ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

Конарев Петр Валерьевич

РАЗВИТИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДАННЫХ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ МНОГОКОМПОНЕНТНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ СИСТЕМАМИ

Специальность 1.3.8 - «Физика конденсированного состояния»

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук

Москва 2023

Работа выполнена в лаборатории рефлектометрии и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук».

Научный Волков Владимир Владимирович, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории рефлектометрии и малоуглового рассеяния Института кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Официальные оппоненты: Озерин Александр Никифорович, доктор химических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, заведующий отделом полимерных конструкционных материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук (ИСПМ РАН).

> Ефремов Роберт Гербертович, доктор физикоматематических наук, профессор, заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

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

Ведущая Федеральное государственное автономное образовательное организация: учреждение высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (НИЯУ МИФИ).

Защита состоится « 21 » мая 2024 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.136.01 (Д 002.100.02) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт физики твердого тела имени Ю. А. Осипьяна Российской академии наук (ИФТТ РАН), расположенном по адресу: 142432, г. Черноголовка, ул. Академика Осипьяна, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФТТ РАН и на сайте диссертационного совета при ИФТТ РАН по ссылке: http://www.issp.ac.ru/main/dis-council.html

Автореферат разослан «____» ____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.136.01 (Д 002.100.02), Доктор физико-математических наук

Гаврилов С.С.© Конарев П.В.© ИФТТ РАН, 2023

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В настоящее время большую роль в практических разработках новых функциональных материалов и лекарственных препаратов играют структурные методы исследования вещества, среди которых особо следует отметить рентгеновскую дифракцию и малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР). Метод МУРР позволяет изучать неупорядоченные образцы различной природы с размерами частиц от 1 до 200 нм и более. Это и биологические системы (растворы белков и их комплексов, пептиды и нуклеиновые кислоты), полимеры, композитные наноматериалы, коллоидные растворы, микроэмульсии, минералы и металлические наночастицы. Благодаря доступности источников рентгеновского излучения высокой яркости и развитию методов анализа и интерпретации данных в последние десятилетия, метод МУРР стал стандартным инструментом исследования структур для биологов и биохимиков. Размер макромолекул, которые можно анализировать, варьируется от небольших пептидов или фрагментов нуклеиновых кислот до больших комплексов с молекулярным весом более мегадальтона или даже целых вирусов. Важным преимуществом метода МУРР по сравнению с другими структурными методами является его неразрушающая природа и относительная простота подготовки образцов. Таким образом, биологические образцы можно изучать при физиологических условиях, или близких к естественным, а также изучать изменения структуры в зависимости от физико-химических условий среды (рН раствора, температура, концентрация образца, состав буферного раствора, добавление соли или лиганда и т.д.). Поэтому, биологических МУРР исследования макромолекул с помощью метода представляют особую важность для диагностики и лечения болезней в медицине и фармацевтике, а также создания новых функциональных биоматериалов, используемых в промышленности.

Однако, тот факт, что подготовка образца для измерений методом МУРР относительно проста по сравнению с другими структурными методами не означает отсутствие каких-либо критериев, которым должен соответствовать образец. Одним из требований является монодисперсность образца, когда в растворе находятся только одинаковые макромолекулы. Для таких систем разработаны надежные *ab initio* методы определения пространственной формы однородных частиц с разрешением 1-2 нм, основывающиеся исключительно на использовании экспериментальных данных МУРР. В то же время, для макромолекулярных комплексов с неоднородной электронной плотностью (например, комплексов белок/нуклеиновая кислота) требуется дополнительная информация, которую можно получить либо путем проведения измерений для неполных (парциальных) суб-комплексов, либо с помощью метода вариации контраста с использованием малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН). В настоящей работе уделено особое

внимание возможностям и ограничениям итерационных алгоритмов восстановления электронной плотности (формы частиц) для неоднородных макромолекулярных комплексов.

Проведение измерений МУРР в растворе ограничивает пространственное разрешение *ab initio* моделей. Случайная ориентация частиц в растворе приводит к изотропному рассеянию, это позволяет проводить азимутальное усреднение регистрируемого изображения на двумерном детекторе, но одновременно приводит к потере существенной части информации. Поэтому восстановление 3Dмодели по одномерной кривой малоуглового рассеяния в общем случае является неоднозначной процедурой. В этой связи особую важность приобретает оценка оптимального углового диапазона экспериментальных данных МУРР, в настоящей работе был разработан и предложен новый автоматизированный алгоритм определения оптимального углового диапазона регистрации использованием теоремы Котельникова-Шеннона для разбавленных монодисперсных систем, позволяющий добиться более надежной оценки интегральных структурных параметров частиц (таких как гидратированный объем частицы и молекулярная масса), что, в свою очередь, улучшает эффективность работы алгоритмов восстановления 3D формы частицы.

До недавнего времени анализ полидисперсных многокомпонентных систем по данным МУРР был существенным образом ограничен и позволял оценивать лишь общие структурные характеристики, усредненные по ансамблю частиц. Однако, недавние достижения в разработке программ анализа данных позволили гораздо более осмысленно исследовать сложные полидисперсные системы, представляющие собой белковые или липидные многокомпонентные смеси. При известных кривых рассеяния OT каждого макромолекулярного наличии компонента, можно определять их объемные доли в общей смеси. Если структуру компонентов можно аппроксимировать простыми геометрическими телами, то помимо определения объемных долей компонент появилась возможность оценивать функции распределения частиц по размерам и характер их межчастичного взаимодействия в случае концентрированных систем. Для систем многокомпонентных помимо определения функции липидных распределения везикул по размерам, проводят восстановление электронной плотности липидного бислоя внутри везикулы И оценку параметров мультислойной ламеллярной организации везикул. Все последние достижения в области интерпретации данных рассеяния были реализованы автором в виде ряда компьютерных программ, в том числе были предложены и новые подходы. Созданное автором программное обеспечение предоставляет исследователям возможность одновременного уникальную структурного описания И моделирования большого числа компонентов в смесях. Разработанные методы были успешно апробированы на большом ряде олигомерных смесей И

самоорганизующихся систем.

Следует отметить, что прямой анализ формы частиц для многокомпонентных смесей сильно затруднен и практически невозможен, так как кривые рассеяния всегда представляют собой линейные комбинации интенсивностей от различных компонентов смеси. Однако, благодаря разработанному автором новому подходу формы промежуточных прямого определения компонентов В эволюционирующих системах, в ряде случаев это стало возможным. Системы, для которых известны начальное и конечное состояния, но которые также содержат неизвестное промежуточное состояние, теперь могут быть непосредственно проанализированы с Несколько помощью этого метода. наборов экспериментальных данных МУРР эволюционирующей смеси (полученных, например, во время процесса образования фибрилл) анализируются совместно с целью получения наилучшего общего соответствия всем имеющимся данным МУРР. Фактически, в данном случае можно говорить о восстановлении формы компонента в эволюционирующей системе, который напрямую измерить в эксперименте не представляется возможным.

Для успешного анализа данных МУРР агрегированные макромолекулы должны быть удалены из раствора, чтобы избежать их влияния на кривую рассеяния. В настоящее время стало популярным проводить измерения МУРР в сочетании с использованием гель-хроматографической ячейки (SEC-SAXS, Size-Exclusion Chromatography-Small-Angle X-ray Scattering). В такой установке раствор образца, выходящий из хроматографической колонки (элюент) сразу направляется в камеру образца, так что сигнал МУРР собирается непосредственно после разделения компонентов смеси за счет различного времени их прохождения через хроматографическую колонку. Эта установка позволяет разделять отдельные компоненты в образце и регистрировать данные МУРР от изолированных фракций, что чрезвычайно важно для последующей интерпретации данных, анализа и структурного моделирования. В то же время, в случае частично перекрывающихся пиков выхода (элюирования) смесей компонентов, задача разложения этих данных на отдельные фракции нетривиальна и потенциально неоднозначна. В данной работе предложен новый алгоритм для восстановления профилей рассеяния и концентрации компонентов на основе эволюционного факторного анализа (ЭФА) по данным МУРР, исследованы его возможности и ограничения. Эффективность алгоритма продемонстрирована на ряде смоделированных и экспериментальных наборов данных SEC-SAXS.

Хотя в ряде случаев удается создать полностью автоматизированные алгоритмы, не требующие вмешательства пользователя при анализе данных МУРР, оптимальные решения не всегда могут быть найдены в автоматическом режиме, поэтому разработка программного обеспечения для интерактивной обработки данных МУРР с помощью графических приложений остается чрезвычайно

актуальной задачей. Автором диссертационной работы были разработаны и реализованы в виде программ графические приложения, позволяющие проводить полноценное интерактивное моделирование данных MYPP. начиная с первичной обработки и заканчивая моделированием четвертичной белковых комплексов, проведением структуры структурного анализа многокомпонентных смесей и оценкой структурных параметров для частично упорядоченных систем. Разработанные программы составляют значительную часть свободно распространяемого программного пакета ATSAS (https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html), который широко используется в научном сообществе при анализе данных МУРР от биологических систем.

Цели и задачи работы.

Целью настоящей работы было развитие методов структурного анализа многокомпонентных биологических систем по данным рентгеновского и нейтронного малоуглового рассеяния. Важной частью работы была разработка алгоритма оценки углового диапазона экспериментальных данных малоуглового рассеяния, содержащего полезную информацию, и применение предложенных методов к ряду практических задач исследований состава и структуры многокомпонентных систем биологической и неорганической природы. Кроме были учитывать, разрабатываемые методы должны как наличие того, полидисперсности частиц по форме и размерам, так и неоднородность электронной плотности исследуемых частиц.

<u>Научная новизна.</u>

Развитые методы позволяют анализировать состав и структуру многокомпонентных систем как в условиях отсутствия априорных сведений об изучаемой системе, так и с привлечением дополнительной информации. Компьютерное моделирование позволило определить возможности и ограничения использования разработанных методов интерпретации данных малоуглового рассеяния сложными биологическими системами.

Разработанные автором методы анализа данных малоуглового рассеяния позволили провести детальное структурное исследование ряда биологических многокомпонентных смесей, в частности определить форму неизвестного промежуточного компонента в процессе образования фибрилл, оценить распределение липидных везикул по размерам и их мультислоевую ламеллярную организацию, восстановить профили рассеяния отдельных компонентов белковых смесей, которые не удается полностью разделить с помощью хроматографических или других методов. Методы применены для количественной оценки состава ряда биологических систем по данным малоуглового рассеяния, причем в некоторых случаях другими способами получить ценную структурную информацию не представляется возможным. Новизна полученных результатов подтверждается высокими индексами цитирования работ с участием автора.

