

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.114.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТОНИКА»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ ДЯКОВОЙ ЮЛИИ
АЛЕКСЕЕВНЫ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА ФИЗИКО-
МАТЕМАТИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 30 ноября 2021 г., протокол № 9

О присуждении **Дьяковой Юлии Алексеевны**, гражданину Российской Федерации, учёной степени доктора физико-математических наук.

Диссертация «Самоорганизация белковых молекул при формировании кристаллов и пленок» по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов» принята к защите 20.07.2021 г., протокол № 6, Диссертационным советом Д 002.114.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук» (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Минобрнауки России), 119333, г. Москва, Ленинский проспект, дом 59. Диссертационный совет Д 002.114.01 создан приказом Федеральной службы по надзору в сфере образования и науки № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Дьякова Юлия Алексеевна, 1985 г.р., в 2015 году успешно защитила диссертацию «Комплексное исследование структуры монослоев порфирина-фуллереновых диад» на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов» в Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН. В настоящее время Ю.А. Дьякова работает в должности первого заместителя директора НИЦ "Курчатовский институт" по науке.

Диссертационная работа была выполнена в Курчатовском комплексе НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт». Исследовательская работа проводилась в период с 2015 по 2020 годы. Часть экспериментов была проведена совместно с Институтом кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН (ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН).

Научный консультант – Ковальчук Михаил Валентинович, доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, президент НИЦ «Курчатовский институт».

Официальные оппоненты:

Авдеев Михаил Васильевич, доктор физико-математических наук, начальник сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований;

Макаров Александр Александрович, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;

Суворов Эрнест Витальевич, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований Института физики твердого тела РАН;

— дали **положительные отзывы** на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (Новосибирская обл., р.п. Кольцово) в своём

положительном отзыве, подписанном А.С. Сафатовым, д.т.н., заведующим отделом биофизики и экологических исследований, И.В. Ильиным, начальником отдела кадров, и утверждённом генеральным директором ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора – д.б.н. Р.А. Максютковым, указала, что материал диссертационной работы «Самоорганизация белковых молекул при формировании кристаллов и пленок» изложен весьма четко и последовательно. Наглядные рисунки, графики и таблицы хорошо иллюстрируют полученные автором результаты. Отмечается, что стабильность белков в растворе определяется их 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. Диссертация посвящена изучению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, механизмов их самоорганизации при формировании упорядоченных систем, представляет собой цельную, завершённую исследовательскую работу на актуальную тему и обладает существенной практической значимостью. Полученные результаты отличаются научной новизной и практической ценностью, достоверностью и обоснованностью. Результаты диссертационной работы были представлены автором и соавторами на многочисленных международных и российских научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 22 публикации в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК, имеется 3 патента. Диссертационная работа Ю.А. Дьяковой является цельным завершённым 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.

Основные результаты по теме диссертации отражены в 22 публикациях в отечественных и международных журналах, входящих в утверждённый ВАК перечень ведущих рецензируемых научных изданий, 19 статьях в журналах и тезисах к 42 докладам на российских и международных научных конференциях.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, В.В. Волков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование условий образования единиц роста белкового кристалла в растворах лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей» // Кристаллография, 2017, том 62, № 3, с. 364–369.

2. A.S. Boikova, **Y.A. Dyakova**, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, A.I. Kuklin, M.A. Marchenkova, B.V. Nabatov, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevskya, M.V. Kovalchuk «Octamer formation in lysozyme solutions at the initial crystallization stage detected by small-angle neutron scattering» // Acta Cryst., D73, 2017, P. 591-599.

3. M.V. Kovalchuk, A.E. Blagov, **Yu.A. Dyakova**, A.Yu. Gruzinov, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskiy, V.I. Timofeev and V.V. Volkov, «Investigation of the initial crystallization stage in lysozyme solutions by small-angle X-ray scattering». Crystal Growth & Design. 2016. 16 (4). P. 1792.

4. **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, «Создание частично упорядоченных органических планарных систем на основе *in situ* контроля их структурной организации», Кристаллография, 2016, Т. 61, № 5, С. 718–735.

5. M.V. Kovalchuk, A.S. Boikova, **Y.A. Dyakova**, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, M.A. Marchenkova, Y.V. Pisarevsky, V.I. Timofeev «Pre-crystallization phase formation of thermolysin hexamers in solution close to crystallization conditions» Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2019, V. 37(12), P. 3058-3064.

6. М.В. Ковальчук, А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П. В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский «Исследование предкристаллизационной стадии раствора (влияния температуры и типа осадителя) протеиназы к методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения» Кристаллография 2018т.63 № 6, с. 857-862

7. Ю.В. Кордонская, В.И. Тимофеев, **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, Д. Подшивалов, М.В. Ковальчук «Исследование поведения олигомеров белка лизоцима, образующихся в растворах на ранней стадии кристаллизации методом молекулярной динамики.» Кристаллография 2018 Т 63 №6, с. 902-905.

8. **Ю.А. Дьякова**, А.С. Бойкова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, В.И. Тимофеев, М.В. Ковальчук «Исследование влияния иона осадителя на образование олигомеров в кристаллизационных растворах белка лизоцима», Кристаллография 2019 64 №1, с. 15-19

9. M.A. Marchenkova, P.V. Konarev, T.V. Rakitina, V.I. Timofeev, A.S. Boikova, **Yu.A. Dyakova**, K.B. Ilina, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk. «Dodecamers derived from the crystal structure were found in the pre-crystallization solution of the transaminase from the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum* by small-angle X-ray scattering», Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2020, V. 38(10), P. 2939-2944.

