

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ильиной Ксении Борисовны
**«ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ БЕЛКА
ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ»**,

представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

Поиск условий кристаллизации является наиболее непредсказуемым этапом определения кристаллической структуры белков. Для получения кристаллов, подходящих для рентгеноструктурного анализа, как правило, надо исследовать сотни, а иногда тысячи условий, поэтому создание базы, которая позволила бы предсказать направление поисков является актуальной задачей. Диссертационная работа Ильиной К.Б. посвящена исследованию белковых кластеров, предшествующих кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии, методами малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) и нейтронов (МУРН).

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 121 страницу, включая 45 рисунков, 11 таблиц и список литературы из 122 наименований.

Во введении диссертации описана важность исследования переходного состояния при образовании кластеров – предшественников кристаллов, поставлена цель и сформулированы задачи, описана научная новизна, представлены основные положения, выносимые на защиту и определён личный вклад автора.

Первая глава представляет собой обзор публикаций, посвящённых методам кристаллизации белков и их исследованию в растворах. Подробно рассмотрены процессы агрегации и кристаллизации модельного белка – лизоцима. Приведён сравнительный анализ методов исследования растворов белков, которые применялись для изучения процессов агрегации и кристаллизации лизоцима. Основные методы – это динамическое и статическое рассеяние света, малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов. Автором указано, что

определённых данных о начальной структурной единице при росте кристалла лизоцима не было получено.

В главе 2 описано получение кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с использованием в качестве осадителя хлорида натрия. Представлена методика обработки экспериментальных данных, полученных при исследовании растворов лизоцима методами МУРР и МУРН.

Главы 3 и 4 посвящены описанию результатов исследования растворов лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методами МУРР и МУРН, соответственно. Было продемонстрировано, что при использовании как H_2O (в случае изучения раствора методом МУРР), так и D_2O (в случае изучения раствора методом МУРН) в растворе образуются только димеры и октамеры белка. При увеличении температуры и снижении концентрации лизоцима количество олигомеров в растворе уменьшалось, что вполне закономерно. В том случае, когда в качестве растворителя использовали D_2O (эксперименты МУРН), процентное содержание олигомеров в кристаллизационном растворе лизоцима повышалось. Автором экспериментально показано, что наиболее стабильная фаза в растворе лизоцима при добавлении осадителя (хлорида натрия) содержит октамеры белка.

В главе 5 показано влияние типов растворителей H_2O и D_2O на структуру кристаллизационного раствора лизоцима. Для сравнения влияния различных растворителей кристаллизационные растворы исследовались методом МУРР при одинаковых условиях (температура, концентрации, время эксперимента). Экспериментально обнаружено, что объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима выше в D_2O , чем в H_2O , при этом одинаковая концентрация олигомеров в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O и D_2O , совпадает, когда температура раствора в H_2O ниже на $10\text{ }^\circ\text{C}$, чем в D_2O .

Хочется отметить, что новизной работы является применение комплексного подхода к изучению структуры кристаллизационных растворов лизоцима, основанного на выделении олигомеров из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, моделировании таких олигомеров и использовании их при обработке экспериментальных данных МУРН и МУРР. Такой подход позволил определить тип и структуру олигомеров, предшествующих

кристаллизации. Впервые показано, что в условиях образования тетрагональных кристаллов лизоцима в кристаллизационном растворе формируется устойчивая предкристаллизационная фаза, состоящая из октамеров лизоцима. При этом кристаллизационный раствор лизоцима состоит только из определенных олигомеров: мономеров, димеров и октамеров. Впервые исследовано влияние типа растворителя, температуры и концентрации белка на структуру раствора лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии.

Диссертационная работа Ильиной К.Б. несомненно является актуальным научным исследованием, результаты которого позволят приблизиться к пониманию механизмов самоорганизации белковых молекул, приводящих к росту кристаллов. Практическая значимость работы также очень важна: обнаружение олигомеров на начальной стадии кристаллизации, позволит существенно сократить время и усовершенствовать процесс поиска условий, в которых возможен рост кристаллов, тем самым позволит увеличить скорость получения структурной информации о белковой молекуле.

Выводы отражают основные научные результаты, представленные в работе Ильиной К.Б. Достоверность результатов не вызывает сомнений, поскольку работа выполнена с использованием современного программного обеспечения, методик и применением высокоточного оборудования. Результаты работы изложены в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и российских конференциях.

Представленная диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном уровне. Вместе с тем в диссертации имеются определенные погрешности.

1. В обзоре литературы довольно часто встречаются англицизмы, которые иногда приводят к затруднениям в понимании смысла предложения. Например, «агрегаты» элементарной ячейки, «извлечение» абсолютных гидродинамических радиусов (стр.30), фраза «в некоторых из этих колебаний образуются белковые олигомеры» (стр.48) и др.

2. На представленных на рисунке 3.2 рентгенограммах следовало бы указать области разрешения (Å). На рентгенограммах также видно, что криораствор для кристаллов выбран неоптимальный.

3. Было бы разумно провести аналогичные эксперименты, с использованием другого хорошо кристаллизуемого белка и/или лизоцима других сингоний, что значительно улучшило данную научно-квалификационную работу.

Тем не менее, замечания не затрагивают основных выводов диссертационной работы Ильиной К.Б. Автореферат отражает материал, изложенный в диссертации. По количеству полученных результатов, их новизне, актуальности, практической значимости представленная диссертационная работа Ильиной К.Б. полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным 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 степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния».

Отзыв составил:

Официальный оппонент,

25.12.2019

Светлана Викторовна Тищенко

Доктор биологических наук,

Ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук, 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 4

Телефон: 8 (4967) 318444

Электронная почта: sveta@vega.protres.ru

Согласна на обработку персональных данных

25.12.2019

Подпись официального оппонента Тищенко С.В. заверяю

Учёный секретарь ФГБУН Института белка РАН



Никонова Е.Ю.