Научное и практическое значение работы.

Научное и практическое значение работы определяется актуальностью поставленных задач и возможностью практического использования разработанных методов анализа данных малоуглового рассеяния многокомпонентными биологическими системами. Разработанные методы существенно расширяют МУРР/МУРН. Эффективность область применимости метода методов продемонстрирована на примере решения широкого круга задач структурного анализа сложных полидисперсных и неоднородных объектов.

Среди основных применений развитых методов, следует отметить следующие:

1) структурный анализ белковых и липидных смесей по данным малоуглового рассеяния;

2) восстановление профилей рассеяния отдельных компонентов в неразделяемых белковых смесях по набору данных малоуглового рассеяния с использованием гель-хроматографической колонки;

3) структурная характеризация равновесных состояний и протекания динамических процессов в эволюционирующих системах по данным малоуглового рассеяния.

Предложенные в работе методы анализа белковых и липидных смесей и алгоритмы определения формы биомакромолекул реализованы в ряде компьютерных программ, вошедших в пакет ATSAS, который использовался на момент написания работы более чем в 2000 лабораторий в мире. Данный пакет находится в свободном доступе для академических пользователей на сайте URL: https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html.

Степень достоверности результатов.

Достоверность представленных в диссертации результатов анализа данных малоуглового многокомпонентных рассеяния ОТ биологических систем согласуется с данными, полученными, в частности, методом электронной микроскопии. Восстановленные формы частиц биомакромолекул всегда сопоставлялись со структурами, найденными другими авторами методами рентгеноструктурного анализа или ядерного магнитного резонанса, если такая информация имелась в наличии. С целью подтверждения надежности работы созданного программного обеспечения автором было проведено масштабное моделирование возможных объектов исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Метод количественной оценки углового диапазона экспериментальных данных малоуглового рассеяния, содержащего полезную информацию, на основе теоремы Котельникова-Шеннона, в случае монодисперсных разбавленных растворов.

2. Методы поиска объемных долей компонентов и распределений частиц по размерам в приближении простых геометрических тел или с использованием

атомных моделей по данным малоуглового рассеяния в многокомпонентных смесях.

3. Методы поиска профилей электронной плотности липидного бислоя, параметров мультислоевой организации и распределений липидных везикул по размерам по данным малоуглового рассеяния в многокомпонентных липидных и липидбелковых смесях.

4. Метод прямого восстановления формы частицы неизвестного промежуточного состояния по данным малоуглового рассеяния в динамической трехкомпонентной системе, включая оценку объемных долей компонентов в процессе ее эволюции.

5. Эволюционный факторный анализ наборов данных малоуглового рассеяния, полученных рентгеновского с использованием гельколонки, для хроматографической оценки количества компонентов И восстановления индивидуальных профилей рассеяния от компонентов в белковых смесях.

6. Многофункциональная графическая платформа для анализа данных малоуглового рассеяния от полидисперсных и частично упорядоченных систем.

<u>Личный вклад диссертанта:</u>

Вклад автора состоит в разработке алгоритмов, методов и программ для анализа экспериментальных данных малоуглового рассеяния, приведенных в работе. Ряд программ, данной созданных автором, включен В широкоиспользуемый в научном сообществе пакет программного обеспечения ATSAS, предназначенный для анализа данных малоуглового рассеяния растворами биомакромолекул и наночастиц. Автор принимал активное участие в проведении экспериментов по малоугловому рентгеновскому рассеянию на синхротронных и лабораторных станциях, проводил обработку результатов экспериментов и интерпретацию полученных данных

Апробация работы.

Результаты работы доложены и обсуждены на II, III, IV, и V Национальных конференциях по применению Рентгеновского, Синхротронного излучений, Нейтронов и Электронов для исследования материалов – РСНЭ (Москва, 1999, 2001, 2003, 2005), VII Национальной конференции Рентгеновское, Синхротронное излучения, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано-Био-Инфо-Когнитивные технологии - РСНЭ-НБИК (Москва, 2009), XI, XII, XIII, XIV, XVI, XVII и XVIII Международных конференциях по малоугловому рассеянию (Нью-Йорк, США, 1999, Венеция, Италия, 2002; Киото, Япония, 2006; Оксфорд, Англия, 2009; Берлин, Германия 2015, Траверс-Сити, США, 2018, Кампинас, Бразилия, 2022), 9-й Международной конференции по дифракции волокон и некристаллической дифракции (Шеффилд, Англия, 2000), III Международной конференции конференции и научные принципы нанотехнологии» (Санкт-Петербург, 2001), Европейской

конференции "Тенденции в энзимологии" (Комо, Италия, 2006), Сателлитной конференции Международного союза кристаллографов по Рентгеновским и нейтронным методам в исследовании наноструктур (Хиого, Япония, 2008), Международном Химическом конгрессе сообщества тихоокеанского бассейна (Гонолулу, США, 2010), XX, XXI и XXIV Конгрессах Международного союза кристаллографов (Флоренция, Италия, 2005, Осака, Япония, 2008, Хайдарабад, Индия, 2017), IX, XI и XIII Международных конференциях по Биологии и синхротронному излучению (Манчестер, Англия, 2007, Гамбург, Германия, 2013, Шанхай, Китай, 2019), Первом Российском кристаллографическом конгрессе (Москва, Россия, 2016), II, III, IV, V, VI, VII, VIII и IX Международной конференции "Лазерные и плазменные исследования и технологии" (ЛаПлаз) (Москва, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023), VII, VIII, IX и X Российских Национальных Симпозиумах "Белки и пептиды" (Новосибирск, 2015, Москва, 2017, Дагомыс, 2019, Сочи, 2021), 51-й, 52-й, 53-й и 54-й Зимних Школах по физике конденсированного состояния (ФКС) (Санкт-Петербург, 2017, 2018, 2019, 2020), Российской конференции по использованию рассеяния нейтронов в конденсированных средах РНИКС-2018 (Санкт-Петербург, 2018), VI конференции по малоугловому рассеянию и рефлектометрии (Гатчина, 2023), XIII и XIV Международных конференциях "Проблемы сольватации и комплексообразования в растворах" (Суздаль, 2018, Иваново 2021), VIII и IX Международных научных семинарах и VI и VII международных молодежных научных школах-семинарах "Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики (Великий Новгород, 2016, Москва, Санкт-Петербург, 2020), EMBL Hamburg P12 Virtual User Meeting (Гамбург, Германия, 2021). Международной конференции "Synchrotron and Free electron laser Radiation: generation and application" ("SFR-2022"), (Новосибирск, 2022).

Публикации по теме диссертации.

По теме диссертации опубликованы 117 статей в отечественных и международных рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ, и тезисы 92 докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, 7 глав, основных выводов, приложения с указанием программного обеспечения, разработанного автором для анализа данных малоуглового рассеяния, списка цитируемой литературы и списка публикаций по теме диссертации. Работа изложена на 371 странице, включая 99 рисунков и 23 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 240 библиографических ссылок. Список работ автора содержит 117 публикаций, обозначенные в тексте диссертации буквой А.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обосновывается актуальность темы работы, определяются цели и задачи исследований, раскрывается научная новизна и практическая значимость, формулируются основные положения, выносимые на защиту, представлены сведения об апробации результатов работы и публикаций.

В <u>Главе 1</u> рассмотрены теоретические основы метода МУРР/МУРН, типы экспериментальных установок и принципы проведения измерений, а также имеющиеся к настоящему времени подходы анализа и интерпретации данных. Показано, что метод МУРР/МУРН позволяет восстанавливать трехмерные структуры низкого разрешения, используя *ab initio* моделирование, молекулярную тектонику и гибридные подходы, а также оценивать олигомерное состояние белков и белковых комплексов, и кроме того является мощным инструментом для количественного анализа гибких систем.

Проведен краткий обзор основных ab initio методов восстановления 3D формы частиц для систем с неоднородной электронной плотностью по данным МУРР/МУРН, которые включают в себя многофазное моделирование в виде структуры частицы плотноупакованными представления шариками с использованием максимально большого набора кривых рассеяния от полноразмерной частицы и ее доступных фрагментов (программа MONSA), а также итеративный алгоритм восстановления 3D электронной плотности по данным МУРР (программа DENSS), для которого достаточно использования одной кривой рассеяния.

Систематическое исследование эффективности работы итеративного алгоритма, реализованного в программе DENSS, при восстановлении формы частиц с неоднородной электронной плотностью показало, что данный алгоритм не позволяет корректно восстанавливать внутреннюю структуру комплексов типа "белок-нуклеиновая кислота", причем систематически повышенная плотность в центральной части является артефактом в подавляющем числе случаев, а кривые рассеяния, рассчитанные от усредненных моделей, имеют существенные расхождения с данными МУРР.

Для таких систем рекомендовано использовать многофазный *ab initio* подход, реализованный в программе MONSA. Надежность восстановления трехмерной формы частиц программой MONSA продемонстрирована на данных МУРР от комплекса белка нуклеоплазмина NP с белками-гистонами H2A-H2B / H5, а также тройного комплекса белков Pex5p/Pex14/PTS1.

Приведены практические примеры применения имеющихся подходов к анализу данных МУРР, полученные с участием автора, которые подтверждают широкие возможности метода МУРР при исследовании структурных параметров биологических макромолекул в растворе. С помощью *ab initio* моделирования была определена 3D форма тандемных доменов белка филамина A (регулирующего организацию актинового цитоскелета), 3D форма полноразмерного белка GbpA (фактора колонизации холерных бактерий), а также особенности структуры сольватационного слоя таннинов (полифенольных соединений, содержащихся в коже растений и защищающих их от проникновения бактерий) в водно-спиртовом растворе.

Методом молекулярной тектоники была определена стехиометрия и построена модель тройного белкового комплекса IscS/IscU/CyaY, в который входит белок фратаксин (IscS) ответственный за развитие нейродегенеративной болезни атаксии Фридриха и участвующий в сборке Fe-S кластера, фермент десульфураза (IscU) и каркасный (scaffold) белок-ингибитор (CyaY).

Методом оптимизированного ансамбля по данным МУРР оценена гибкость белка семейства нейротрофинов ProNGF (Nerve Growth Factor), который участвует в поддержании и росте определенных популяций нейронов, как в центральной, так и в периферической нервной системе, и выполняет свою биологическую роль, связываясь с различными рецепторами (антителами). Было показано, что пропептидная область белка proNGF является подвижной и приводящей к различным конформациям. Это свойство белка способствует модуляции его взаимодействия с мембраносвязанными рецепторами.

