

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 Ю.А. посвящена изучению взаимодействия белковых макромолекул друг с другом и с неорганическими ионами в пересыщенных растворах при образовании кристаллов белков и белковых пленок.

Белки играют одну из ключевых ролей в функционировании биологических сред. Их исследование занимает важнейшее место в науке. Несмотря на громадные успехи в этой области, актуальной задачей в настоящее время остается получение структурных данных на атомарном уровне. При кристаллизации белковых макромолекул такие данные сравнительно просто получают с использованием преимущественно рентгеноструктурной дифракции. Однако до сих пор имеются большие пробелы в понимании механизмов кристаллизации, и, прежде всего, это относится к механизмам самоорганизации белковых молекул в кристаллизационных растворах. В этой связи работа Ю.А.Дьяковой, в которой обобщена обширная информации о взаимодействии белковых молекул в растворах при кристаллизации и образовании белковых пленок, **является весьма актуальной.**

Для изучения фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, в том числе механизмов их самоорганизации при формировании упорядоченных систем Дьяковой Ю.А. 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 специализированных экспериментальных устройств.

В настоящее время наиболее эффективным методом определения трехмерной структуры биомолекул с высоким разрешением является метод рентгеноструктурного анализа (РСА). Этим методом получено более 85% структур в международной базе данных. В то же время доля белков, для которых определена трехмерная структура, составляет проценты от общего количества известных белков.

Основным «узким» местом определения структуры белков методом РСА, как совершенно правильно отмечено в диссертации, 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. Нерешенным также остается вопрос соответствия структуры белков и их комплексов с молекулами субстрата в физиологических условиях функционирования, структуре белков в кристалле. Работа Ю. А. Дьяковой представляет важный этап в преодолении указанных трудностей

Все полученные в исследовании Дьяковой Ю.А. данные являются оригинальными и актуальными, а также закладывают основу для дальнейшего усовершенствования подходов к конструированию функциональных биологических и гибридных систем на атомно-молекулярном уровне.

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 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 и кристаллов лизоцима, включая моделирование 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 – олигомеров, которые можно считать «единицами роста» будущего кристалла. Соответствующие исследования проведены для начальной стадия кристаллизации белков протеиназы К и термолизина.

В качестве **основных результатов** работы можно выделить следующие заключения:

1. Разработанные и созданные специализированные измерительные ячейки для *in situ* исследования процессов формирования белковых кристаллов и пленок методами рентгеновской рефлектометрии, дифрактометрии, малоуглового рассеяния, а также методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения, позволили получить уникальную информацию, которая дает существенное продвижение в понимании механизмов организации и структуры слабоупорядоченных белковых систем. Создан измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий в себя четыре измерительные ячейки.

2. С помощью комплексного подхода, объединяющего методы рассеяния (малоугловое рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов, рентгеноструктурная дифракция) и молекулярной динамики изучены предкристаллизационные фазы в растворах ряда белков. Так, для растворов лизоцима в условиях образования кристаллов тетрагональной сингонии определены относительные доли мономеров, димеров, октамеров и их изменения в зависимости от концентрации белка и осадителя, температуры, а также 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 данных молекулярной динамики показано, что в присутствии осадителя стабилен только один из исследуемых типов октамеров. Для

молекул протеиназы К предсказано и подтверждено экспериментально, что наиболее вероятными единицами роста кристалла, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, являются димеры. Для термолизина – это димеры и гексамеры. Методом МУРР подтверждено, что растворы термолизина в условиях кристаллизации включают только три компоненты – мономеры, димеры и гексамеры.

3. Проведены обширные исследования эффектов, связанных с взаимодействием ионов осадителя с молекулами белка в объеме и на границе раздела. Так, впервые определено, что ионы осадителя встраиваются в структуру кристаллов белков. Показано, что ионы осадителей (хлориды различных металлов) 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. Для ленгмюровских пленок лизоцима, сформированных на поверхности водной субфазы из кристаллизационного раствора, обнаружено, что они имеют высокую плотность и однородность, а толщина согласуется с размером октамера. Также выявлен тонкий слой на границе раздела белок/субфаза. Важно, что структура «слой белка/слой осадителя/субфаза» стабильна и сохраняется при переносе монослоя на твердую подложку.

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). При этом использованные методы позволяли осуществлять взаимную проверку. Достоверность также подтверждается согласованием опубликованных работ как с участием Ю.А.Дьяковой, так и работами других авторов, а также обсуждением полученных результатов на ведущих отечественных и международных конференциях, посвященных тематике исследования.

