

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 изучению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, механизмов их самоорганизации при формировании упорядоченных систем. В работе автором был разработан и апробирован новый подход к исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, в том числе с использованием синхротронных и нейтронных методов, а также создан уникальный специализированный инструментальный комплекс (включая разработку и создание, как оригинальных методик, так и специализированных измерительных ячеек), позволивший получить принципиально новую информацию о процессах кристаллизации белков и формирования белковых пленок.

Актуальность темы выполненной работы

Белки играют ключевую роль во всех жизненно важных физиологических процессах организмов. Информация о трехмерной структуре белков и их комплексов имеет не только фундаментальное значение для исследования механизмов функционирования живых организмов и вирусов, но и уже является неотъемлемой частью технологических процессов - дизайна и ускоренной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, биоэнергетики и др.

В настоящее время наиболее эффективным методом определения трехмерной структуры биомолекул с высоким разрешением является метод рентгеноструктурного анализа (РСА). Метод РСА основан на получении дифракционной картины от кристалла белка. При этом, с учетом развития методов генерации синхротронного излучения, основным «узким» местом определения структуры белков методом РСА остается поиск условий кристаллизации, что может занимать месяцы и годы, а в некоторых случаях даже не приводить к успеху.

Особенно слабо изучена структура комплексов в кристаллизационных растворах. Поэтому знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно не только для задач кристаллизации,

но и для понимания функционирования белков в нативной среде, а также разработки технологий использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

Решение вышеуказанных проблем требует разработки новых методов и подходов к исследованию взаимодействия белковых молекул и механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы. Такие подходы и методы должны обеспечить определение с высоким пространственным разрешением структуры не только кристаллов белков, но и их комплексов в растворах и пленках.

С учетом вышеизложенного актуальность диссертационной работы Дьяковой Ю.А. не вызывает сомнений. Пионерские результаты, полученные в работе, формируют значимый задел как для решения технологических задач сегодняшнего дня – ускоренного дизайна лекарственных препаратов и методов диагностики и пр., так и для создания принципиально новых природоподобных технологий.

Структура и объем диссертации

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 к исследованию взаимодействия белковых молекул в растворе и в монослое, использованные в работе. Для решения поставленных в работе задач был сформирован 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 определению роли термодинамических параметров в механизме кристаллизации белка на примере лизоцима, основанному на результатах исследования структуры растворов в условиях 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 определена роль ионов осадителя в механизме кристаллизации белка, на основе результатов исследований структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики элементов кристалла.

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.

Научная новизна работы

В данной диссертационной работе впервые показано, что зарождению и росту кристалла предшествует образование в растворе 3D-фрагментов кристаллической структуры исследуемого белка – олигомеров.

На примере лизоцима в широком диапазоне условий показано присутствие димеров и октамеров и определены термодинамические параметры из образования, а также зависимость от температуры, концентрации белка и типа воды. Выявлены особенности расположения ионов осадителя (хлоридов Li, Na, K, Ni, Cu) в кристаллах лизоцима и его «строительных единицах», определена структура ленгмюровских слоев, сформированных из кристаллизационного раствора лизоцима, определены принципы взаимодействия таких монослоев с ионами осадителя. Показана термодинамическая стабильность связывания слоя белковых олигомеров и ионов осадителя.

На примере протеиназы К и термолизина показано формирование белковых кристаллов через образование промежуточной фазы на примере других (кроме лизоцима) водорастворимых белков.

В работе предложен новый комплексный подход к исследованию структуры и механизмов формирования упорядоченных белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования, включающий измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии с применением синхротронного излучения и оптических методов, в том числе четыре оригинальные специализированные измерительные ячейки; новый метод

анализа данных по исследованию промежуточной фазы кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, основанный на использовании моделей олигомеров – элементов кристалла, в том числе с помощью молекулярной динамики. Кроме того, предложен новый подход к исследованию роли осадителя при формировании кристаллов и упорядоченных пленок, основанный на анализе расположения ионов осадителя.

Практическая значимость работы

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 результатов исследования 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.

Разработанный в рамках диссертации метод ускоренного подбора условий кристаллизации составит основу для формирования технологических процессов ускоренного и сверхточного дизайна новых средств диагностики и терапии в медицине и сельском хозяйстве, а также будет востребован для решения задач промышленной биотехнологии и создания новых biomaterialов и биосистем на молекулярном уровне.

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

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

Достоверность полученных результатов

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). Достоверность вычислительных экспериментов подтверждается использованием международных признанных алгоритмов вычислений методом молекулярной динамики. Результаты изложены в цикле публикаций в данном направлении, 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.

Замечания

Рецензируемая диссертация не лишена определенных недостатков или замечаний. Приведу основные, на мой взгляд, замечания:

1. В работе недостаточно проанализирована применимость развитых подходов к различным классам белков. Также представляется целесообразным расширить перечень белков для дальнейшего системного изучения закономерностей кристаллизации.

2. Представляется целесообразным применить времяразрешающие методы (например, с использованием возможностей рентгеновского лазера на свободных электронах) для определения механизмов на начальной стадии кристаллизации с фемтосекундным разрешением.

3. Важным развитием работы представляется апробация разработанного в диссертации подхода к исследованию механизмов взаимодействия максимально приближенных по составу к биологическим жидкостям.

4. Также представляется целесообразным расширить предложенные в диссертации подходы в целях детального изучения взаимодействия ферментов с нуклеиновыми кислотами.

Все вышеперечисленные замечания носят в целом рекомендательный характер и ни в коем случае не снижают ценность выполненных диссертантом работ и не снижают высокую положительную оценку рецензируемой работы.

Заключение

Автореферат диссертации достаточно полно отражает содержание диссертационной работы. Публикации автора сделаны в рецензируемых журналах, отраженных в списке ВАКа, в том числе в высокорейтинговых.

Пионерские работы Ю.А. Дьяковой по развитию и апробации нового подхода к исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, включая адаптацию и применение ряда синхротронных и нейтронных методов, методов молекулярного моделирования, молекулярной динамики и создания специализированного инструментария, заложили основу для развития важного научного направления, связанного с выявлением фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул и их самоорганизации, изучением принципов метаболизма живой клетки и работы ее молекулярных компонент, а также с исследованием возможностей использования данных принципов в различных сферах: от биотехнологии и медицины до биоэлектроники. Все результаты, представленные в работе, получены автором лично или при ее непосредственном участии.

На основании всего вышеизложенного считаю, что 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.

Официальный оппонент

Макаров Александр Александрович,
научный руководитель Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук (ИМБ РАН),
доктор биологических наук, профессор, академик РАН



119991, Москва, ул. Вавилова, 32

8(499)135-2311,

08.11.2021г.

Согласен на обработку персональных данных.

Подпись д.б.н., академика РАН Макарова А.А.

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ИМБ РАН

к.в.н. Бочаров А.А.