В <u>Главе 2</u> представлен новый подход для определения полезного углового диапазона в экспериментальных данных МУРР/МУРН от разбавленной монодисперсной системы.

Интенсивность рассеяния I(s) от разбавленного раствора одинаковых частиц связана с функцией распределения расстояний p(r) в прямом пространстве как

$$I(s) = 4\pi \int_{0}^{D_{\text{max}}} p(r) \frac{\sin sr}{sr} dr$$
(1)

где $s = 4\pi \sin(\theta) /\lambda$, 2θ - угол рассеяния, а λ - длина волны излучения. Уравнение (1) учитывает тот факт, что функция p(r) определена на ограниченном интервале и равна нулю для всех $r > D_{max}$ (где D_{max} - максимальный размер частицы). Если I(s) известна, то p(r) может быть вычислена с помощью обратного преобразования

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty sI(s) \sin srds$$
⁽²⁾

Из уравнений (1) и (2) легко заметить, что функции sI(s) и p(r)/r являются синус-преобразованиями Фурье друг для друга. Далее p(r) удобно представить в виде ряда Фурье по синусам:

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} a_n \sin(\pi r n / D_{\text{max}})$$
(3)

где *n* - целое число. Подстановка уравнения (3) в (1) дает интерполяционную формулу Шеннона:

$$U(s) = sI(s) = \sum_{n=1}^{\infty} s_n a_n \left[\frac{\sin D_{\max}(s - s_n)}{D_{\max}(s - s_n)} - \frac{\sin D_{\max}(s + s_n)}{D_{\max}(s + s_n)} \right]$$
(4)

где $s_n = \pi n/D_{max}$ – так называемые положения шенноновских каналов.

Уравнение (4) содержит, вообще говоря, бесконечное число шенноновских каналов. Однако для экспериментальных данных МУРР, измеренных в ограниченном диапазоне векторов рассеяния ($s < s_{max}$), вклад каналов за пределами этого диапазона (т.е. с индексами $n > s_{max}D_{max}/\pi$) в приближение интенсивности в этом диапазоне будет относительно мал. Поэтому число шенноновских каналов в измеренном диапазоне $N_S = s_{max}D_{max}/\pi$ часто используется в качестве оценки информационного содержания в данных рассеяния.

Хотя большие значения N_S обычно указывают на большее информационное содержание, очевидно, что сама по себе эта величина не может дать окончательную оценку из-за того, что в данном случае никак не учитывается отношение сигнал/шум. Кроме того, данные МУРР обычно измеряются на плотной угловой сетке, т.е. с угловым приращением Δs , значительно меньшим, чем расстояние между шенноновскими каналами π/D_{max} . Таким образом, количество информации в данных МУРР должно быть связано как с уровнем экспериментальных ошибок интенсивности, так и со степенью плотности угловой сетки данных МУРР.

Когда индекс суммирования в уравнениях (3) и (4) ограничен целым числом (M), соответствующие усеченные шенноновские приближения обозначим как $p_M(r)$ и $U_M(s)$, соответственно. Для набора экспериментальных данных МУРР/МУР можно построить его усеченное приближение $U_M(s)$ с использованием M шенноновских каналов путем минимизации невязки

$$\chi^{2}(M) = \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{2s_{i}^{2} \sigma_{i}^{2}} [s_{i}I(s_{i}) - U_{M}(s_{i})]^{2}$$
(5)

где индекс суммирования *i* проходит по *N* экспериментальным точкам, а σ_i^2 - стандартное отклонение для измеренной интенсивности в точке s_i . Наилучшее решение методом наименьших квадратов должно удовлетворять условию $\delta \chi^2 / \delta a_m = 0$, что приводит к системе нормальных уравнений:

$$\sum_{i=1}^{N} \frac{1}{s_i^2 \sigma_i^2} \left[s_i I(s_i) B(m,i) \right] = \sum_{i=1}^{N} \sum_{n=1}^{M} \frac{a_n}{s_i^2 \sigma_i^2} \left[B(m,i) B(n,i) \right]$$
(6)

где $B(n,i) = \left[\frac{\sin D_{\max}(s_i - s_n)}{D_{\max}(s_i - s_n)} - \frac{\sin D_{\max}(s_i + s_n)}{D_{\max}(s_i + s_n)}\right].$

Для экспериментов МУРР/МУРН от растворов макромолекул экспериментальные данные $I(s_i)$ представляют собой разницу между рассеянием от растворенного вещества и чистого растворителя и могут иметь отрицательные значения из-за экспериментальных ошибок. Эти отрицательные значения должны войти в уравнения (5-6), однако поскольку рассчитанная теоретическая интенсивность МУРР $U_M(s_i)$ всегда должна быть неотрицательной, то система уравнений (6) может быть решена стандартными методами при ограничении на неотрицательность значений коэффициентов *a_n*.

Усеченное шенноновское приближение дает возможность оценить информативность и полезный угловой диапазон в наборе экспериментальных данных МУРР/МУРН. Действительно, при слишком малом *М* эта аппроксимация Шеннона не будет иметь достаточного количества членов (слагаемых) для соответствия экспериментальным данным. С ростом М приближение будет улучшаться, но на определенном этапе будет наблюдаться плато, когда значения a_n , определенные из системы уравнений (6) уже не будут существенно улучшать невязку, определяемую по экспериментальным данным. Поэтому должно существовать оптимальное (эффективное) значение шенноновских каналов M_S, отражающее информативность данных, а полезный угловой диапазон данного набора экспериментальных данных МУРР/МУРН будет определяться как $\pi M_S/D_{max}$. Заметим, что M_S не обязательно должно совпасть с N_S , и далее будет представлена процедура надежного автоматизированного определения эффективного числа шенноновских каналов M_S .

На усеченное шенноновское приближение влияют шум и плотность точек угловой сетки данных МУРР/МУРН, это подтверждено моделированием кривых МУРР/МУРН, рассчитанных от различных геометрических тел (Таблица 1). Данные были рассчитаны при фиксированном значении *s_{max}=4* нм⁻¹ и содержали различное число шенноновских каналов для разных тел из-за их различных размеров. Плотная сетка с угловым шагом Δs =0.0025 нм⁻¹ использовалась для имитации типичного набора данных МУРР синхротронного рентгеновского излучения, а более разреженная сетка с $\Delta s=0.042$ нм⁻¹ (имеющая примерно в 17 раз меньше точек в том же угловом диапазоне) имитировала данные МУРН. Для добавлялся случайный точки интенсивности гауссовский шум, каждой относительная ошибка моделируемого шума варьировалась от 1% до 400% для различных наборов данных.

Для каждого смоделированного набора данных вычислялись усеченные шенноновские приближения $U_M(s)$ для различных чисел М в соответствии с уравнениями (4-6), и качество приближения оценивалось по коэффициенту R_M между идеальной теоретической кривой без шума $I_{ref}(s)$ и соответствующим приближением Шеннона $U_M(s)/s$ по следующей формуле:

$$R_{M} = \sum_{i=1}^{N} s_{i} \left(U_{M}(s_{i}) / s_{i} - I_{ref}(s_{i}) \right) / \sum_{i=1}^{N} s_{i} I_{ref}(s_{i})$$
(7)

Смоделированные наборы данных для сплюснутого эллипсоида/куба и лучшие шенноновские приближения (соответствующие минимальным R-факторам) показаны на Рис. 1. Оптимальное число шенноновских каналов M_B , обеспечивающее наилучшее согласие с идеальной кривой, зависит как от уровня шума, так и от углового шага данных МУРР/МУРН (Таблица 1). Следует также

отметить, что качество усеченного шенноновского приближения зависит от анизометрии объекта. Для очень анизометричных частиц высокие уровни шума (100% шума на Рис. 1а-б) приводят к значительным осцилляциям для шенноновских приближений.



Рис. 1 Теоретические кривые рассеяния от сплюснутого эллипсоида (полуоси 1, 15 и 15 нм, панели (а) и (б)) и куба с ребром 5 нм (панели (в) и (г)). Кривые 1-4 соответствуют добавленному гауссовскому шуму с относительным уровнем 1, 5, 20 и 100 %. Наилучшие усеченные шенноновские приближения показаны сплошными линиями. Каждые последующие кривые сдвинуты на один логарифмический порядок для лучшей Для визуализации. зашумленных теоретических данных, где значения могут стать отрицательными из-за шума, логарифмы модуля интенсивности показаны в виде красных точек. Панели (а), (в) рассчитаны на угловой сетке типичной рентгеновского для эксперимента, панели (б), (г) – для нейтронных данных.

В реальном эксперименте МУРР/МУРН идеальная кривая рассеяния и, следовательно, число *М*_{*B*}, недоступны, и эффективное число шенноновских каналов *M_S* должно определяться только на основе экспериментальных данных. Моделирование на теоретических наборах данных, приведенное выше, позволило нам определить количественные критерии для выбора *M_S*. Такой выбор может быть осуществлен путем мониторинга невязки χ^2 между экспериментальными данными и шенноновским приближением $U_M(s)$ как функции M, поскольку плохо определенные шенноновские каналы уже не будут значительно улучшать невязку. Таким образом, надежную оценку M₅ можно получить, комбинируя критерии качества приближения для обратного и прямого пространства. Действительно, каждое шенноновское приближение $U_M(s)$, выраженное набором коэффициентов a_n , соответствует распределению расстояний в прямом пространстве $p_M(r)$ согласно уравнению (3). Увеличение числа M добавляет дополнительные члены к $p_M(r)$, осциллирующие со все более высокой частотой *n/D_{max}*. Можно ожидать, что ненадежно определенные шенноновские каналы *a_n* не дадут ничего, кроме нарастающих осцилляций в функции $p_M(r)$, и это можно уловить с помощью меры интегральной производной функции $\Omega(p)$:

$$\Omega(p) = \int_{0}^{D_{\text{max}}} \left[\frac{dp_M(r)}{dr} \right]^2 dr$$
(8)

Следовательно, качество шенноновского приближения может быть оценено с помощью комбинированного критерия

$$f(M) = \chi^2(M) + \alpha \, \Omega(p_M) \tag{9}$$

где коэффициент α обеспечивает правильное масштабирование двух метрик χ^2 и $\Omega(p)$ (см. ниже).

