

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и

инновациям НИТУ «МИСиС»

М.Р. Филонов

2016 года

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
Марченковой Маргариты Александровны

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

Диссертационная работа Марченковой М.А. посвящена разработке тонких планарных белковых систем и исследованию структуры белковых кристаллов на различных стадиях их формирования различными рентгеновскими методами в том числе с использованием синхротронного излучения.

Несмотря на обширную литературу, посвященную исследованиям процесса роста кристаллов, имеется ряд принципиальных еще не решенных проблем. Это прежде всего относится к выращиванию соединений сложного состава (как органических, так и неорганических.), структура которых в отличие, например, от кристаллов кремния или алмаза состоит из разнородных элементов.

До сих пор остается открытым вопрос, какой элемент является структурной единицей роста кристалла. Понимание механизма кристаллизации ведет не только к возможности управления этим процессом, но также к рациональному поиску условий кристаллизации. Это особенно актуально для кристаллов белков, где поиски условий кристаллизации ведутся методом проб и ошибок, а сам процесс кристаллизации *in situ* и процесс образования пленок еще не исследовался

Поэтому работа М.А. Марченковой является весьма актуальной.

Научная новизна работы, прежде всего, заключается в обнаружении олигомеров лизоцима в растворе в процессе кристаллизации, установление связи между этими олигомерами и структурой полученного кристалла, а также корреляции образования этих олигомеров с различными условиями кристаллизации.

Во-вторых, в работе была разработана специализированная кристаллизационная ячейка с замкнутой атмосферой, позволяющая изучать структуру кристаллов неразрушающими рентгеновскими и оптическими методами, в том числе в условиях внешних воздействий. При помощи данной ячейки проведены *in situ* исследования процессов зарождения, роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом рентгеновской дифрактометрии.

В-третьих, в работе впервые получены пленки белка цитохрома *c* с липидом тетраолеил кардиолипином и изучена кинетика образования данных пленок, а также разработана модификация метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей. Данный метод был апробирован на примере изучения тонкой структуры приповерхностного слоя многослойной пленки стеарата свинца на кремниевой подложке.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов и списка цитируемой литературы. Во введении содержится обоснование

актуальности проводимых исследований, излагаются цели и задачи диссертационной работы, а также отмечены ее новизна и практическая значимость.

В первой главе приводится детальный обзор литературы по современному состоянию исследований различных стадий роста кристаллов лизоцима, в том числе самой начальной. Отмечены нерешенные вопросы, необходимость развития подходов к неразрушающему *in situ* исследованию процессов роста кристаллов, а также начальных процессов кристаллизации, и разработки методов создания планарных структур на основе белков. В целом обзор достаточно полно отражает состояние проблем, решаемых в данной диссертации.

Во второй главе описаны аппаратно-методические подходы, примененные в работе, для исследования процессов кристаллизации белков, а также кристаллов и планарных структур на их основе на полупроводящих и диэлектрических подложках. Показана применимость методов исследования начальных этапов кристаллизации белков в растворе (методы динамического рассеяния света и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей), стадий роста и деградации непосредственно на подложке (метод рентгеновской дифрактометрии). В целом глава отражает высокий уровень и современность используемых в диссертации методик. Особо следует выделить созданный с участием автора диссертации новый метод исследования органических частично упорядоченных многослойных систем на основе специальной ранее неизвестной модификации метода многоволновой дифракции.

В главе 3 описана успешная попытка получения пленки и пленки цитохрома *c* с липидами и пленок основе белка лизоцима, которые могут являться основой для создания разнообразных сенсорных систем

В главе 4 на примере кристалла лизоцима тетрагональной сингонии получены первые результаты *in situ* исследования стадий зарождения, роста и деградации белкового кристалла на подложках кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии. Данные измерения

проведены в разработанном с участием автора кристаллизаторе с замкнутой атмосферой, который позволяет в течение долгого времени проводить сохранять белковые кристаллы. Приведенные в данной главе экспериментальные данные по эволюции кривых дифракционного отражения, являющихся общепринятой характеристикой качества кристалла, отражают изменения дефектной структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии в процессе его жизни и разрушения.

В главе 5 предложен новый подход к изучению начальной стадии кристаллизации белков, основанный на анализе структуры белкового кристалла, выделении его элементарных строительных блоков и исследовании растворов в условиях кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. На примере лизоцима тетрагональной сингонии показано существование олигомеров, выделенных из структуры белка, в растворе при условиях кристаллизации. Полученные результаты указывают на высокую вероятность правильности предложенной в данной работе модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул лизоцима.

В заключении кратко сформулированы основные результаты проведенных исследований и выводы на их основе.

