

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Дьяковой Юлии Алексеевны** «Самоорганизация белковых молекул при формировании кристаллов и пленок», представленную на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов

Диссертационная работа Дьяковой Юлии Алексеевны посвящена установлению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул и их самоорганизации при формировании упорядоченных систем на основе нового подхода к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем в растворах, основанного на применении рентгеновских, синхротронных и нейтронных методов, методов молекулярного моделирования и молекулярной динамики, создании специализированного инструментария.

Знание трехмерной структуры белков и их комплексов с целевыми молекулами не только имеет фундаментальное значение для исследования механизмов функционирования живых организмов и вирусов, но и уже является неотъемлемой частью технологических процессов - дизайна и разработки терапевтических препаратов для медицины и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, биоэнергетики; а также новых биоподобных материалов.

В настоящее время наиболее эффективными методами определения трехмерной структуры биомолекул с высоким разрешением являются методы рентгеноструктурного анализа (РСА). Этими методами получены более 85% структур в международной базе данных. *При этом следует подчеркнуть, что доля белков, для которых определена трехмерная структура, составляет лишь проценты от количества известных белков.*

Методы РСА основаны на получении дифракционной картины от кристалла белка. С развитием технологий генерации синхротронного излучения - появлением источников 4-ого поколения и рентгеновских лазеров на свободных электронах, требования к размеру кристалла снижаются. Для определения структуры макромолекулы с атомарным разрешением достаточно получить кристаллы субмикронного размера.

Основным «узким» местом для определения структуры белков методом РСА остается поиск условий кристаллизации, необходимый даже для получения нанокристаллов, который сегодня производится методом проб и ошибок. При этом для оценки результата образования кристалла может потребоваться от нескольких часов до нескольких месяцев.

Знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде, а также разработки технологий использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

В соответствии с вышеуказанными проблемами работа Дьяковой Ю.А. нацелена на решение ряда важнейших задач:

- разработка новых методов и подходов к исследованию взаимодействия белковых молекул и механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы;
- новые методы и подходы должны обеспечить определение с высоким пространственным разрешением структуры не только кристаллов, но и слабоупорядоченных систем, включая растворы;
- разработка и применение комплекса взаимодополняющих современных экспериментальных методик определения структуры белков и их комплексов в нативном состоянии с атомарной точностью – синхротронные и нейтронные методы исследования структуры, молекулярное моделирование и пр.

Таким образом, создание вышеуказанной новой научно-методической базы, нацелено на получение знаний о фундаментальных основах взаимодействия белковых молекул и механизмах их самоорганизации в упорядоченные системы, что крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде и определения принципов работы «молекулярных машин».

Разработка и создание методов контроля и управления механизмами самоорганизации белков в упорядоченные системы позволит уже сегодня создавать эффективные технологические процессы дизайна и ускоренной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, а «завтра» создать технологии использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

В связи с вышесказанным **актуальность** диссертационной работы Дьяковой Ю.А. не вызывает сомнений.

Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 403 страницы, включая 133 рисунка, 30 таблиц и список литературы из 505 наименований.

В первой главе диссертационной работы представлен обзор методов и подходов к исследованию структуры макромолекул с атомарным разрешением, а также работ, посвященных исследованию взаимодействия

белковых молекул в растворах на начальной стадии кристаллизации. Анализируются проблемы в развитии методов получения структурных данных с высоким разрешением для слабоупорядоченных сред и с отсутствием, в связи с этим, точных общепризнанных механизмов как самоорганизации белков в растворах, так и образования белковых кристаллов.

Во второй главе описаны методы и подходы, развитые в настоящей работе, к исследованию взаимодействия белковых молекул в растворе и в монослое, использованные в работе. Для решения поставленных в работе задач был подобран комплекс взаимодополняющих методов, позволяющий проследить переход от монодисперсного раствора белка к образованию прекурсоров будущего кристалла, а затем исследовать структуру кристалла в процессе его роста. Это прежде всего методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейtronов, рентгеноструктурного анализа, методы рентгеновской рефлектометрии и стоячих рентгеновских волн. Указанные методы физического эксперимента хорошо дополнены методами численного моделирования, численными экспериментами.

Третья глава посвящена описанию результатов определения структуры растворов в условиях кристаллизации на примере белка лизоцима и механизмов влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации. Исследовано влияние температуры, концентрации белка, концентрации осадителя и растворителя на количество октамеров и димеров, образующихся в растворе перед началом кристаллизации. Разработан технологический процесс ускоренного подбора условий кристаллизации благодаря установлению взаимосвязи между олигомерным составом кристаллизационного раствора и образованием кристалла.