Таблица 1. Результаты тестирования метода на теоретических наборах данных рассеяния, рассчитанных от геометрических тел. Кривые малоуглового рассеяния рассчитаны на угловом диапазоне до $s_{max}=4 \text{ нм}^{-1}$, к ним добавлен шум с относительным уровнем от 1% до 400%. Столбцы, расположенные справа от номинального числа шенноновских каналов $N_S = s_{max} D_{max}/\pi$ показывают оптимальное число шенноновских каналов M_B , которое обеспечивает наилучшее согласие с идеальной (незашумленной) кривой. Максимальный уровень шума, при котором полезная информация все еще присутствует на всем угловом диапазоне кривой выделен жирным шрифтом. Таблица 1а соответствует рентгеновским данным, Таблица 16 - данным нейтронного рассеяния.

Таблица 1а. Данные МУРР (плотная угловая сетка с шагом ∆s=0.0025 нм⁻¹).

Тип тела	Тип тела D_{max} N_S M_B (нм)								
	(11.11)		1%	5%	20%	50%	100%	200%	400%
Сплюснутый эллипсоид (полуоси 15, 15, 1 нм)	30	38	41	39	39	38	38	38	25
Вытянутый эллипсоид (полуоси 1, 1, 15 нм)	30	38	39	39	39	38	38	37	23
Полая сфера (Rin 2.5 нм, Rout 5 нм)	10	13	14	14	13	13	13	12	11
Полый цилиндр (Rin 2.5 нм, Rout 5 нм, Н 10 нм)	14	18	19	19	18	18	18	16	14
Куб (сторона 5 нм)	8.6	11	12	12	12	11	11	10	9
Сфера (радиус 5 нм)	10	13	15	14	14	14	14	14	13

Таблица 16. Данные МУРН (разреженная угловая сетка с шагом ∆s=0.042 нм⁻¹).

Тип тела	D_{max}	D_{max} N_S M_B							
	(нм)		1%	5%	20%	50%	100%	200%	400%
Сплюснутый эллипсоид (полуоси 15, 15, 1 нм)	30	38	38	38	38	38	38	37	25
Вытянутый эллипсоид (полуоси 1, 1, 15 нм)	30	38	38	38	38	37	36	34	15
Полая сфера (Rin 2.5 нм, Rout 5 нм)	10	13	13	13	13	12	11	11	10
Полый цилиндр (Rin 2.5 нм, Rout 5 нм, Н 10 нм)	14	18	18	18	18	17	16	16	14
Куб (сторона 5 нм)	8.6	11	11	11	11	10	10	9	8
Сфера (радиус 5 нм)	10	13	13	13	13	13	13	11	10

Таким образом, процедура определения оптимального числа шенноновских каналов *M*_s может быть сформулирована следующим образом:

1. для данного набора экспериментальных данных оценить максимальный размер частиц *D_{max}*.

2. рассчитать номинальное число шенноновских каналов как $N_S = s_{max}D_{max}/\pi$ и задать диапазон поиска наилучшего шенноновского приближения по числу *M*: [*M_{min}*, *M_{max}].*

3. Для всех $M_{min} < M < M_{max}$ вычислить коэффициенты шенноновского приближения a_n (n=1,...М), решив систему уравнений (6) с помощью процедуры линейных наименьших квадратов с ограничением на неотрицательность решений a_n .

4. Для каждого шенноновского приближения вычислить невязку $\chi^2(M)$ и меру интегральной производной $\Omega(p_M)$.

5. Оценить масштабный коэффициент α как отношение между $\chi^2(M_{max})$ и $\Omega(p(M_{min}))$.

6. Определить оптимальное значение M_S , соответствующее минимуму целевой функции f(M), согласно ее определению из уравнения (9).

Типичный пример шенноновских приближений с использованием различного числа каналов и соответствующих функций p(r) показан на Рис. 2 для случая вытянутого эллипсоида.



Рис. 2 Усеченное шенноновское приближение для теоретической кривой рассеяния от сплюснутого эллипсоида (полуоси 1, 15 и 15 нм) с добавлением шума на уровне 20%. Панель (а), кривая рассеяния с шумом и шенноновские приближения, полученные при M=18 (синяя кривая), 28 (красная кривая), 38 (зеленая кривая) и 43 (малиновая кривая). Панель (б), функция распределения по расстояниям p(r), рассчитанная по данным рассеяния без шума (кривая 1) и функции $p_M(r)$, вычисленные по соответствующим шенноновским приближениям (кривые 2-5). Цветовая схема та же, что и на панели (а). Панель (в): невязка шенноновского приближения χ^2 (М) и интегральная гладкость $\Omega(p_M(r))$ в зависимости от числа шенноновских каналов M для теоретических данных, изображенных на панели (а). Кривая 1 (кружки, синяя линия) показывает невязку χ^2 (М), кривая 2 (треугольники, зеленая линия) - шкалированную интегральную гладкость $\alpha\Omega(p_M(r))$. Целевая функция f(M) соответствует кривой 3, (квадраты, красная линия).

Описанный выше алгоритм был реализован в виде компьютерной программы SHANUM. Для проверки эффективности работы алгоритма программа SHANUM была протестирована на теоретических наборах кривых малоуглового рассеяния (Таблица 1), и с помощью нее были определены значения M_S , совпавшие со значениями M_B с точностью до одного шенноновского канала для всех случаев. Данные тестовые расчеты показали, что предложенный алгоритм позволяет надежно определять эффективное число шенноновских каналов M_S по набору данных и, следовательно, оценивать полезный угловой диапазон данных МУРР/МУРН (согласно $s=\pi M_S/D_{max}$).

метод был применен Затем К ряду экспериментальных наборов рентгеновских малоугловых данных, собранных в различных угловых диапазонах от растворов макромолекул, содержащих частицы различных размеров при различных концентрациях. На Рис. За представлены данные МУРР от белкового комплекса импортин α/β с молекулярной массой (ММ) 160 кДа и максимальным размером $D_{max}=19$ нм. Из-за низкой концентрации белка (0.5 мг/мл) данные МУРР сильно зашумлены в области больших углов. Несмотря на то, что измеренный диапазон векторов рассеяния (до $s_{max}=6$ нм⁻¹) номинально содержит $N_S=36$ шенноновских каналов, программа SHANUM дает оценку для $M_S=9$, указывая на то, что высокоугловые данные за пределами s=1.5 нм⁻¹ не содержат полезной информации. В то же время, для данных МУРР от комплекса ДНКметилтрансферазы SsoII (*MM*=45 кДа, *D_{max}*=11 нм), хотя кривая рассеяния представленная на Рис. 36 кажется довольно шумной, начиная с s=2 нм⁻¹, алгоритм что содержат полезную информацию показывает, данные вплоть ЛО 4 нм⁻¹. Данные МУРР по ферменту люмазинсинтазе LSAQ-IDEA, образующему икосаэдрические капсулы в растворе (с MM=2 МДа и $D_{max}=33$ нм), имеют хорошее соотношение сигнал/шум во всем угловом диапазоне, изображенном на Рис. Зв, и алгоритм ожидаемо выдает оценку, что весь угловой диапазон данных с 20 шенноновскими каналами содержит полезную информацию.

В методе МУРР/МУРН отбрасывание данных в области больших углах не повлияет на точность оценки структурных параметров, например, радиуса инерции, определяемого по данным МУРР/МУРН в области малых углах с помощью аппроксимации Гинье. Удаление неинформативной части данных должно улучшать надежность результатов процедур восстановления формы частиц, а также расчет структурных параметров частиц, таких как Породовский объем частицы V_p . Последний представляет собой объем исключенной из растворителя частицы и рассчитывается по формуле:

$$V_{p} = \frac{2\pi^{2}I(0)}{Q}, \quad Q = \int_{0}^{\infty} s^{2}I(s)ds$$
(10)



Рис. 3 Экспериментальные данные МУРР И шенноновские приближения, соответствующие оптимальному числу шенноновских каналов, определенному программой SHANUM. Панель (а), белковый комплекс импортин α/β ; панель (б), белок M.SSoII; панель (в), белок LSAQ-IDEA. Верхняя граница полезного углового диапазона обозначена стрелкой, а целевая функция f(M) показана на вставке. На вставках внизу панелей (а) и (б) показана зависимость исключенного объема частицы (Породовский объем) от лиапазона экспериментальных данных, использованных при расчете инварианта Порода.

На практике инвариант Порода *Q* рассчитывается на конечном угловом диапазоне $[0, s_m]$, и затем для компенсации недостающих данных от s_m до бесконечности применяются дополнительные поправки. На нижней панели Рис. За представлена оценка объема Порода для белкового комплекса импортин α/β как функции верхнего предела интегрирования *s_m*. Ожидаемый объем Порода для комплекса импортин α/β составляет около 280 нм³. Рассчитанный объем дает стабильные значения с небольшими колебаниями, находясь внутри полезного углового диапазона данных МУРР, оцененного программой SHANUM (т.е. до s_m около 1.3 нм⁻¹), и начинает резко колебаться, как только при его расчетах учитываются данные МУРР в области больших углов. Аналогично, для ДНКметилтрансферазы SsoII, V_p показывает разумные значения около 75 нм³, когда s_m остается в пределах полезного углового диапазона данных, и проявляет резкие колебания за пределами этого диапазона (нижняя панель Рис. 3б). Эти примеры иллюстрируют важность удаления части данных, не содержащих полезной информации, для предотвращения потенциальных проблем и неточностей при оценке основных структурных параметров частиц.

Разработанный автором метод предлагает объективную процедуру определения полезного углового диапазона. Он может быть использован для выбора части экспериментальных данных МУРР/МУРН, содержащей полезную информацию, в автоматизированных системах обработки данных, в процедурах моделирования и при депонировании кривых рассеяния в имеющиеся базы данных.

В Главе 3 рассмотрены основные подходы, разработанные автором, позволяющие проводить количественный анализ состава многокомпонентных полидисперсных систем по данным МУРР/МУРН. Они могут быть использованы как для анализа биологических систем (сложных белковых смесей), так и для микроэмульсий и растворов наночастиц. анализа состава С помощью разработанных методов можно оценивать объемные доли компонентов смеси при об атомных информации структурах компонентов наличии (программа OLIGOMER), определять функции распределения частиц по размерам и параметры межчастичного взаимодействия при аппроксимации формы компонентов простыми геометрическими телами (программа MIXTURE).

