

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Марченковой Маргариты Александровны
**«Особенности различных стадий кристаллизации лизоцима и получение
планарных структур на основе белков цитохрома *c* и лизоцима»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-
математических наук по специальности
01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

В процессе определения кристаллической структуры белков наибольшие трудности вызывает начальный этап - поиск условий кристаллизации. Основная часть диссертационной работы Марченковой М.А. посвящена изучению различных стадий кристаллизации белков на примере модельного белка – лизоцима. Исследовалась предкристаллизационная стадия в растворе, образование, деградация монокристаллов и формирование тонких пленок. Данная работа является весьма актуальной и важной, поскольку позволяет прояснить закономерности некоторых этапов кристаллизации белка.

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем работы составляет 144 страницы, включая 66 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 138 наименований.

Во введении диссертации четко обоснована актуальность проводимых исследований, указаны объекты (цитохром *c* и лизоцим), поставлена цель и сформулированы задачи, описана научная новизна работы, представлены основные положения, выносимые на защиту и определён личный вклад автора.

Первая глава представляет собой обзор современных публикаций, посвящённых исследованиям процессов формирования пленок цитохрома *c*, в частности, в комплексе с различными липидами. В работе отмечено, что упругие свойства полученных систем (цитохром *c* – липид), до сих пор практически не изучены. Литературный обзор охватывает также большое количество работ, посвящённых исследованию различных стадий роста кристаллов лизоцима и получения тонких плёнок, регистрируемых, в основном, методом атомно-силовой микроскопии.

В обзоре описаны такие методы создания упорядоченных тонких белковых пленок, как центрифугирование, Ленгмюра-Блоджетта, методы «литья», погружения, послойной сборки. Охарактеризованы методы кристаллизации белков - диффузия в парах, кристаллизация в объёме, встречная диффузия, диализ. В работе указано на актуальность развития методик для создания планарных структур на основе белков и важность *in situ* исследования процессов роста кристаллов, особенно на начальных этапах, поскольку неизвестно какой элемент может стать структурной единицей при росте белкового кристалла.

Во второй главе, наряду с описанием традиционных методов исследования органических тонких пленок или белковых кристаллов (метод рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, дифрактометрии, динамического рассеяния света и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей), рассмотрены методы и подходы, разработанные с непосредственным участием автора диссертации. Автор применил для изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок новую модификацию метода стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей.

Для исследования различных стадий роста и деградации белковых кристаллов при участии автора была создана ячейка, позволяющая исследовать структуру растущего кристалла рентгеновскими методами. Поскольку температура влияет на растворимость белка в растворе, то для исследования лизоцима в различных условиях кристаллизации, использовалась специальная термостатирующая ячейка. В работе описаны методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и динамического рассеяния света применительно к исследованию структуры белкового раствора в условиях кристаллизации.

Третья глава посвящена исследованию процесса формирования пленки цитохрома *c* с помощью ленгмюровской технологии. Цитохром *c* – митохондриальный белок, который участвует в процессах внутриклеточного дыхания, поскольку способен к обратимому одноэлектронному взаимодействию, является антиоксидантом, а также играет ключевую роль в

запуске апоптоза. Формирование плёнок на основе цитохрома *c* с целью создания биосенсоров и изучение их структуры, является важной, актуальной, хотя и сложной задачей. Предполагается, что началу процесса апоптоза предшествует выход цитохрома *c* из митохондрий, что происходит благодаря его взаимодействию с липидом митохондриальной мембраны – кардиолипином. В представленной диссертационной работе для формирования пленки цитохрома *c* использовали весьма интересный подход – формирование белково-липидной пленки за счет адсорбции цитохрома на ленгмюровском монослое кардиолипина. В главе 3 детально описаны кинетические исследования взаимодействия белка с липидным монослоем при различных условиях (разных количествах фосфолипидов в монослое, количества белка в субфазе и различном начальном давлении липидной пленки), изучены упругие свойства полученной системы. Представленные результаты позволили сделать вывод, что при взаимодействии цитохрома *c* с монослоем кардиолипина белок меняет свою конформацию. Этими изменениями автор объясняет особенности взаимодействия белка с бислойной мембраной митохондрии.

Поскольку система цитохром *c*-кардиолипин является сложным объектом, дальнейшая работа по адаптации существующих прецизионных методов исследования структуры белковых пленок на всех этапах формирования кристаллов проводилась с использованием модельного белка - лизоцима.

Лизоцим - это один из наиболее изученных белков, известно много работ, посвящённых исследованию процесса роста его кристаллов в различных условиях. Этот белок был использован автором для адаптации методов структурной диагностики органических компонентов гибридных наносистем. Описано получение достаточно больших двумерных плёнок лизоцима и кристаллизация лизоцима на этих плёнках.

В четвертой главе представлены результаты *in situ* исследований стадий зарождения, роста и деградации кристаллов лизоцима на подложках кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии с помощью сконструированной ячейки, описанной во второй главе. Такой контроль за растущими кристаллами позволил проанализировать изменение

дифракционных кривых в ходе эволюции кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и их последующей деградации.