В четвертой главе представлены результаты исследования роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белка по результатам исследований структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики.

В пятой главе приведены результаты исследования процесса формирования ленгмюровских пленок на основе растворов лизоцима в условиях кристаллизации. Исследование такой модельной системы позволило уточнить степень стабильности промежуточной фазы кристаллизации, а также, на основе метода стоячих рентгеновских волн, определить с ангстремным разрешением положение ионов в структуре и, тем самым, получить важную информацию для определения роли ионов осадителя в образовании такой фазы.

В шестой главе представлены результаты показывающие, что механизм кристаллизации водорастворимых белков включает формирование промежуточной фазы – образование олигомеров – «единиц роста» будущего кристалла за счёт начальной стадии кристаллизации белков протеиназы К и термолизина.

В диссертации получены следующие **основные научные результаты**:

1. Разработан и апробирован подход к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. Разработаны и созданы специализированные измерительные ячейки, позволяющие проводить *in situ* исследования процессов формирования белковых кристаллов и пленок методами рентгеновской рефлектометрии, дифрактометрии, а также методом стоячих рентгеновских волн в области **полного** внешнего отражения в условиях гелиевой атмосферы, специальная микрофлюидная ячейка для проведения исследований методами малоуглового рассеяния. Создан измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре измерительные ячейки.

2. Взаимодополняющими методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов и дифракционными методами в серии экспериментов, выполненных на различных установках (дифрактометр АМУР-К, источники синхротронного излучения КИСИ-Курчатов (ДИКСИ, БиоМУР, РСА, «Белок») и ESRF (BM29 BioSAXS, ID23-1), источник нейтронов ИБР 2 (ЮМО)), установлено, что растворы лизоцима в условиях образования кристаллов тетрагональной сингонии содержат только три компонента – мономеры (от 90 до 96%), димеры (от 1 до 6%) и октамеры (от 3 до 9%).

3. Предложен подход к моделированию механизмов формирования кристаллов, основанный на проведении вычислительного эксперимента методом молекулярной динамики по определению стабильности белковых комплексов с определенной структурой, представляющих собой элемент белкового кристалла, при различных условиях. Рассчитана динамика олигомеров в растворе с осадителем и без. Показано, что в присутствии осадителя стабилен только один из исследуемых типов октамеров (содержащий ось 4-ого порядка), при этом другие типы октамеров, а также тетramerы и гексамеры диссоциируют. В растворе без осадителя все олигомеры нестабильны.

4. Установлено, что концентрация октамеров в растворе лизоцима, содержащего осадитель, растет с увеличением концентрации белка и

осадителя, а также с уменьшением температуры и при замене обычной воды на тяжелую. Показано, что при добавлении хлоридов металлов к раствору лизоцима степень увеличения концентрации октамеров в растворе коррелирует с положением ионов металла в лиотропном ряду.

5. Выращены 5 типов высококачественных кристаллов лизоцима с осадителями LiCl , NaCl , KCl , NiCl_2 , CuCl_2 , с высоким разрешением расшифрована их структура и впервые в мире установлено встраивание ионов осадителя в структуру белковых кристаллов. На основе анализа позиций ионов осадителя в структуре установлено взаимодействие ионов осадителя с молекулами белка. Показано, что ионы осадителя обеспечивают оптимальное распределение поверхностного заряда молекулы лизоцима, приводящее к образованию прекурсоров кристалла – октамеров; определено влияние различных ионов осадителя на равновесную концентрацию и конформационную стабильность октамеров, а также связывание прекурсоров между собой при дальнейшем росте кристаллов.

6. Апробирован подход к исследованию взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя в модельной системе – ленгмюровского монослоя, сформированного на поверхности водной субфазы из кристаллизационного раствора. Показано, что такие монослои и пленки лизоцима имеют толщину, равную диаметру октамера, высокую плотность и однородность. Установлено, что при формировании монослоя ионы осадителя формируют тонкий слой на границе раздела белок/субфаза, при этом структура «слой белка/слой осадителя/субфаза» остается стабильной не менее 12 часов, а также сохраняется при переносе монослоя на твердую подложку.

7. На основе анализа взаимодействий между молекулами протеиназы К в кристалле было предсказано, что наиболее вероятными единицами роста кристалла, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, являются димеры. Методом МУРР подтверждено, что растворы протеиназы К в условиях кристаллизации включают только две компоненты – мономеры и димеры.