Для каждой из упомянутых выше программ приведены практические примеры их использования. В частности, с помощью программы OLIGOMER проведен количественный анализ объемных долей компонентов для смеси активной (закрытой) и неактивной (открытой) форм ферментов 3-фосфоглицераткиназы (PGK) и термостабильной 3-изопропилмалатдегидрогеназы (Tt IPMDH) в зависимости от присутствия лигандов и наличия мутаций аминокислотных остатков, относящихся к активному сайту фермента. Рассмотрены случаи олигомерных смесей, находящихся в динамическом равновесии, которые могут образовываться как в результате частичной диссоциации олигомеров (белок трикорн протеаза, в растворе которого присутствуют как гексамеры, так и мономеры с димерами), так и в результате ассоциации мономеров в олигомеры более высоких порядков (H_c домен белка столбнячного нейротоксина TeNT образует в растворе смесь мономеров и димеров).

Особого внимания заслуживает исследование динамической природы образования комплексов белков. Следует отметить, что образование белкового комплекса представляет собой, по меньшей мере, двухстадийный процесс, в котором динамический комплекс, образованный за счет случайных столкновений («встреч»), предшествует стабильному финальному комплексу. Предполагается, что «динамическое» состояние комплекса существует недолгое время и быстро переходит в стабильное конечное состояние. Однако для ряда слабо связанных белковых комплексов такое состояние, образованное за счет случайного соударения ("встречи") двух белков, может стать доминирующей (основной) формой. Примером такой системы является комплекс адренодоксина (Adx) с митохондриальным цитохромом с (Cc). Адренодоксин (Adx) - белок с молекулярной массой 14.4 кДа, относящийся к семейству 2Fe-2S ферродоксинов. Он участвует в биосинтезе стероидных гормонов, действуя в качестве электронного челнока между NADPH-зависимой адренодоксин редуктазой и несколькими цитохромами P450. *In vitro* перенос электронов от адренодоксин редуктазы до Adx часто контролируют с помощью быстрого последующего переноса электронов от Adx до митохондриального цитохрома с (Cc) (молекулярная масса 12.5 кДа).

Для получения количественных оценок олигомерного равновесия экспериментальные данные МУРР (Рис. 4а-б) приближались смесью различных олигомеров Сс и Adx с помощью программы OLIGOMER. Эти олигомеры включали в себя мономеры, гетеро-димеры, гетеро-тетрамеры, a также гипотетические гетеро-тримеры, созданные путем удаления одного мономера из тетрамерной модели, и именно такие смеси обеспечили хорошее соответствие расчетных кривых экспериментальным данным при различных концентрациях белков (Рис. 46, кривые (1-4)). Интересно, что присутствие значительной доли тримеров было выявлено для всех концентраций нативного белка, и попытки приблизить данные без учета тримеров значительно ухудшали качество приближений (Таблица 2). Таким образом, было установлено, что образование тетрамеров происходит именно через тримеры, а не посредством ассоциации двух гетеродимеров. Такой механизм ожидался бы для случая специфической И димеризации тетрамеризации, тогда как фактически наблюдаемая олигомеризация предполагает образование стохастического «столкновительного» комплекса. Этот результат дополнительно подтверждается тем фактом, что «сшитый» гетеродимерный комплекс CL (c искусственно внедренной межмолекулярной дисульфидной связью между аминокислотными остатками цистеина цитохрома C (V28C) и адренодоксина Adx (L80C)) не образует тетрамеров даже при высоких концентрациях белков (Рис. 4а, кривая (1)). Повидимому, гетеродимеры CL (Рис. 4в) не обладают подвижностью в растворе, необходимой для эффективного формирования междоменных связей через столкновительный механизм.

Результаты анализа данных МУРР показывают, что нативный комплекс Cc/Adx является полностью динамическим и образуется исключительно вследствие случайно-«столкновительного» характера взаимодействий белков.



Рис. 4 (а) Экспериментальные данные МУРР от комплексов белков цитохром с (Сс)адренодоксин (Adx) (кружки: эксперимент, сплошные линии: рассчитанные приближения). Кривая (1) – "сшитый" комплекс с приближением от модели гетеродимера (в соотношении 1:1), полученного программой SASREF; кривая (2) нативный комплекс в буфере Hepes 200 мМ NaCl и приближение от эквимолярной смеси мономеров Сс и Adx; кривая (3) - нативный комплекс с концентрацией 24 мг/мл и приближение от модели гетеротетрамера (в соотношении 2:2), полученного программой SASREF. (б) Данные МУРР от нативного комплекса Cc/Adx в растворах, не содержащих хлорид натрия. Кривые (1) - (4) соответствуют концентрациям комплекса 24, 12, 6.0 и 2.4 мг/мл в буфере 10 мМ Нерез, рН 7.4, соответственно, кривая (5) соответствует концентрации комплекса 2.4 мг/мл в 20 мМ буфере фосфата калия рН 7.4). Наилучшие приближения программы OLIGOMER показаны сплошными линиями, они соответствуют смесям мономеров, гетеродимеров, тримеров и тетрамеров с объемными долями, указанными в Таблице 2 (для кривых (1-4)). Для кривой (5) наилучшим приближением является гетеродимерный комплекс (в соотношении 1:1). Последовательные кривые смещены вниз на один логарифмический порядок для наглядности. (в) Верхний ряд: ab initio модель "сшитого" комплекса Cc/Adx, полученная программой DAMMIN (серые полупрозрачные сферы), наложенная на атомную модель гетеродимера. Модели Сс и Adx представлены в виде синих и красных Са цепей, соответственно. Остатки Val28 цитохрома с и Leu80 адренодоксина указаны зелеными сферами. Правый вид повернут на 90° по часовой стрелке вокруг вертикальной оси. Нижний ряд: *ab initio* модель нативного комплекса Cc/Adx при высокой концентрации (24 мг/мл) в буфере, не содержащим хлорид натрия, совмещенная с атомной моделью гетеротетрамера.

Способность белков принимать различные четвертичные структуры является существенной и важной для многих биологических процессов, таких как передача сигнала, регуляция клеточного цикла и ферментативный катализ. Среди факторов, которые вызывают изменение четвертичной структуры, можно указать следующие - температурные сдвиги, изменение ионной силы и рН раствора, связывание лигандов. В некоторых случаях белковая инженерия, использующая мутации и геномные вставки, приводит к изменению структуры белка in vitro. само-собирающиеся Макромолекулярные структуры с икосаэдрической симметрией имеют преимущество, заключающееся в том, что они состоят из

сравнительно малого числа уникальных строительных блоков и при этом теоретически способны образовывать большое число стабильных состояний.

Нативни	CL комплекс				
с, мг/мл	24	12	6	2.4	3-12
R_g , нм	2.83±0.07	2.83±0.07	2.65±0.05	2.44±0.07	2.14±0.05
<i>D</i> _{max} , нм	9.0±0.5	9.0±0.5	9.0±0.5	8.0±0.5	8.0±0.5
<i>Vp</i> , нм ³	63±6	52±5	43±5	35±4	42±5
<i>ММ</i> , кДа	44±5	42±5	35±4	25±4	22±3
χ^2_{MDT}	2.45	1.72	1.56	1.25	-
χ^2_{MTT}	1.84	1.47	1.41	1.17	-
χ^2 MDTT	1.84	1.43	1.35	1.15	1.45
<i>V_{мон,}</i> %	0	0	6±5	24±5	0
<i>V</i> дим, %	0	8±5	25±5	24±5	100
<i>V</i> трим, %	48±5	47±5	54±5	52±5	0
Vmemp,%	52±5	45±5	15±5	0	0

Таблица 2. Структурные параметры нативного и "сшитого" (CL) комплекса цитохром C (Cc) – адренодоксин (Adx) по данным МУРР.

Обозначения: R_g , радиус инерции; D_{max} , максимальный размер частицы, V_p , исключенный объем гидратированной частицы, MM, молекулярная масса, χ^2 обозначает невязку наилучших приближений к экспериментальным данным от модельных смесей: мономеры/димеры/тетрамеры χ^2_{MDT} , мономеры/тримеры/тетрамеры χ^2_{MDT} , и мономеры/димеры/тетрамеры χ^2_{MDTT} , V_{Moh} , V_{dum} , V_{mpum} и V_{memp} –соответствующие объемные доли олигомерных компонентов смеси.

Примером такой системы является фермент люмазинсинтаза (LS), который катализирует образование 6,7-диметил- 8-рибитиллюмазина (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine) на предпоследней стадии биосинтеза рибофлавина (витамина B2). Распределение частиц икосаэдрических капсул люмазинсинтазы из *Bacillus subtilis* (LSBS) и *Aquifex aeolicus* (LSAQ) для нативных и мутантных образцов было исследовано с помощью МУРР и крио-электронной микроскопии (ЭМ) при различных значениях рН и в присутствии различных буферов.

Данные крио-ЭМ различных образцов нативных и модифицированных LS показали, что частицы LS образуют икосаэдрические капсулы с диаметрами в трех различных диапазонах: 16-20 нм (тип I), 27-30 нм (тип II) и 30-33 нм (тип III) (Рис. 5). Капсулы типа I состоят из 60 субъединиц с совершенной икосаэдрической симметрией (T = 1), тогда как диаметры капсул типа II и типа III хорошо соотносятся с числами триангуляции T = 3 и T = 4, и состоят из 180 и 240 субъединиц.



Рис. 5 Контрастные увеличенные крио-ЭМ изображения (a) LSBS фосфатный буфер, pH 8.0 (б) LSBS в Tris/HCl, pH 8.0 (в) LSBS в Tris/HCl, pH 9.0 (г) LSBS в боратном буфере, pH 7.0 (д) мутант LSBS R127T в фосфатном буфере, pH 7.0 (е) мутант LSAQ-IDEA в Tris/HCl, pH 8.5, (ж) мутант LSAQ-IDEA в фосфатном буфере, pH 7.0. Шкала соответствует 30 нм.

Эксперименты МУРР проводились с растворами LSBS в фосфатных, Tris гидрохлоридных и боратных буферах и с растворами LSAQ в фосфатных и Tris гидрохлоридных буферах в диапазоне значений рН между 6.0 и 10.0. На Рис. 6 показаны экспериментальные кривые рассеяния для ферментов LSBS и LSAQ, и наилучшие приближения от смеси полных и неполных капсул типа I, II, III, полученные программой MIXTURE. В Таблице 3 представлены результаты моделирования данных МУРР для раствора LSBS В боратном буфере, демонстрирующие переход от капсул типа I к капсулам типа II/III при изменении рН. Видно, что при значениях рН 7.0, 8.0 и 9.0 образуются главным образом капсулы типа I (объемная доля 97%) с диаметром около 160 Å, тогда как при рН 10.0 основная фракция (62% полных и 36% неполных капсул) относится к капсулам типа III с диаметрами около 320 Å. Это означает, что процесс образования капсул может подстраиваться (управляться) рН буферного раствора, при этом ансамбли различных типов капсул находятся в динамическом равновесии друг с другом.