В качестве **научной новизны** можно выделить несколько основных пунктов:

- Экспериментально подтверждена гипотеза о существовании предкристаллизационной фазы в кристаллизационных растворах белков, которая представляет собой набор олигомеров – фрагментов кристаллической структуры белка. По сути, для растворов лизоцима построена фазовая диаграмма предкристаллизационной стадии – распределение по олигомерам в

зависимости от концентраций белка и осадителя, а также температуры. Для данной стадии исследован изотоп-эффект замены легкой воды на тяжелую.

- Выявлены особенности расположения ионов осадителя (хлоридов металлов) в кристаллах лизоцима и его олигомерах (октамерах и димерах) в кристаллизационном растворе. Смоделировано влияние ионов, связанных с молекулами белка, на стабильность олигомеров.

- 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.

- С методической точки зрения предложен новый комплексный подход к исследованию структуры и механизмов формирования белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования, который включает в себя: i) измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии; ii) анализ промежуточной фазы кристаллизации, основанный на использовании моделей олигомеров; iii) моделирование механизмов формирования кристаллов; iv) формирование и анализ упорядоченных белковых пленок и механизмов формирования планарных белковых систем.

Практическая значимость работы заключена в том, что полученные в работе знания фундаментального характера о механизмах самоорганизации белковых молекул позволяют говорить о принципиально новых подходах к управляемому получению кристаллов и упорядоченных систем с белками. Предложенный и апробированный в работе метод ускоренного подбора условий кристаллизации 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 биоматериалов.

Также предложенный инновационный подход к формированию упорядоченных белковых пленок может служить основой для создания биоподобных устройств, таких как биосенсоры (использующие биохимические процессы аналогично живым организмам) и элементы биоэлектроники (принцип действия которых приближен, например, к нервной системе).

Несомненно, практической ценностью обладает и сам используемый в работе комплексный исследовательский подход, который может быть легко расширен на другие области. Во-первых, совместное применение

синхротронных и нейтронных методов, а также молекулярного моделирования, к исследованию механизмов формирования упорядоченных белковых систем представляет, по сути, методическую базу метрологии принципиально новых природоподобных технологических процессов. Во-вторых, доступен многоцелевой исследовательский инструментарий, а результаты 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.

Личный вклад диссертанта не вызывает сомнений. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии. В диссертации продемонстрировано, что автор является высококлассным специалистом во всех используемых методиках, начиная с разработки и создания специальных измерительных ячеек и пробоподготовки, и заканчивая проведением и интерпретации данных экспериментов на источниках нейтронов и синхротронного излучения по малоугловому рассеянию, рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеноструктурного анализа.

Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным консультантом и соавторами публикаций.

Стиль изложения диссертации четкий и ясный. Диссертация оформлена в соответствии с требованиями ВАК.

К работе имеются **замечания**:

1. В диссертации весьма широко применяются рентгеновские и синхротронные методы исследования, в то время как нейтронное излучение применяется только в методе малоуглового рассеяния (МУРН) при изучении структуры растворов белков. Недостаточное использование возможностей нейтронов проявилось в результатах исследований пленок и кристаллов, где остались неясными позиции ряда легких атомов.

2. В работе не обсуждается латеральная структура (степень упорядоченности) белковых пленок, что важно для их использования в качестве датчиков. Адаптация предложенных в работе подходов к исследованию механизмов организации белковых молекул с привлечением нейтронных методов на этапах исследования кристаллических фаз и планарных систем, в том числе на поверхности жидкости, позволит получить

дополнительные данные и важные результаты для более глубокого понимания физики процессов образования кристаллов.

Приведенные замечания не снижают общей высокой оценки диссертации, ее фундаментальности и научной значимости.

Автореферат диссертации кратко и, в то же время, достаточно полно отражает содержание диссертационной работы. Результаты работы опубликованы в престижных рецензируемых журналах из списка ВАК.

На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Ю.А. Дьяковой представляет собой завершенную научную исследовательскую работу, соответствующую 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.

Официальный оппонент,

Авдеев Михаил Васильевич



08.11.2021

Доктор физико-математических наук,

Начальник сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка, Международной межправительственной организации Объединенный институт ядерных исследований (ЛНФ ОИЯИ)

141980, Московская обл., г. Дубна, ул. Жолио-Кюри, 6

Тел.: 8(496) 2162674

e-mail: avd@nf.jinr.ru

Согласен на обработку персональных данных

08.11.2021

Подпись Авдеева М.В. заверяю

Ученый секретарь ЛНФ ОИЯИ



Д.Худоба