10. Y.V. Kordonskaya, M.A. Marchenkova, V.I. Timofeev, **Y.A. Dyakova**, Y.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk, «Precipitant ions influence on lysozyme oligomers stability investigated by molecular dynamics simulation at different temperatures» Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, Published online: 08 Aug 2020. DOI: 10.1080/07391102.2020.1803138.

На диссертацию и автореферат поступило **8 положительных отзывов**.

Квардаков Владимир Валентинович, член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук, заместитель председателя совета Российского фонда фундаментальных исследований, пожелал автору в качестве **рекомендации** активнее использовать возможности рентгеновского лазера на свободных электронах, например, для исследования формирования найденных в работе олигомеров - прекурсоров кристалла. Это позволило бы исследовать ранние стадии образования олигомеров с высоким временным разрешением.

Колчанов Николай Александрович, академик РАН, д.б.н., профессор, научный руководитель Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН), заведующий Отделом системной биологии ИЦиГ СО РАН, прислал отзыв **без замечаний**.

Кульчин Юрий Николаевич, д.ф.-м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института автоматики и процессов управления Дальневосточного отделения Российской академии наук, отметил в качестве **замечания/ пожелания**, что в диссертации было бы полезным распространить, предложенный в диссертации подход к исследованию механизмов самоорганизации биосистем, для исследования других слабоупорядоченных систем, в частности, процессов биоминерализации.

Сарапульцева Елена Игоревна, д.б.н., профессор, профессор отделения биотехнологий инженерно-физического института биомедицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский ядерный

университет "МИФИ", прислала отзыв **без замечаний**.

Попов Владимир Олегович, д.х.н., профессор, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук", прислал отзыв **без замечаний**.

Кучерка Норберт, д.ф.-м.н., заместитель директора лаборатории по научной работе Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка Международной межправительственной организации Объединённый институт ядерных исследований, отметил в качестве **замечаний** следующее:

1) Автором отмечено присутствие в растворе специфических олигомеров (димеров и октамеров) белков лизоцима, которые предшествуют кристаллизации. Структурная специфика этих олигомеров видимо способствует зарождению и росту кристаллов. Одновременно, результаты показывают полное отсутствие иных олигомеров (тетрамеров, гексамеров в частности). В чем заключается специфика димеров и октамеров, которая позволяет их образованию в растворе, а не позволяет формированию тетрамеров и гексамеров?

2) Применение тяжелой воды (D_2O) в подготовке раствора показало ее существенное влияние на процесс и условия кристаллизации. Можно обосновать в чем именно заключается различие между взаимодействием молекул белка и протонированной или дейтерированной водой?

3) Данная работа представляет собой полный рецепт кристаллизации лизоцима с определением закономерностей механизмов данного процесса. Насколько применяемыми являются результаты в случае других белков и процессов кристаллизации в целом?

Панченко Владислав Яковлевич, д.ф.-м.н., профессор, академик РАН, председатель совета Российского фонда фундаментальных исследований, прислал отзыв **без замечаний**.

Итальянцев Александр Георгиевич, д.ф.-м.н., начальник отдела акционерного общества "Научно-исследовательский институт молекулярной электроники", отметил в качестве пожеланий, что можно указать на более широкое представление в автореферате первичных результатов современных разноплановых инструментальных методов, использованных в работе. В качестве таковых могли бы выступать, например рентгеновские топограммы, кривые качания, подтверждающие получение кристаллических структур в их классическом понимании как структур с дальним порядком, воспроизводимом трансляцией.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются ведущими специалистами в области молекулярной биологии, рентгеновских и нейтронных методов исследования структуры кристаллов и некристаллических материалов, а ведущая организация является одним из лидеров в области биотехнологии и вирусологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан и апробирован подход к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. **Разработан и создан** измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре 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. 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%). **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. **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. На основе анализа структуры кристаллов лизоцима, полученных при использовании в качестве осадителя хлоридов различных металлов, **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. **Апробирован** подход к исследованию взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя в модельной системе – лентмюровского 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. 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. На основе анализа взаимодействий между молекулами белка в кристалле термолизина **предсказано**, 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 компонента – мономеры, димеры и гексамеры.

Значение полученных соискателем результатов исследований для практики подтверждается тем, что 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 новый 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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: 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.

Личный вклад соискателя состоит в следующем. 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 их исследованию оптическими методами и методом атомно-силовой микроскопии; в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источнике нейтронов и источниках синхротронного излучения методами малоуглового рассеяния, рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеноструктурного анализа и 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.

Диссертация решает основной вопрос поставленной научной проблемы – изучение 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, молекулярное моделирование и создание специализированного инструментария.

Знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде и определения фундаментальных принципов работы «молекулярных машин».

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

Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, полностью соответствующую критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней, утверждённым постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 (в действующей редакции).

На заседании 30 ноября 2021 года диссертационный совет принял решение присудить Дьяковой Юлии Алексеевне ученую степень доктора физико-математических наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов».

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 01.04.18 – «кристаллография, физика кристаллов», участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 15, против – 1, недействительных бюллетеней – 1.

Заместитель председателя диссертационного совета,
доктор физико-математических наук

В.М. Каневский

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

К.В. Фролов

«30» ноября 2021 г.

Ученый секретарь
ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН
к.ф.-м.н.



Л.А. Дадинова