Таблица 3. Структурные параметры смесей фермента LSBS дикого типа в боратном бу	фере,
полученные программой MIXTURE. Обозначения: χ^2 – невязка к данным MУPP, v – объем	мные
доли, <i>R</i> – средние радиусы, <i>dR</i> – полидисперсность капсул.	

Образец	pН	χ^2	Малые капсулы (T=1)			Большие капсулы (Т=3,4)					
			полные			полные			неполные		
			v	<i>R</i> ,	dR,	v	<i>R</i> ,	dR,	v	<i>R</i> ,	dR,
				HM	HM		HM	HM		HM	HM
LSBS	7.0	1.28	0.97	7.69	0.50	0.02	15.72	0.5	0.01	14.77	0.27
WT	8.0	2.47	0.96	7.72	0.50	0.02	15.64	0.5	0.01	14.65	0.24
W I	9.0	2.81	0.98	7.54	0.50	0.01	15.95	0.5	0.01	14.72	0.15
(Borate)	10.0	3.72	0.02	9.00	0.10	0.62	15.92	0.5	0.36	12.94	0.99



Рис. 6 Экспериментальные данные МУРР от фермента LSBS дикого типа, LSBS R127T мутанта, LSAQ дикого типа и LSAQ-IDEA мутанта (кружки) и наилучшие приближения (сплошные линии), полученные программой MIXTURE. (а) кривая рассеяния LSBS дикого типа (1) в фосфатном буфере при pH 6.0 и в Tris гидрохлоридном буфере (2-5) при pH 7.0, 7.6, 8.4 и 9.0, соответственно; (б) кривая рассеяния мутанта LSBS R127T (1) в фосфатном буфере при pH 6.0 и в Tris гидрохлоридном буфере (2-5) при pH 7.0, 7.6, 8.4 и 9.0, соответственно; (б) кривая рассеяния мутанта LSBS R127T (1) в фосфатном буфере при pH 6.0 и кривые (2-6) Трис гидрохлоридном буфере при pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 и 9.0, соответственно; (в) кривые рассеяния LSBS дикого типа (1-4) в боратном буфере при pH 7.0, 8.0, 9.0 и 10.0, соответственно; (г) кривые рассеяния LSAQ дикого типа (1) в фосфатном буфере при pH 6.0; LSAQ дикого типа (2) в Трис гидрохлоридном буфере при pH 7.0; мутанта LSAQ-IDEA (3) в фосфатном буфере при pH 6.0; мутанта LSAQ-IDEA (4) в Трис гидрохлоридном буфере при pH 7.0.

Для LSAQ дикого типа в фосфатном и Tris-буфере были обнаружены три компонента: 10-18% свободных "диссоциированных» граней, 61-70% полных капсул типа I и 20-22% полных капсул типа II. Вставка четырех аминокислотных остатков в мутантном типе LSAQ-IDEA приводит к существенным изменениям профиля рассеяния (Рис. 6г). Компонент с капсулами типа I практически исчезает (было найдено лишь до 5% этих частиц), вместо них образуются в основном капсулы типа II диаметром 27 нм и небольшое количество малых свободных граней капсул. Эти результаты показывают, что мутация IDEA предотвращает образование капсул типа I, но не капсул типа II.

Таким образом, было показано, что фермент LS подобно некоторым вирусным белкам может само-собираться в капсулы различного размера и количества субъединиц вследствие мутаций или изменений химических и физических условий среды. Причем эта изменчивость форм капсул, как показывают данные МУРР и крио-ЭМ, коррелирует с наличием определенных остатков вблизи активного центра фермента LS и, таким образом, с его ферментативной (каталитической) функцией.

В <u>Главе 4</u> рассмотрены основные подходы, разработанные автором, позволяющие проводить количественный анализ состава липидных и липидбелковых смесей по данным МУРР. С помощью разработанных методов можно восстанавливать профили электронной плотности липидного бислоя и оценивать мультислоевую организацию липидных везикул (программа LIPMIX), исследовать взаимодействие липидных везикул с белковыми макромолекулами (программа BILMIX).

Метод МУРР широко используется для изучения структуры и морфологии фосфолипидных везикул (липосом) и их взаимодействия с белковыми макромолекулами. Поскольку липосомы часто используются для доставки лекарственных средств, то по изменению распределения электронной плотности липидного бислоя можно судить о характере внедрения лекарственных средств в бислой липосомы.

Эффективность подхода количественного описания состава липидных смесей по данным МУРР была проверена на примере эволюционирующих везикул DMPC/DPPC во время процесса их экструзии с помощью разработанной автором программы LIPMIX (Рис. 7).



Рис. 7 Экспериментальные данные МУРР (кружки с интервалами ошибок) экструдированных везикул после 25 проходов через экструдер для DMPC (панель (а)) и DPPC (панель (б)) с использованием различных диаметров пор (кривая 1-30 нм, кривая 2-50 нм, кривая 3 - 100 нм, кривая 4- 200 нм) и приближения, полученные с помощью программы LIPMIX (красные сплошные линии).

Восстановленные профили плотности липидного бислоя DMPC/DPPC (общей толщиной 6 нм) имеют узкие положительные пики для областей гидрофильной головной группы липидного бислоя, тогда как в центральной области бислоя, соответствующей гидрофобным углеводородным хвостам липидов, наблюдается широкий отрицательный пик электронной плотности. При этом, профили плотности слабо чувствительны к изменению диаметра пор, используемых для экструзии.

Что касается распределения везикул по размерам, то для частиц DMPC и DPPC наблюдается четкая корреляция между средними радиусами везикул и мембранных фильтров, причем диаметрами пор радиусы везикул пропорциональны диаметрам пор. Однако в среднем внешний диаметр везикул остается немного больше, чем диаметр пор, что отражает способность частиц сжиматься/деформироваться в определенной степени, оставаясь при этом неповрежденными при прохождении через поры мембраны. Также показано, что количество мультислойных везикул в растворе уменьшается с увеличением количеством проходов через поликарбонатные мембраны. При многократной экструзии (20-25 проходов) с использованием мембраны с диаметром пор 30 нм в растворе остаются только однослойные везикулы.

Влияние различных компонентов вирусной оболочки на структурную перестройку липидной мембраны в ответ на взаимодействие с матричным белком М1 вируса гриппа А было исследовано по данным МУРР с помощью программы ВІLMIX. Были рассмотрены следующие липидные системы: 1) двухкомпонентные отрицательно заряженные липосомы, состоящие из синтетических липидов (DOPC/DOPS); 2) четырехкомпонентные (PS/POPC/SM/Chol) везикулы, содержащие компоненты, образующие липидные рафты; 3) "нативные" липосомы, состоящие из смеси вирусных липидов, выделенных из вирусных частиц гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1); 4) протеолипосомы, содержащие те же вирусные липиды, что и в 3), но вместе с якорными сегментами интегрального вирусного белка гемагглютинина (HA).

Для нативных липосом, протеолипосом, содержащих пептид LI45, и двухкомпонентных отрицательно заряженных синтетических липосом, на профиле электронной плотности липидного бислоя (Рис. 8) наблюдалось появление белково-ассоциированного пика. Адсорбция белка приводит к конденсации липидов под ним, т.е. их площадь на одну головную группу липида уменьшается. В результате такой конденсации диполи полярных головных групп липидов выпрямляются, и поэтому пик электронной плотности полярных головных групп для данного монослоя становится шире. В этом случае возникает дисбаланс в площади монослоев, что приводит к изгибу мембраны внутри липосомы в местах адсорбции белков. Можно предположить, что это приводит к образованию трубчатых образований (инвагинаций) внутри липидных везикул.



Рис. 8 (а) Данные МУРР от смесей, состоящих из протеолипосом, полученных из оболочки вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) вместе с пептидами HA LI45, в отсутствии белка M1 и с добавлением белка M1. Экспериментальные данные МУРР (кружки) и наилучшие приближения, полученные с помощью программы BILMIX (красные линии). Кривые сдвинуты на один логарифмический порядок для большей наглядности; (б) восстановленные профили электронной плотности липидного бислоя до загрузки M1 (черная кривая) и после загрузки M1 (цветные кривые). Молярные соотношения липиды:M1 следующие: без M1, 20:1, 4:1, 2.6:1.

Одновременно с этим, внутренний монослой липосомы утолщался при адсорбции M1, поскольку соответствующий пик смещался вправо после добавления белка M1. Примечательно, что этот эффект был более выражен в протеолипосомах по сравнению с нативными липосомами. Это свидетельствует о дополнительном влиянии якорных сегментов HA на формирование плотных липидно-белковых нанодоменов. В связи с этим можно предположить, что пептиды LI45 стимулируют олигомеризацию белка M1 и образование комплексов LI45-M1, что в свою очередь усиливает само-ассоциацию белка M1 и образование слоя молекул M1 на поверхности липидного бислоя, облегчая процесс сборки вирусной частицы.

Для четырехкомпонентных синтетических липосом (с более сложным составом, содержащим числе холестерин И сфингомиелин) В том на электронной восстановленном профиле плотности липидного бислоя не наблюдалось разделенного белково-ассоциированного пика, однако интенсивность левого максимума увеличилась. Кроме того, правый пик не смещался со своего положения для липосом в отсутствии белка М1. Можно предположить, что присутствие холестерина и сфингомиелина стабилизирует липидный бислой и предотвращает М1-индуцированную конденсацию заряженных липидов.

Таким образом, анализ данных МУРР впервые позволил оценить влияние вирусных якорных пептидов гемагглютинина НА на формирование липопротеиновых нанодоменов в липидном бислое. В <u>Главе 5</u> представлен новый метод прямого восстановления формы неизвестного промежуточного состояния в эволюционирующей системе. Эволюционирующие системы, однако, обычно содержат нескольких видов или конформаций молекул, находящихся в динамическом равновесии, и измеренная интенсивность рассеяния содержит вклады от всех этих компонентов. Стандартные методы восстановления формы частиц оказываются неприменимыми в этом случае.

Важно отметить, что очень часто при изучении эволюционирующих систем начальное и конечное состояние процесса достаточно стабильно, и картины рассеяния от этих состояний могут быть надежно измерены (или хорошо аппроксимированы теоретическими моделями). В ходе динамического процесса образуется основная промежуточная структура, которая исчезает в конце, так что ее рассеяние и, следовательно, форма не могут быть получены непосредственно из экспериментальных данных. Наличие промежуточного состояния можно обнаружить, например, с помощью независимых подходов, таких как сингулярное разложение (SVD). Однако сам по себе метод SVD не позволяет восстановить кривую рассеяния от промежуточного состояния системы и, следовательно, сделать выводы о его структуре.

