

**ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИЦиГ СО РАН)

Просп. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
http://www.bionet.nsc.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

16.06.2014 № 15345-43-2171

На № _____ от _____



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу

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

Актуальность темы. Изучение механизмов переноса агробактериальной Т-ДНК через искусственные и клеточные мембраны является крайне интересной и важной проблемой, как с фундаментальной, так и с практической точек зрения. Особый интерес представляет изучение роли белка VirE2 в переносе одноцепочечной ДНК через искусственные и природные мембраны, поскольку Т-ДНК переносится в комплексе с VirE2 VirD2 белками и при этом VirE2 белок проявляет до шести различных функций. Исследования в этом направлении, безусловно, важны, поскольку их результаты можно использовать в биотехнологии при создании растений с новыми свойствами и, возможно, для разработки новой безвирусной технологии доставки целевых генов в животную клетку (генотерапии). В частности, значимость и актуальность изучения VirE2 - VirD2 белков в качестве базовых элементов модели транс-организменного переноса чужеродной ДНК хорошо видна по последним публикациям в ведущих журналах (Bharat et al., Structure 2013; Lacroix and Citovsky, Sci. Rep. 2013; Zaltsman et al., PNAS 2013).

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

Научная новизна. Научная новизна полученных результатов заключается в построении комплексов из белка VirE2 и анализе возможного воротного механизма каналов, в полученных комплексах. Автором с помощью метода нормальных мод установлено, что в некоторых модах комплекса из двух белков VirE2 наблюдается возможный воротный механизм каналов. Впервые проведен анализ белка VirE2 в комплексе с белком-шапероном VirE1 методами молекулярной динамики. Установлено, что рекомбинантный белок VirE2 способствует накоплению коротких синтетических олигонуклеотидов в клетках линии HeLa, но не в клетках СПЭВ.

Научно-практическая значимость. Научно-практическая значимость определяется тем, что соискателем показано, что белок VirE2 способствует попаданию олигонуклеотидов в животные клетки (HeLa, СПЭВ), что, после соответствующей проверки на разных объектах, может дать основу для разработки безвирусных технологий доставки генов в животную клетку и технологий генотерапии.

Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, включая 6 таблиц и 44 рисунка, заключение, выводы, список литературы из 142 источников, приложение.

В обзоре литературы автор подробно рассматривает основы механизма агробактериальной трансформации растений. При этом особое внимание уделено переносу ДНК через мембраны растительной клетки и роли белка VirE2 в этом процессе. Отдельно рассмотрен перенос оцДНК в животную клетку и способность *Agrobacterium tumefaciens* инфицировать клетки животных. Также освещена проблема возможного проникновения Т-ДНК в растительную клетку посредством эндоцитоза. Рассмотрены основные виды эндоцитоза ДНК и различные виды специфических ингибиторов для блокирования всех типов эндоцитоза. В обзоре рассмотрена трехмерная структура VirE2 белка по данным рентгеноструктурного анализа. Дана литература по применению метода молекулярной динамики и метода нормальных мод для исследований структуры и динамики биологических макромолекул. В заключительной части 1-й главы сформулированы нерешенные проблемы и задачи исследования. Обзор литературы содержит современные данные и хорошо структурирован. Рисунки и схемы, приведенные в обзоре, делают излагаемый материал более наглядным.

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием комплексного подхода на основе методов молекулярной биологии, генетики и биоинформатики. Автор продемонстрировал владение биохимическими методами (выделения и очистки белка VirE2), микроскопии (трансмиссионной электронной) и компьютерного моделирования белковых структур. Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам, подробно

описаны. Полученные соискателем результаты свидетельствуют о теоретической возможности формирования белком VirE2 пор, которые смоделированы *in silico* внутри комплекса из двух и четырёх белков VirE2. Выводы, приведенные в диссертационной работе, обоснованы и логично вытекают из представленных данных.

Достоверность выводов не вызывает сомнений, поскольку экспериментальные данные получены с использованием современной аппаратуры и обработаны статистически, а данные компьютерного моделирования подвергнуты экспериментальной проверке.

Список публикаций по теме диссертации включает 12 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Замечания по диссертации:

1. Хотелось бы понять, можно ли относиться к VirE2-VirE1 как к мембранному белку, у него много полярных аминокислот на поверхности. Логичнее было бы ожидать, что комплекс из VirE2-VirE1 белков будет мембранным, образуя канал таким образом, что бы гидрофобные аминокислоты были обращены внутрь мембраны. В связи с этим хотелось бы узнать мнение диссертанта по поводу предсказанных белковых комплексов. Например, возможно ли, что они образуют только водорастворимую часть поры (но тогда непонятно, откуда берется мембранная часть канала в модельных мембранах)? Одна из задач работы как раз касалась анализа комплексов на предмет их встройки в мембрану.
2. Хотелось бы узнать точку зрения автора на предмет достаточности выбранного времени (500 пс) для оценки подвижности белка. За это время можно получить стабильную структуру, но на маленьком временном масштабе движения могут быть вызваны энергетически невыгодной укладкой начальной структуры белка, поэтому временной интервал от 1000 пс до 100000 пс представляется более корректным.
3. Не указан протокол моделирования: проводились ли такие стадии как минимизация, нагрев, установление плотности, установление равновесия. Если нет, то траектория 500 пс представляется недостаточно существенной для анализа (при этом конечную структуру все равно можно использовать для анализа нормальных мод).
4. В выводе 2 говорится - «впервые методами молекулярной динамики установлено, что модель белков VirE2-VirE1 достигает равновесного, стабильного состояния при 500 пс», что представляется достаточно ординарным наблюдением для вывода по диссертационной работе, он верен только для конкретного протокола и его можно опустить.
5. В названии работы лучше не использовать сокращения типа «оцДНК», даже если они широко распространены.

Высказанные замечания не снижают ценности выполненного соискателем исследования. Положения, выносимые на защиту и выводы полностью отражают содержание работы и фактические её результаты исследования.

Данная работа представляет собой законченное исследование, полученные данные представляют интерес, как для специалистов биофизиков, так и биотехнологов. Результаты исследований могут быть использованы в научно-исследовательских и прикладных институтах, а также при чтении соответствующих учебных курсов в области молекулярной биотехнологии и биоинформатики для специалистов в области биотехнологии и биоинформатики.

В дальнейшей работе, по нашему мнению, было бы желательно расширить набор используемых программ для изучения белок-белковых взаимодействий и больше методов использовать для экспериментального подтверждения полученных предсказаний.

Вышеизложенное позволяет прийти к заключению, что по актуальности, научной новизне, методическому уровню выполненных исследований работа «Структура и функции белка VirE2 в переносе оцДНК в эукариотические клетки», отвечает критериям, установленным в установленном в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ №842 от 24.09.2013), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Гусев Юрий Сергеевич заслуживает присвоения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Отзыв на диссертационную работу 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 был обсужден и одобрен на заседании межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике ФБГУН Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, протокол № 6 от 09.06.2014 г.

Отзыв составил:

Заместитель директора по
научно-организационной работе,
заведующий лабораторией
генной инженерии
ИЦиГ СО РАН, д.б.н.

Ученый секретарь
К. Б. Б.



Алексей Владимирович Кочетов

Орлова Г.В.