Пятая глава посвящена структурным исследованиям лизоцима в растворе в зависимости от температуры, как одного из факторов кристаллизации. С помощью молекулярного моделирования в структуре лизоцима тетрагональной сингонии были определены возможные мотивы, образующие кристалл – это октамеры, гексамеры, тетрамеры и димеры белка. Для того, чтобы определить какие олигомеры участвуют в формировании кристалла, методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей были исследованы растворы лизоцима с осадителем (NaCl) при различных температурах, обеспечивающих оптимальные условия кристаллизации белка или затрудняющие рост кристаллов. Было экспериментально продемонстрировано, что в таком растворе кроме мономеров образуются октамеры и димеры, тетрамеры и гексамеры не были обнаружены, при увеличении температуры количество олигомеров в растворе уменьшалось.

Таким образом, впервые для изучения начальной стадии кристаллизации белков был предложен подход, основанный на выделении элементарных строительных блоков белка и исследовании методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей кристаллизационного раствора. Этот подход может быть полезен для поиска оптимальных условий кристаллизации различных белков.

Довольно обширные, детально сформулированные выводы полностью отражают основные научные результаты, представленные в работе. Результаты получены Марченковой М.А. впервые, являются оригинальными и пионерскими.

Главные выводы данной работы основываются на тщательном сравнительном анализе полученных экспериментальных и теоретических данных и сводятся к следующему:

1. Предложен новый способ определения структуры поверхностного слоя на основе разработанного модифицированного метода стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных

плоскостей. Для многослойной пленки стеарата свинца показано, что структура верхнего слоя значительно отличается от структуры остального объема образца: гидрофобные хвосты последнего слоя стеарата свинца наклонены по отношению к нормали к поверхности под углом 40° .

2. Проведена отработка условий формирования ленгмюровских монослоев и получены пленки цитохрома *c*, липидов, входящих в состав митохондриальной мембраны и белково-липидные пленки на их основе. Исследована кинетика адсорбции цитохрома *c* на липидных монослоях. Основываясь на экспериментальных результатах в совокупности с литературными данными, выдвинуто предположение, что белок меняет свою конформацию во время его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой кардиолипина на поверхности жидкости.
3. В разработанной специализированной ячейке проведены первые оптические и рентгеновские исследования *in situ* процессов роста и деградации кристалла лизоцима тетрагональной сингонии на неорганических подложках, в том числе, на проводящей. Такой контроль роста кристаллов позволил получить кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии с качеством, соответствующим качеству лучших образцов кристаллов, выращенных в условиях земной гравитации (полуширина кривых дифракционного отражения для рефлекса (220) в эксперименте составила 28.8 угл. с, по литературным данным – $24-45$ угл. с).
4. Предложен и экспериментально подтвержден новый подход к исследованию начальной стадии процесса кристаллизации белков, основанный на выделении основных мотивов в структуре белковых кристаллов, определяющих образование комплексов в растворе. Данный подход успешно апробирован на примере лизоцима тетрагональной сингонии.

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается: большим объемом экспериментальных данных, полученных с использованием современных приборов и различных рентгеновских методик,

в том числе с применением синхротронного излучения; использованием разнообразных программ и алгоритмов для моделирования олигомеров белка, структуры органических пленок; построением расчетных кривых малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, апробированных в аналогичных исследованиях органических объектов методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн.

Практическая ценность работы заключается в следующем:

- 1) полученные данные о формировании белково-липидной пленки (цитохром *c* - тетраолеил кардиолипин) могут быть применены для решения фундаментальной задачи – определения структуры этого белково-липидного комплекса, а также прикладных задач по созданию сенсоров на основе цитохрома *c*;
- 2) создана ячейка для проведения структурных исследований белковых кристаллов на различных стадиях роста и структуры различных белково-липидных систем в нативном состоянии;
- 3) предложен подход быстрого скрининга и определения оптимальных условий кристаллизации, основанный на исследовании начальных стадий кристаллизации.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 13 публикациях, из которых пять - это статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК. Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и национальных конференциях и семинарах.

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

1. В Главе 3, посвященной получению тонкопленочных структур цитохрома *c*, не исследовано влияние температуры на процесс кинетики формирования пленок цитохром *c*-кардиолипин.

2. Диссертационная работа выиграла бы, если исследование процессов роста кристаллов лизоцима (глава 4) провели при нескольких температурах, используя полученные автором результаты по температурным зависимостям начальной стадии кристаллизации (глава 5).

3. Предложенный подход к изучению начальной стадии кристаллизации белков апробирован только на примере лизоцима тетрагональной сингонии. Эксперименты, проведенные с использованием других хорошо кристаллизуемых белков и/или лизоцима других сингоний, значительно расширили бы диапазон достоверности данного подхода.

Диссертация изложена четко, грамотно и аккуратно, с небольшим количеством опечаток. По объему полученных результатов, их новизне, актуальности, практической значимости представленная диссертационная работа Марченковой М.А. полностью соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным согласно п. 8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор, Марченкова Маргарита Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов».

Отзыв составил:

Официальный оппонент,

06.06.2016

Светлана Викторовна Тищенко

Кандидат биологических наук,

Старший научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН, 142290, Россия, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 4

Телефон: 8 (4967) 318474

Электронная почта: sveta@vega.protres.ru

Подпись официального оппонента С.В. Тищенко заверяю

Зав. канцелярией ИБ РАН



Галзитская О.В.