Пусть имеется К кривых рассеяния, собранных от эволюционирующей системы (например, кинетические измерения с временным разрешением). В начале система обладает интенсивностью $I_m(s)$ (например, мономерное состояние); в конце есть конечное определенное состояние (например, крупный агрегат $I_a(s)$). Предполагается, что две интенсивности рассеяния $I_m(s)$ и $I_a(s)$ известны, но в ходе реакции образуется промежуточный компонент, структура которого и кривая рассеяния $I_i(s)$ неизвестны. Интенсивность рассеяния в k-й точке реакции представляет собой линейную комбинацию

$$I_k(s) = v_{mk}I_m(s) + v_{ak}I_a(s) + v_{ik}I_i(s)$$
(11)

где v_{mk} , v_{ak} и v_{ik} - объемные доли компонентов, $v_{mk}+v_{ak}+v_{ik}=1$.

Прямое пространство поиска формы промежуточного компонента представляется плотно упакованной сеткой маленьких сфер (фиктивных атомов) достаточно малого радиуса r<<R, где R - характерный размер частицы. Каждая сфера может принадлежать либо частице (индекс=1), либо растворителю (индекс=0). Алгоритм имитации отжига (SA) используется для поиска оптимальной формы частицы (т.е. вектора X, содержащего информацию о фазовой принадлежности шариков) путем случайного изменения фазовой принадлежности одного фиктивного атома за одну итерацию, чтобы в конечном итоге минимизировать целевую функцию:

$$F(X) = \chi^2(X) + P(X)$$
 (12)

где $\chi^2(X)$ - невязка между экспериментальной и расчетной кривыми, а P(X) – штрафное слагаемое, гарантирующее, что форма частицы является физически

обоснованной (компактной, взаимосвязанной, с центром масс, близким к началу координат; и если требуется, имеющей заданную анизометрию). Данный подход для случая монодисперсных систем был ранее реализован в программах DAMMIN, и DAMMIF.

Для эволюционирующей системы интенсивность промежуточного компонента $I_i(s)$ не может быть измерена; вместо этого информация о ней зашифрована в измеренных данных с помощью уравнения (11). Поэтому нами был предложен обобщенный метод использования этой информации и восстановления формы промежуточного компонента вместе с неизвестными объемными долями трех компонентов путем одновременного приближения всех экспериментальных картин рассеяния $I_k(s)$, k=1...K.

В этом случае, обобщенная функция, которую необходимо минимизировать F(X), рассчитывается как:

$$F(X) = \sum_{k=1}^{K} \chi_k^2(X) + \sum_j W_j * P_j(X)$$
(13)

Здесь первое слагаемое - это общая невязка между экспериментальными и расчетными данными по К экспериментальным кривым. Второй член содержит физические ограничения, аналогичные ограничениям для программ DAMMIN/DAMMIF в уравнении (12). Кроме того, этот член содержит штраф за минимальную долю, который гарантирует, что средняя объемная доля промежуточного (неизвестного) компонента не должна стать меньше 5%, чтобы избежать не имеющих физического смысла решений с пренебрежимо малым вкладом данного компонента в измеренные данные. Веса штрафов (W_i) подбираются так, чтобы обеспечить баланс между общей невязкой и физическими ограничениями моделей.

В качестве начального приближения для промежуточного состояния выбирается сфера с объемом $(V_m+V_a)/2$ (V_m и V_a – объемы частиц начального и конечного состояния системы, соответственно), и метод SA используется для поиска 3D формы промежуточного компонента, для того чтобы минимизировать F(X) в уравнении (13). На каждом шаге алгоритма SA форма частицы случайным образом изменяется, интенсивность $I_i(s)$ пересчитывается и определяются объемные доли компонентов, которые дают наилучшее общее соответствие измеренным данным МУРР. Для каждого набора данных это делается путем приближения экспериментальных данных с помощью уравнения (11) с ограничениями на неотрицательность объемных долей (аналогично программе OLIGOMER). Данный алгоритм был реализован в виде компьютерной программы DAMMIX, и успешно протестирован как на теоретических данных МУРР, описывающих процессы ассоциации частиц, так и на ряде экспериментальных данных МУРР.

Процесс образования амилоидных фибрилл является нуклеационнозависимым процессом, и характеристика ядер (зародышей) чрезвычайно важна для понимания его механизма. Временной набор данных МУРР, собранный во время фибрилл белка образования инсулина, включал в себя 15 процесса экспериментальных кривых, измеренных во время четырехчасовой фазы роста, которая началась после пятичасового периода инкубации (Рис. 9). Предложенный нами подход был применен к указанному набору данных МУРР и позволил хорошо приблизить кривые рассеяния во всех временных точках. Форма промежуточного компонента инсулина, объемные доли мономеров, промежуточных и зрелых фибрилл, полученные с помощью программы DAMMIX, и их соответствие экспериментальным данным МУРР представлены на Рис. 9. Интересно отметить, что восстановленная форма промежуточного компонента представляет собой вытянутую структуру, состоящую из пяти связанных доменов по размерам близких к мономерам инсулина. Полученная нами *ab initio* реконструкция промежуточного звена фибриллы дает дополнительное подтверждение гипотезе о том, что олигомерное ядро является первичной удлиняющей единицей инсулиновых амилоидных фибрилл.

С помощью предложенного метода можно также изучать трехкомпонентные самоорганизующиеся системы (например, фермент люмазинсинтаза, образующий икосаэдрические капсулы разных типов) и двухкомпонентные равновесные смеси (например, смеси типа мономер-олигомер), в последнем случае конечное состояние системы в уравнении (11) отсутствует, а промежуточное состояние сосуществует только с начальным состоянием.

Стоит отметить, что перед использованием программы DAMMIX необходимо провести соответствующие тесты (например, использовать сингулярное разложение SVD), чтобы убедиться, что система действительно может быть представлена тремя основными компонентами. Если применить DAMMIX к системе с большим числом эволюционирующих компонентов, то DAMMIX восстановит форму, которая будет где-то посередине между формой, имеющихся в растворе олигомерных промежуточных продуктов, причем для части кривых рассеяния из всего набора данных МУРР будет наблюдаться существенное расхождение между экспериментальными и рассчитанными кривыми, что указывает на неполную адекватность описания системы трехкомпонентной моделью. При анализе таких многокомпонентных эволюционирующих систем следует выбирать подмножества данных, в которых SVD-анализ указывает на наличие трех компонентов, и последовательный анализ соответствующих подмножеств данных может позволить восстановить уже несколько неизвестных промежуточных состояний системы.



Рис. 9 Анализ промежуточного состояния во время процесса образования фибрилл белка инсулина. Начальное состояние системы соответствует мономеру инсулина (PDB ID: 1GUJ), конечное состояние аппроксимируется шариковой моделью зрелой фибриллы. На верхней левой панели показаны экспериментальные данные (кружки с интервалами ошибок), а красными сплошными линиями - результаты моделирования программой DAMMIX. Формы мономера и агрегатов показаны на нижней панели малиновыми и голубыми шариками, соответственно; пентамерная атомная модель показана зеленой C_{α} цепью. Восстановленная форма промежуточного компонента, полученная с помощью программы DAMMIX, показана в виде красных шариков. Масштаб составляет 10 нм. Кривые рассеяния от компонентов показаны на верхней правой панели, их восстановленные объемные доли показаны на вставке (цвета те же, что и на нижней панели); интервалы ошибок объемных долей показывают их средний разброс по нескольким запускам программы DAMMIX.

<u>Глава 6</u> посвящена описанию алгоритма эволюционного факторного анализа МУРР, полученных (ЭФА) для анализа данных в сочетании с гельхроматографической колонкой SEC-SAXS). Точное (режим измерений определение структурных параметров и анализ 3D формы биологических макромолекул с помощью МУРР требует наличия очищенных монодисперсных растворов. На практике ситуация осложняется тем, что биологические образцы часто присутствуют в виде смесей отдельных компонентов, что существенно анализ данных МУРР. Однако, если соединить затрудняет этап гельхроматографического разделения с измерениями МУРР, то в ряде случаев разделить вклады отдельных компонентов, становится возможным присутствующих в системе. Хотя гель-хроматография чрезвычайно эффективна смесями, анализ данных МУРР по-прежнему при работе co остается нетривиальным при наложении пиков выхода компонентов на хроматографическом профиле и требует отдельной процедуры декомпозиции для оценки количества компонентов смеси и дальнейшего восстановления их профилей рассеяния.

Метод ЭФА - это модельно-независимый подход для анализа матриц данных, составленных из одномерных кривых (например, спектров) от многокомпонентных систем, в которых наблюдается последовательное, но неполное разделение компонентов. Типичным примером таких данных являются измерения МУРР, записанные во время последовательного выхода (элюирования) раствора образца из хроматографической колонки, в которых происходит временное наложение компонентов. Такой набор из нескольких профилей рассеяния данных МУРР описывается матрицей $\mathbf{A} = \{A_{ik}\} = \{I^{(k)}(s_i)\}, i = 1,...,N, k = 1,..., K,$ где N - число экспериментальных точек, К - число кривых МУРР, например, общее число временных кадров в наборе данных SEC-SAXS. С помощью сингулярного разложения (SVD) эта матрица может быть представлена как $A = USV^{T}$, где матрица S диагональная, а столбцы ортогональных матриц U и V - собственные векторы матриц АА^т и А^тА, соответственно. Матрица U дает набор левых сингулярных векторов, т.е. ортонормированных базисных кривых $U^{(k)}(s_i)$, который охватывает пространство столбцов матрицы A, тогда как диагональ S содержит их соответствующие сингулярные значения в порядке убывания (чем больше сингулярное значение, тем значительнее соответствующий U-вектор).

Алгоритм ЭФА использует SVD-разложение набора данных МУРР для нахождения начальных и конечных точек компонентов в процессе эволюции системы (так называемые "окна концентрации" компонентов). Каждый компонент не присутствует вне временного окна концентрации, поэтому его концентрация в этих временных точках равна нулю. Также предполагается, что компоненты выходят (элюируются) друг за другом, т.е. первый компонент, присутствующий в

системе, исчезает первым, второй компонент исчезает следующим, и так далее.

