач, которая решается, в том числе и методами современной биофизики и биоинформатики.

Автором, с использованием методов флуоресценции, показано, что белок VirE2 каким-то образом способствует накоплению олигонуклеотидов в клетках линии HeLa. Также установлено, что накопление олигонуклеотидов не полностью зависит от процессов, которые блокируются при обработке ингибиторами дыхания в отсутствие VirE2, но VirE2-зависимый процесс накопления олигонуклеотидов идет с участием клеточных структур HeLa. В представленной работе впервые изучены комплексы из белков VirE2 с помощью метода нормальных мод. В диссертации впервые проведено моделирование молекулярной динамики белка VirE2 в комплексе с белком-шапероном VirE1. Также впервые показано влияние белка VirE2 на перенос олигонуклеотидов в животные клетки HeLa и СПЭВ. Новизна вышеуказанных положений подтверждена экспериментально различными методами.

Практическая значимость работы заключается в разработке безвирусных технологий доставки генов в животные клетки и технологий генотерапии.

Диссертация Ю.С. Гусева изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из перечня использованных сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, выводов, списка литературы (142 источника), приложения. Работа иллюстрирована 44 рисунками, содержит 6 таблиц.

Обзор литературы представляет собой детальное описание механизма агробактериальной трансформации и роли белка VirE2 в этом процессе. При этом особое внимание уделено мембранному транспорту ДНК через различные поры в растительные и животные клетки, а также механизму эндоцитоза. В обзоре литературы рассмотрены методы молекулярной динамики и нормальных мод, применение этих методов для анализа каналов и пор у различных белков. В целом, обзор написан хорошо, логично и дает

хорошее представление о проблемах, существующих в этой области науки. На основе анализа литературы делается заключение, какие нерешенные на сегодняшний день проблемы имеются в этой области. В связи с этим, сформулирована цель работы, которая заключалась в изучении возможности белка VirE2 и его комплексов участвовать в процессе транспорта оцДНК через мембраны эукариотической клетки.

Для экспериментального изучения белка VirE2, образуемых им комплексов и процесса VirE2-опосредованного переноса оцДНК через мембраны в работе использованы современные методы исследования, применяемые в молекулярной биологии, биофизике.

Результаты собственных исследований автор излагает в разделе «Результаты и обсуждение». Моделированию комплексов из белков VirE2, комплекса оцДНК-VirE2, анализу построенных комплексов с помощью методов молекулярной динамики, нормальных мод посвящена большая часть работы. Автором показано, что модель белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при 500 пс, а структура белка VirE1 в комплексе VirE2-VirE1 обладает наибольшей подвижностью. Методом нормальных мод показан возможный механизм открывания-закрывания поры комплекса из двух белков VirE2.

Одной из экспериментальных задач, был анализ участия белка VirE2 при доставке оцДНК через мембрану в эукариотическую клетку с помощью эндоцитоза, опосредуемого белком VirE2. Показано, что накопление олигонуклеотидов не полностью зависит от процессов, которые блокируются при обработке ингибиторами дыхания в отсутствие VirE2, но VirE2-зависимый процесс накопления олигонуклеотидов идет с участием клеточных структур HeLa, которые чувствительны к обработке блокаторами дыхания.

В случае клеток СПЭВ различные виды эндоцитоза не являются существенными при накоплении флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов.

Также автором при проведении электронной просвечивающей микроскопии комплекса оцДНК-VirE2 установлено, что длина формируемого ДНК-белкового комплекса значительно уменьшается по сравнению с оцДНК без белка VirE2.

В целом, соискателем была проведена большая работа, результаты которой интересны как для фундаментальных аспектов биофизики, так и для прикладных аспектов. Установленный в работе факт, что белок VirE2 способствует попаданию олигонуклеотидов в животную клетку, может дать основу для разработки безвирусных технологии доставки генов в животную клетку для технологий генотерапии.

Однако, работа не лишена некоторых недостатков. Наиболее существенными из них являются следующие:

1. В ходе работы было установлено, что транспорт ДНК через мембрану клетки зависит от скорости функционирования окислительных процессов клетки. В связи с этим, интересным представляется исследование активности основных ферментов дыхательного

метаболизма клетки в норме и при проведении их трансформации оцДНК с целью выяснения точного механизма энергообеспечения транспорта олигонуклеотидов в клетки-мишени.

2. Важным в работе является исследование молекулярных механизмов транспорта ДНК в клетки при участии специализированного белка VirE2. Было установлено, что трансмембранному транспорту оцДНК с участием данного белка способствуют конформационные перестройки в структуре нуклеиновой кислоты, обеспечивающие более легкий перенос. Однако, интересным представляется исследование механизма взаимодействия белка VirE2 и оцДНК, приводящего к изменениям конформации комплекса и способствующего облегченному транспорту.

В целом диссертационная работа Ю.С. Гусева выполнена на высоком уровне. Выводы соответствуют результатам, представленным в диссертации. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты диссертационной работы опубликованы в 12 публикациях, в том числе в 4 рецензируемых журналах из списка ВАК. Личный вклад Юрия Сергеевича в исследование научной проблемы в диссертации сформулирован, все основные соисполнители указаны.

Таким образом, диссертационная работа Гусева Юрия Сергеевича «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки» полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемых к кандидатским диссертациям. Автор диссертации Гусев Юрий Сергеевич заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

«17» июня 2014 года

к.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии

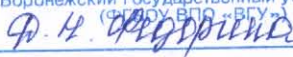
и физиологии клетки биолого-почвенного факультета


Воронежского государственного университета

 Федорин Дмитрий Николаевич

394006 г. Воронеж, Университетская пл, д. 1. Воронежский государственный университет (ФГБОУ ВПО ВГУ). Тел: (473) 2208877; 89102884510. Факс: (473) 2208755. E-mail: rybolov@mail.ru. Internet:www.vsu.ru

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВПО «ВГУ»)

Подпись: 

заверяю:  17.06.2014

подпись, расшифровка подписи

