

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора,

доктор биологических наук


Р.А. Максютков

« 11 » мая 2021 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации 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 Юлии Алексеевны Дьяковой посвящена изучению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, механизмов их самоорганизации при формировании упорядоченных систем. Для изучения таких закономерностей в работе был разработан и апробирован новый подход к исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, включая адаптацию и применение ряда синхротронных и нейтронных методов, методов молекулярного моделирования, молекулярной динамики и создание специализированного инструментария.

Белки играют ключевую роль во всех жизненно важных физиологических процессах организмов: работают как катализаторы, как структурные элементы, передают сигналы и так далее. Функция белка определяется его пространственной структурой.

Стабильность белков в растворе определяется его взаимодействиями с молекулами воды, а также ионами и другими молекулами, находящимися в растворителе. Знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде, а также для управления их стабильностью при исследовании и биотехнологическом использовании белков.

Сегодня 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 - рациональной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленности.

В настоящее время наиболее эффективным методом определения трехмерной структуры биомолекул с высоким разрешением является метод рентгеноструктурного анализа (РСА). Этим методом получено подавляющее большинство структур в международной базе данных PDB.

Метод РСА основан 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 определения структуры белков методом РСА после получения и очистки достаточного количества белка остается поиск условий кристаллизации, который сегодня производится методом проб и ошибок. При этом для оценки результата образования кристалла может потребоваться от нескольких часов до нескольких месяцев.

Решение вышеуказанных проблем требует разработки новых методов и подходов к исследованию взаимодействия белковых молекул и систематического изучения механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы.

Такие подходы и методы должны обеспечить определение с высоким пространственным разрешением структуры не только кристаллов, но и слабоупорядоченных систем, включая растворы, в условиях, максимально приближенных к естественным.

Для эффективного решения данной задачи необходимо 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, знание фундаментальных основ взаимодействия белковых молекул и механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы, основанное на применении вышеуказанного инструментария, необходимо для решения широкого спектра актуальных технологических задач – ускоренного дизайна лекарственных препаратов и методов

диагностики, разработки новых биотехнологий, подходов к обеспечению биобезопасности. Кроме того, понимание принципов взаимодействия и самоорганизации белков открывает возможности для разработки принципиально новых природоподобных технологий. По вышеуказанным причинам актуальность диссертационной работы Дьяковой Ю.А. не вызывает сомнений.

Научная новизна диссертационной работы Ю.А. Дьяковой в том, что в работе впервые были получены следующие фундаментальные данные о механизмах формирования белковых кристаллов и пленок:

- 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 оригинальный 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, и позволяющий проводить исследования с применением рентгеновского и синхротронного излучения, а также оптических методов;

- новый подход к анализу экспериментальных данных исследования промежуточной фазы кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, 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;

- 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.

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.

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 оригинальный комплекс взаимодополняющих методов, позволяющий проследить переход от монодисперсного раствора белка к образованию прекурсоров будущего кристалла, а затем исследовать структуру кристалла в процессе его роста.

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. Установление взаимосвязи между олигомерным составом кристаллизационного раствора и образованием кристалла позволило разработать технологический процесс ускоренного подбора условий кристаллизации.

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 и роль ионов осадителя в образовании такой фазы.

В шестой главе представлены результаты верификации предположения о том, что механизм кристаллизации водорастворимых белков включает формирование промежуточной фазы – образование олигомеров – «единиц роста» будущего кристалла посредством изучения 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, а также 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 тетрамеры 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 иона металла в лиотропном ряду.

5. На основе анализа структуры кристаллов лизоцима, полученных при использовании в качестве осадителя хлоридов различных металлов, установлено взаимодействие ионов осадителя и 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 этого белка, 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 термолизина, 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.

По диссертации Дьяковой Ю.А. можно сделать следующие **замечания**:

1. Разработанные методы пока что были применены только к нескольким белкам, хотелось бы увидеть результаты для большего количества объектов.
2. В работе не хватает представления полученных автором фундаментальные результатов по механизмам самоорганизации белковых молекул в виде кинетических и термодинамических формул.

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

Необходимо отметить **личный вклад** соискателя. 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.

Материал диссертации изложен весьма четко и последовательно. Наглядные рисунки, графики и таблицы хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Диссертация представляет собой цельную, завершенную исследовательскую работу на актуальную тему и обладает существенной **практической значимостью**, которая состоит в следующем.

Полученные в работе фундаментальные знания о механизмах самоорганизации белковых молекул позволят 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. Внедрение этого метода в научных организациях позволит ускорить исследования по целому спектру биотехнологических задач.

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.

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.

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.

Диссертационная работа Ю.А. Дьяковой является цельным завершенным научным исследованием, полностью соответствует 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.

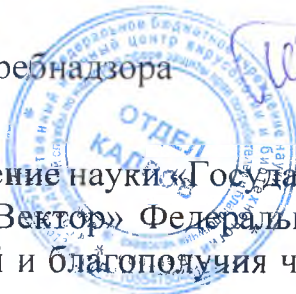
Отзыв на диссертационную работу Ю.А. Дьяковой «Самоорганизация белковых молекул при формировании кристаллов и пленок» обсужден и принят на заседании Ученого совета Федерального Бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (Протокол № 9 от 11.11.2021 г.).

Доктор технических наук,
заведующий отделом
биофизики и экологических исследований,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел.: +7(383)363-47-00
e-mail: safatov@vector.nsc.ru



А.С. Сафатов

Подпись А.С. Сафатова заверяю
Начальник отдела кадров
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора



И.В. Ильин

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)
630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,
Тел: +7(383)363-47-00
e-mail: vector@vector.nsc.ru