8. На основе анализа взаимодействий между молекулами белка в кристалле термолизина сделано предположение, что наиболее вероятными единицами роста кристалла, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, являются димеры и гексамеры. Методом МУРР подтверждено, что растворы термолизина в условиях кристаллизации включают только три компоненты – мономеры, димеры и гексамеры.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием надежного сертифицированного оборудования и

инфраструктуры, включая установки мега-класса: источник синхротронного излучения «КИСИ-Курчатов» (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия), Европейский центр синхротронных исследований (ESRF, Гренобль, Франция) и источник нейтронов ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна, Россия), а также циклом публикаций в данном направлении (в том числе, работами других авторов), в котором последующие исследования опирались на достоверность предыдущих, цитированием работ и всесторонним их обсуждением на ведущих отечественных и международных конференциях, посвященных тематике исследования.

Научная новизна работы

В работе:

- экспериментально подтверждена и уточнена гипотеза о механизмах формирования белковых кристаллов: зарождению и росту кристалла предшествует образование в растворе его строительных элементов – олигомеров определенного типа – 3D-фрагментов кристаллической структуры исследуемого белка;
- для широкого диапазона условий установлено, что при кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии в растворе кроме мономеров присутствуют только димеры и октамеры;
- определены термодинамические параметры промежуточной фазы кристаллизации лизоцима. Показано, что количество октамеров (элементов будущего кристалла) растет при понижении температуры, повышении концентрации белка и осадителя, а также при замене протонированной воды на дейтерированную;
- выявлены особенности расположения ионов осадителя (хлоридов Li, Na, K, Ni, Cu) в кристаллах лизоцима и его строительных элементах (октамерах и димерах) в растворе. Смоделировано влияние ионов, связанных с молекулами белка, на стабильность октамеров и димеров;
- определена структура ленгмюровских слоев, сформированных из кристаллизационного раствора лизоцима, определены принципы взаимодействия таких монослоев с ионами осадителя на границе раздела с водной субфазой. Показана термодинамическая стабильность связи между слоем белковых олигомеров и слоями ионов осадителя (не происходит существенной диффузии ионов осадителя в объем деионизованной воды как минимум в течение суток);
- экспериментально подтверждено предположение о механизме формирования упорядоченных белковых систем, включающем образование промежуточной фазы, на примере других (кроме лизоцима) водорастворимых белков протеиназы К и термолизина;

Базовый инструментарий получения вышеуказанных результатов составил разработанный новый комплексный подход к исследованию структуры и механизмов формирования белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. Разработанный и созданный в рамках работы инструментарий включает:

- измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре специализированные измерительные ячейки, позволяющий проводить исследования с применением рентгеновского и синхротронного излучения, а также оптических методов;
- новый подход к анализу данных по исследованию промежуточной фазы кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейtronов, основанный на использовании моделей олигомеров – элементов кристалла для обработки экспериментальных кривых рассеяния;
- новый подход к моделированию механизмов формирования кристаллов, основанный на проведении методом молекулярной динамики вычислительного эксперимента по определению стабильности белковых комплексов с определенной структурой, представляющих собой элемент белкового кристалла, при различных условиях, а также подход к исследованию роли ионов осадителя в образовании и стабильности таких комплексов;
- новый подход к исследованию роли осадителя и механизмов взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя при формировании кристаллов, основанный на анализе расположения ионов в кристалле белка, структура которого была решена с высоким разрешением;
- новый подход к формированию упорядоченных белковых пленок и исследованию роли ионов осадителя в формировании планарных белковых систем.

Важным достоинством работы является применение целого комплекса взаимодополняющих рентгеновских методов, в особенности, применение метода **стоячих рентгеновских волн** (СРВ) в области полного внешнего отражения в исследованиях тонких белковых пленок как на твердых подложках, так и на поверхности жидкости.

В исследованиях пленок белка из растворов без добавления осадителя и в предкристаллизационной фазе метод СРВ позволил выявить и определить слоистую структуру пленок, обусловленную распределением ионов осадителя в их структуре, что является важным с точки зрения определения

роли осадителя как в процессе формирования упорядоченных планарных систем, так и кристаллов.

Также, методом СРВ было показано, что при переносе ленгмюровского монослоя на твердую подложку слоистая структура пленки сохраняется, и распределение слоев (октамеры лизоцима/катион/анион) не изменяется.

Важно отметить, указанная многослойная структура пленок белка является стабильной, методом СРВ была продемонстрирована стабильность структуры пленок, сформированных из кристаллизационных растворов лизоцима, на поверхности ленгмюровской ванны в течение более 10 часов.

Практическая значимость работы заключается в получении фундаментальных знаний о механизмах самоорганизации белковых молекул, которые позволяют разработать принципиально новые подходы к управляемому получению белковых кристаллов и упорядоченных систем.