В части практической значимости работы необходимо отметить, что предложенный в работе новый способ изучения начальной стадии процесса кристаллизации белков, основанный на выделении основных мотивов в структуре белковых кристаллов, определяющих образование комплексов в растворе, может быть полезен для поиска и корректировки оптимальных условий кристаллизации белков.

Разработанная ячейка позволяет проводить рентгеновские и оптические *in situ* исследования пленок и кристаллов различных белков не только для изучения процессов роста и деградации кристаллов, но может быть также

использована для отработки технологии создания сенсоров на основе белковых структур.

Полученные данные об условиях формирования пленки цитохром *c*-кардиолипин можно использовать для создания гибридных систем на их основе, а также для фундаментальных исследований процессов, происходящих в митохондриальной мембране.

С помощью развитой в данной работе модификации метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия можно проводить исследования структуры тонких приповерхностных слоев органических многослойных систем, что является крайне важным при создании белковых пленок.

По диссертации Марченковой М.А. можно сделать следующие замечания:

1. Исследования процессов роста белковых кристаллов (Глава 4) проводились только одним методом рентгеновской дифрактометрии, который было бы хорошо дополнить комплементарными методами.
2. В Главе 5 приводятся результаты исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. На процесс кристаллизации влияют многие факторы (такие как pH, концентрации осадителя и белка, температура и др.), однако в данной работе было изучено только влияние температуры на процесс кристаллизации.
3. Для анализа данных из структуры лизоцима тетрагональной сингонии были выделены олигомеры, которые было бы интересно сравнить с олигомерами из структуры лизоцима, например, моноклинной сингонии и обсудить возможность обобщения использованных олигомеров в качестве универсальных строительных блоков кристалла лизоцима.

Отмеченные недостатки не снижают высокой ценности работы и не затрагивают основные выводы, поэтому не влияют на ее общую положительную оценку.

Необходимо отметить личный вклад соискателя, который состоит в получении всех исследованных образцов – монослои на поверхности жидкости, многослойные пленки, кристаллы белков; исследовании стадии формирования пленок кардиолипина на поверхности жидкости, изучение упругих свойств сформированных белково-липидных пленок. Автором принимала участие в разработке кристаллизационной ячейки с замкнутой атмосферой и рентгенопрозрачным окном и использовала ее для роста кристаллов.

Автор принимала участие в проведении молекулярного моделирования различных олигомеров, выделенных из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, а также структуры пленки стеарата свинца. Полученные модели использовались для интерпретации экспериментальных данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей от раствора лизоцима и стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей от пленки стеарата свинца.

Автор непосредственно участвовала в проведении всех описанных в работе рентгеновских экспериментов, в том числе на источнике СИ.

Материал диссертации изложен достаточно четко и последовательно. Наглядные рисунки, графики и таблицы хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Выводы в конце каждой главы помогают в восприятии материала диссертации. Диссертация представляет собой цельную, завершенную научно-исследовательскую работу по актуальной тематике и обладает существенной практической значимостью.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 13 публикациях, из которых 5 статей в научных журналах, входящих в список

реферируемых ВАК, и апробированы на семинарах, научных школах и российских и международных конференциях.

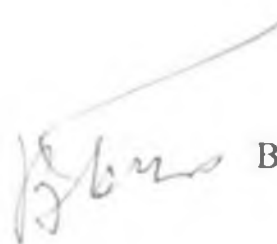
Диссертационная работа Марченковой М.А. может быть отнесена к научно-квалификационной работе, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для разработки и контролируемого создания органических компонентов гибридных наносистем. Рассматриваемая диссертационная работа является законченным исследованием и 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».

Диссертационная работа Марченковой М.А. «Особенности различных стадий кристаллизации лизоцима и получение планарных структур на основе белков цитохрома *c* и лизоцима», заслушана и обсуждена на заседании семинара кафедры материаловедения полупроводников и диэлектриков Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», протокол № 03/16 от 19 мая 2016 года.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании семинара кафедры материаловедения полупроводников и диэлектриков Национального исследовательского технологического университета «МИСиС» протокол № 03/16 от 19 мая 2016 года.

Отзыв составил:

Д.ф.-м.н., профессор



В.Т. Бублик

К.ф.-м.н., ведущий инженер



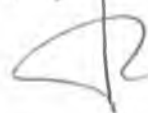
К.Д. Щербачев

Зав. кафедрой МПид, д.ф.м.-н., профессор



Ю.Н. Пархоменко

Уч. Секретарь кафедры МПид, к.ф.-м.н.



И.С. Диденко

119049, г. Москва, Ленинский проспект, д. 4, НИТУ «МИСиС», кафедра
материаловедения полупроводников и диэлектриков

Телефон: 8 (495) 2360512

Электронная почта: parkh@rambler.ru