

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Ильиной Ксении Борисовны
«Закономерности изменения структуры растворов белка лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

Диссертационная работа Ильиной Ксении Борисовны посвящена исследованию структуры растворов белка лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии в зависимости от параметров, влияющих на кристаллизацию.

Кристаллизация белков является важнейшим этапом на пути к определению структуры белковой молекулы. Несмотря на развитие современных методов исследования структуры белков, таких как ядерный магнитный резонанс, криоэлектронная микроскопия, преобладающим методом исследования структуры белков с высоким разрешением является рентгеноструктурный анализ (РСА). Применение метода РСА ограничено использованием образца в виде кристалла. Не все белковые молекулы могут быть подвержены кристаллизации; необходимо создать очень специфичные условия для того, чтобы начался рост кристалла белка. Понимание механизмов начальной стадии кристаллизации, переходных процессов, происходящих в растворе до образования кристаллов, является важнейшей научной задачей, разрешив которую, можно управлять не только процессом кристаллизации, но создавать более сложные функциональные белковые структуры. В своей диссертационной работе Ильина К.Б. исследует именно структуру переходного состояния на примере хорошо изученного модельного белка лизоцима. Для решения поставленных задач используется методы малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов. Использование моделирования олигомеров при обработке экспериментальных данных позволило существенно повысить точность результатов, и позволило определить, из каких именно олигомеров состоит кристаллизационный раствор лизоцима.

Диссертационная работа Ильиной К.Б. состоит из 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 121 странице, включая 45 рисунков, 11 таблиц и список литературы из 122 наименований.

В **первой главе** диссертационной работы представлен обзор литературных данных по методам кристаллизации белков и исследования растворов белков. Приведен подробный обзор имеющихся исследований процессов самоорганизации белковых молекул различными методами. Также показана важность исследования агрегации и кристаллизации белков. Отмечены результаты исследований, проведенных ранее методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов, статического и динамического рассеяния света, численного моделирования, спектроскопии ядерного магнитного резонанса, атомно-силовой микроскопии и др.

Во **второй главе** описаны процедура приготовления и методы исследования структуры кристаллизационных растворов белков, которые соискатель применяла в своей работе. Для решения поставленных задач были выбраны два метода исследования: метод малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРН) и нейтронов (МУРН) – как наиболее подходящие для исследования растворов белков. Применение комплексного подхода к изучению кристаллизации лизоцима позволило определить структуру переходного состояния раствора, определить тип агрегатов, предшествующих образованию кристаллов. Подход к обработке данных МУРН и МУРН, при котором олигомеры выделяются из структуры кристалла лизоцима тетрагональной фазы и используются для анализа данных, дал возможность определить структуру и количество олигомеров, образующихся в растворе при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

В **третьей главе** представлены результаты исследования структуры растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРН. Показаны результаты кристаллизации лизоцима тетрагональной фазы и исследование растворов лизоцима в легкой воде (H_2O) методом МУРН на станциях синхротронного излучения ДИКСИ Курчатовского источника синхротронного излучения (Москва, Россия) и BM29 Европейского источника синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция). В результате исследования влияния температуры и концентрации на структуру раствора лизоцима было обнаружено, что кристаллизационный раствор состоит из трех компонент: мономеры, димеры и октамеры. При этом структура октамера, соответствует структуре кристалла лизоцима тетрагональной фазы. Также продемонстрировано, что концентрация октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима с хлоридом натрия увеличивается с ростом концентрации белка и понижением температуры.

В **четвертой главе** представлены результаты исследования структуры кристаллизационных растворов лизоцима в тяжелой воде (D_2O) методом МУРН. Метод МУРН использовался для подтверждения результатов, полученных в главе 3. Специфика экспериментов МУРН не позволяла использовать одинаковые условия экспериментов, как в исследованиях с помощью метода МУРР. В экспериментах методом МУРН использовался больший объем образца и время экспозиции, а в качестве растворителя использовалась тяжелая вода. Использование D_2O было необходимо для лучшего контрастирования белка и минимизации фона некогерентного рассеяния нейтронов. Исследования структуры растворов лизоцима с хлоридом натрия методом МУРН так же, как и в Главе 3, подтвердили образование олигомеров лизоцима и увеличение концентрации октамеров при понижении температуры и увеличении концентрации белка.

В **пятой главе** диссертационной работы исследован изотоп-эффект (легкая/тяжелая вода) на олигомерный состав кристаллизационного раствора методом МУРР. Использование разных типов растворителей, тяжелой и легкой воды, обусловлено спецификой экспериментов методом МУРН, в которых для улучшения контраста с одновременным уменьшением некогерентного фона используется тяжелая вода. Сравнение оказываемого влияния двух типов растворителей на структуру кристаллизационного раствора лизоцима показало, что в тяжелой воде образуется больше октамеров, чем в легкой. При этом сохраняется общая закономерность увеличения объемной доли октамеров при понижении температуры и увеличении концентрации белка.