На основе полученных в работе фундаментальных результатов по изучению процессов самоорганизации белков предложен инновационный подход к формированию упорядоченных белковых пленок, как основы для создания биоподобных устройств – как биосенсоров (основанных на биохимических процессах в живых организмах), так и элементов биоэлектроники, принцип действия которых приближен к нервной системе.

Предложенный в работе метод ускоренного подбора условий кристаллизации и полученные результаты составляют основу для формирования технологических процессов дизайна и создания новых лекарственных средств, а также ферментов и других макромолекул для сельского хозяйства, промышленной биотехнологии, создания новых материалов.

Предложенный в работе новый комплексный подход, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов, а также молекулярного моделирования, к исследованию механизмов формирования упорядоченных белковых систем позволит сформировать методическую базу метрологии принципиально новых природоподобных технологических процессов.

Разработанный инструментарий и результаты диссертационной работы доведены до уровня, позволяющего использовать их в практике проектных и технологических организаций.

Результаты диссертационной работы были представлены автором и соавторами на многочисленных международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 22 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, имеется 3 патента.

Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии. Автор непосредственно принимала

участие в разработке и изготовлении всех элементов измерительного комплекса, включая создание специальных измерительных ячеек и разработку экспериментальных методик, изготовлении всех изученных образцов – растворов, кристаллов, пленок, а также при их исследовании оптическими методами и методом атомно-силовой микроскопии; в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источниках нейтронов и синхротронного излучения методами малоуглового рассеяния, рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеноструктурного анализа, в обработке полученных данных; в работах по моделированию молекул, их комплексов, а также проведении численных экспериментов методом молекулярной динамики. Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным консультантом и соавторами публикаций.

Как и любая большая работа, диссертация **Дьяковой Юлии Алексеевны** не лишена досадных неточностей, погрешностей замечаний. В представленном отзыве я сделаю три наиболее существенных на мой взгляд замечания:

1. Первая глава, посвященная обзору методов исследования структуры макромолекул и вопросам кристаллизации белковых молекул, на мой взгляд, слишком большая по объему – более 80 стр. из 349 стр. текста диссертации (полный объем диссертации 403стр.). Справедливости ради следует при этом отметить, что написана она очень хорошо и с интересом читается.
2. В работе практически не освещен вопрос касательно временных характеристик образования олигомеров белков в предкристаллизационной фазе;
3. Автором получены белковые пленки из октамеров и отмечается их плотная структура. Однако, к сожалению, не обсуждается взаимодействие между октамерами и их взаимное расположение в структуре пленки.

Все вышеперечисленные замечания носят в основном рекомендательный характер и ни коем случае не снижают ценность выполненных диссертантом работ и не могут существенным образом повлиять на общую, высокую положительную оценку рецензируемой работы.

В заключение считаю важным отметить, что определение структуры и изучение динамики неупорядоченных и слабоупорядоченных систем биомолекул весьма сложная задача и результаты работы Ю.А. Дьяковой представляют собой важный этап для ее решения.

диссертации следует также добавить огромный список цитируемой литературы из 505 наименований.

Дальнейшее развитие представленного в работе подхода к изучению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, механизмов их самоорганизации при формировании упорядоченных систем, с использованием инфраструктуры новых установок класса мегасайенс, таких как XFEL, источников СИ 4-го поколения, проектируемой мегаустановки СИЛА, и новых источников нейтронов, имеет огромные перспективы и важное значение для решения вышеуказанных проблем и развития природоподобных технологий.

Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание диссертационной работы. Публикации автора сделаны в престижных рецензируемых журналах, отраженных в списке ВАК.

На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Ю.А. Дьяковой является законченной и самостоятельно выполненной научно-исследовательской работой, соответствующей всем критериям и требованиям раздела II положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор, Дьякова Юлия Алексеевна, заслуживает присуждения ей ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов.

Отзыв составил **12 ноября 2021 года** официальный оппонент
Суворов Эрнест Витальевич, доктор физико-математических наук,
профессор, главный научный сотрудник Лаборатории структурных
исследований (ЛСИ) Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института физики твердого тела имени Ю.А. Осипьяна
Российской академии наук (ИФТТ РАН).

Адрес организации: 142432, Россия, Московская обл., г. Черноголовка, ул.

Академика Осипьяна, д. 2, ИФТТ РАН;

Телефон: 8 (496) 522 8403;

Электронная почта: suvorov@issp.ac.ru

Согласен на обработку персональных данных

Суворов Э.В.

Подпись официального оппонента Суворова Эрнеста Витальевича заверяю

Ученый секретарь ИФТТ РАН
кандидат физ.-мат. наук
Терещенко Алексей Николаевич