Каждая глава диссертационной работы имеет заключение, в котором отражены основные результаты, представленные в главе. Общие выводы всей работы указаны в конце изложения и в полной мере отражают основные научные результаты. В качестве **основных результатов** работы можно выделить следующие заключения:

1. Впервые установлено, что добавление хлорида натрия к раствору лизоцима приводит к формированию стабильной фазы из октамеров.
2. Показано, что в кристаллизационных растворах лизоцима присутствуют мономеры, и образуются димеры и октамеры. Других типы олигомеров не образуются в исследуемом диапазоне температур и концентраций.

3. При увеличении концентрации белка и понижении температуры кристаллизационного раствора лизоцима растет объемная доля октамеров.
4. Объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима, где в качестве растворителя используется D_2O , значительно превышает объемную долю октамеров при тех же условиях, но в H_2O .

В качестве **научной новизны** можно выделить несколько основных пунктов:

- Впервые исследовано изменение олигомерного состава кристаллизационного раствора лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии. Установлено, что при добавлении осадителя хлорида натрия к раствору лизоцима, образуется предкристаллизационная фаза из октамеров, структура которых соответствует структуре будущего кристалла.

- Установлено, что в кристаллизационном растворе лизоцима образуются мономеры, димеры и октамеры, а другие олигомеры отсутствуют.

- Впервые исследовано влияние температуры, концентрации и типа растворителя на олигомерный состав, структуру кристаллизационного раствора лизоцима, приводящего к росту кристаллов тетрагональной фазы.

Практическая значимость работы не вызывает сомнения. Результаты работы могут быть использованы для более эффективного получения кристаллов белков, которые в свою очередь являются объектом исследований для получения структурной информации о белковых молекулах. Ускорение поиска условий, благоприятных для кристаллизации белков, позволит значительно сократить время получения кристаллов и определения их структуры.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных приборов: ДИКСИ Курчатовского источника синхротронного излучения (Россия, Москва), BM29 Европейского источника синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция), ЮМО ИБР-2 Объединенного института ядерных исследований (Россия, Дубна); методов исследования растворов белков: МУРР и МУРН; а также основных программ обработки экспериментальных данных, используемых мировым научным сообществом: Oligomer, Polymix. Также достоверность результатов

подтверждается наличием публикаций в рецензируемых научных изданиях и выступлениями на российских и международных конференциях.

Личный вклад Ильиной К.Б. также не вызывает сомнений. Прделан большой объем экспериментальной работы, включающий в себя несколько этапов исследования: подбор условий экспериментов, подготовку исследуемых образцов, проведение экспериментов с помощью методов МУРР и МУРН, анализ полученных результатов. Вся работа проделана лично автором или при ее непосредственном участии.

К диссертации Ильиной К.Б. имеется ряд **замечаний**:

1. Частое упоминание тетрагональной фазы кристаллов лизоцима создает впечатление, что в работе исследовалось несколько различных фаз кристаллов лизоцима, хотя исследовалась только одна тетрагональная фаза. Для лучшего понимания следовало бы ввести упоминание симметрии кристаллов только в начале, а далее опустить этот термин.

2. Все исследования проводились только методами МУРН и МУРР. В обзоре литературы показано, что часто используемым при исследовании растворов белков методом является динамическое рассеяние света (ДРС). Для более полной картины не хватает еще одного метода, возможно именно метода ДРС.

3. В третьей главе в подписи к рисункам указан метод «объемной кристаллизации», но при описании процедуры кристаллизации приводится другое название метода, а именно «кристаллизации в объеме». Следовало бы использовать одну и ту же терминологию по всему тексту диссертационной работы.

4. В пункте 3.4 указано, что экспериментальные данные МУРР обрабатывались моделями олигомеров. Подробное изображение олигомеров представлено в пункте 3.5. моделей олигомеров. Несмотря на то, что подробное описание моделей олигомеров, используемых при обработке экспериментальных данных МУРН и МУРР, представлено в главе 2, следовало бы перенести рис. 3.12 в пункт 3.4 или сослаться на пункт 2.2.4. и рис. 2.5.

5. В пятой главе рис. 5.3 б малоинформативен, так как он отражает результаты, представленные на рис. 5.3 а. По сути, это одно и то же представление данных, но в разных координатах.

Сделанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертации, ее научной и практической значимости и носят рекомендательный характер. В целом, диссертационная работа Ильиной К.Б. является актуальным, законченным и выполненным на высоком уровне исследованием. Автореферат диссертации кратко и, в то же время, достаточно полно отражает содержание диссертационной работы. Полученные результаты расширяют знания о самоорганизации белковых молекул в растворе, приводящей к росту кристаллов.

Диссертационная работа Ильиной К.Б. представляет собой завершенную научно-квалификационную работу и полностью соответствует требованиям раздела II Положения о присуждения ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г №842, а ее автор, Ильина Ксения Борисовна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

Официальный оппонент,

Авдеев Михаил Васильевич

10.01.2020

Доктор физико-математических наук,

Начальник сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка, Международной межправительственной организации Объединенный институт ядерных исследований (ЛНФ ОИЯИ)

141980, Московская обл., г. Дубна, ул. Жолио-Кюри, 6

Тел.: 8(496) 2162674

e-mail: avd@nf.jinr.ru

Согласен на обработку персональных данных

10.01.2020

Подпись Авдеева М.В. заверяю

Ученый секретарь ЛНФ ОИЯИ



Д.Худоба