Основная идея ЭФА алгоритма заключается в том, чтобы проследить за рангом матрицы данных **A** в зависимости от количества учитываемых измерений. Оценка проводится путем выполнения SVD-разложения на матрице данных с последовательным увеличением ее размера. Для этого обычно проводят ЭФА в прямом и обратном направлениях, чтобы определить, когда компонент появляется/исчезает из системы. По графикам зависимости сингулярных значений полученных SVD разложений от номера кривой рассеяния в наборе данных SEC-SAXS можно оценить "концентрационные окна" компонентов по точкам, когда соответствующие сингулярные значения начинают резко расти выше некоторой базовой линии или резко снижаться, приближаясь к базовой линии.

Следующим шагом алгоритма ЭФА является определение матрицы вращения, которая необходима для преобразования значимых сингулярных векторов в матрицу концентрации и профили рассеяния компонентов. Примем во внимание, что матрица данных имеет вид A=IC, где столбцы матрицы I представляют собой профили рассеяния компонентов, а матрица концентрации C выражается как $C=(U^TI)^{-1}SV^T=RV^T$, где R - матрица вращения. Последняя матрица неизвестна, но может быть найдена с помощью информации о концентрационных окнах компонентов, полученной на предыдущем этапе из эволюционирующих графиков сингулярных значений. Взяв только ту часть сингулярных векторов V^T и матрицы C, которые находятся вне диапазона концентрационного окна, можно последовательно восстановить один столбец матрицы R за другим. Найдя элементы матрицы R, затем можно вычислить столбцы матрицы C. Последним шагом алгоритма ЭФА является расчет матрицы I, который может быть выполнен с помощью псевдоинверсии Мура-Пенроуза матрицы C, умноженной на матрицу данных A.

Данный алгоритм реализован в виде компьютерной программы EFAMIX. Проведено систематическое исследование чувствительности метода в зависимости от уровня шума В данных И количества компонентов в системах с перекрывающимися пиками выхода (элюирования) компонентов смеси. Показано, что для двухкомпонентных систем с симметричными (гауссовыми) профилями концентрации (например, в случае равновесной смеси мономеров и димеров бычьего альбумина) метод ЭФА способен восстановить профили концентрации и кривые рассеяния отдельных компонентов даже при наличии значительного уровня шума в данных (Рис. 10). При более высоких уровнях шума реконструкция ЭФА становится нестабильной, а для систем с большим числом компонентов этот шумовой порог неуклонно снижается. Интересно, что даже в случае высокого уровня шума кривые рассеяния от более крупных компонентов все еще могут быть восстановлены, в то время как получаемые вклады от более мелких частиц уже имеют систематические отклонения от ожидаемых зависимостей.



Рис. 10 Разделение компонентов программой EFAMIX на теоретических данных SEC-SAXS от смеси мономеров и димеров белка бычьего альбумина BSA (оба компонента имеют равные доли). Концентрационные профили моделируются гауссовыми функциями. Слева направо, колонка 1 - концентрационные профили компонентов, восстановленные программой EFAMIX (синий), теоретические (идеальные) профили компонентов (красный), общий теоретический концентрационный профиль (зеленый); колонка 2 - профили рассеяния компонентов, восстановленные программой EFAMIX (синий) и теоретические (идеальные) профили рассеяния, рассчитанные от известных кристаллических моделей BSA программой CRYSOL (красный); колонка 3 - отдельные временные кадры данных SEC-SAXS (кадры с номерами 40, 50 и 60) (красный) и приближения, полученные программой EFAMIX (синий); колонка 4 - графики прямого ЭФА (сплошные линии) и обратного ЭФА (кружки) для первых двух значимых сингулярных значений, появление и исчезновение первой и второй компонент показано сплошными и пунктирными вертикальными линиями, соответственно. Уровень шума пуассоновского типа, добавленный к данным, соответствует следующему количеству фотонов вблизи первичного пучка (с учетом радиального усреднения): сверху вниз, ряд 1 (низкий шум) - 10^4 фотона, ряд 2 (умеренный шум) - 10^3 фотона, ряд 3 (высокий шум) - 10^2 фотона.

В то же время следует отметить, что метод ЭФА имеет ограничения, в особенности лля асимметричными профилями систем co значительно концентрации компонентов или в случае слишком сильного перекрывания хроматографических пиков выхода компонентов (когда расстояние между максимумами пиков меньше, чем удвоенная ширина отдельного пика). Такие случаи могут возникать, например, при неоптимальном давлении и скорости хроматографической (SEC) потока колонке структурной В ИЛИ из-за

неоднородности образца, когда специфические конформации исследуемого образца имеют тенденцию по-разному взаимодействовать с матрицей-фильтром в колонке SEC.

Метод ЭФА был затем успешно опробован на ряде экспериментальных наборах данных SEC-SAXS и дал надежные восстановления кривых рассеяния отдельных компонентов смеси, совместимые с теоретическими кривыми, рассчитанными на основе известных кристаллографических структур. В частности, удалось описать необычную олигомерную смесь белка пируват альдолазы, состоящей из гексамеров и октамеров, и восстановить профили рассеяния овальбумина и амилазы по данным SEC-SAXS от их смеси (Рис. 11).



Рис. 11 Разделение компонентов программой EFAMIX на экспериментальных данных SEC-SAXS от белка альдолазы (а) и смеси белков овальбумина с бета-амилазой (б); расчеты проводились в рамках двухкомпонентного приближения. Слева направо: колонка 1 - профили элюирования данных SEC-SAXS, полученных с помощью программы CHROMIXS (зеленый). Во вставках приведены сингулярные значения SVD-разложения данных SEC-SAXS (после вычитания буфера) в порядке убывания. Колонка 2 - восстановленные программой EFAMIX профили концентрации компонентов, синяя и красная кривые - отдельные компоненты, зеленая кривая - общий профиль концентрации. Колонка 3 - восстановленные программой EFAMIX профили рассеяния компонентов и кривые рассеяния, рассчитанные от кристаллографических моделей (коричневые кривые) (гексамер альдолазы: 6R62.pdb, мономер овальбумина: 10VA.pdb; тетрамер амилазы: 1FA2.pdb). Колонка 4 - графики прямого ЭФА (сплошные линии) и обратного ЭФА (кружки) для первых двух значимых сингулярных значений, появление и исчезновение компонентов показано сплошными и пунктирными вертикальными линиями, соответственно.

Метод ЭФА может быть применен и для данных МУРР в сочетании с ионнообменной хроматографией (IEC-SAXS). В процессе IEC образец из хроматографической колонки вымывается потоком буфера с возрастающей концентрацией соли. Основной проблемой при анализе данных IEC-SAXS является учет фона от буфера, меняющегося из-за градиента соли. Формально, меняющийся неявные предположения метода ЭФА (наличие фон может нарушить непересекающихся областей в профилях концентраций компонентов), но на практике степень этого нарушения зависит от степени изменения содержания соли. Показано, что несмотря на изменение фона из-за варьирования количества соли в буферном растворе, метод ЭФА эффективен в случае умеренных градиентов солевого буфера. В частности, метод ЭФА был применен к экспериментальному набору данных IEC-SAXS, полученному для моноклонального антитела IgG1 после разбавления его папаином. В этом случае IgG1 разделяется на Fc-домен, а также два идентичных Fab-домена. Все эти домены имеют молекулярную массу около 50 кДа и быть поэтому не могут разделены с помощью стандартной хроматографической методики (SEC). Однако за счет наличия разного заряда на поверхности доменов ионно-обменная хроматография (IEC) позволяет провести их разделение, при котором **Fc-домен** элюируется раньше Fab-домена. Восстановленные программой EFAMIX профили рассеяния от этих компонентов хорошо соотносятся с известными кристаллографическими структурами Fc и Fab доменов IgG1.

Следует отметить, что определение концентрационных "окон присутствия" компонентов в программе EFAMIX проводится в автоматическом режиме, однако поскольку эффективность работы метода ЭФА имеет определенные ограничения, зависящие от степени перекрывания концентрационных профилей компонентов, а также степени их асимметрии, в ряде случаев автоматический режим работы программы может приводить к смещенным оценкам, что уменьшает вероятность получения правильного решения. Поэтому было важно предусмотреть и возможность интерактивного моделирования для быстрого сканирования различных вариантов "окон присутствия" компонентов и проверки результатов восстановления профилей рассеяния компонентов. С этой целью было создано специальное графическое меню вызова программы EFAMIX, в котором можно задавать количество компонентов, "временные" окна присутствия компонентов и угловой диапазон используемых данных SEC-SAXS. Сравнение результатов, полученных при интерактивном и автоматическом моделировании, может обеспечить полезную перекрестную проверку, особенно в сложных случаях с сильно перекрывающимися пиками.

В <u>Главе 7</u> приведен обзор разработанного автором программного обеспечения для интерактивного моделирования малоугловых данных с помощью графических приложений.

Обработка и последующее проведение моделирования данных МУРР от растворов макромолекул представляет собой многоэтапный процесс, включающий в себя применение большого набора математических алгоритмов и требующий строгого контроля на всех этапах анализа. В последние десятилетия в связи с бурным развитием инструментальной базы и вводом в строй большого количества синхротронных малоугловых станций с использованием роботизированных систем доставки образцов, появилась возможность проведения экспериментов в непрерывном поточном режиме и вопрос быстрой обработки большого объема экспериментальных данных МУРР в режиме реального времени стал чрезвычайно актуальным. На ряде станций были разработаны и успешно применены автоматические системы обработки данных МУРР, позволившие в значительной степени сократить время планирования экспериментов и улучшить эффективность работы пользовательских групп.

Однако, не все этапы анализа данных МУРР могут быть выполнены в автоматическом режиме во время проведения экспериментов на синхротронных станциях, и поэтому требуется наличие "портативного" программного обеспечения для анализа данных, которое пользовательские группы могут использовать у себя в лабораториях. Кроме того, автоматические оценки при выборе параметров модели не всегда могут оказаться оптимальными, и в ряде случаев требуется вмешательство пользователя и их ручное задание для получения приемлемого результата. В этой связи одним из важных требований при разработке программного обеспечения остается возможность проведения моделирования данных в интерактивном режиме. Такую задачу удобнее реализовать с помощью графических приложений, когда пользователь может видеть не только "статичные" цифры анализа, но и визуализировать полную картину данных на экране монитора.

Для проведения эффективного анализа данных МУРР автором был разработан ряд графических программ, позволяющих проводить как первичную обработку данных (программа PRIMUS), так и последующее моделирование (программы MASSHA, SUPALM, POLYSAS, PEAK), включающее в себя определение трехмерных структур макромолекулярных комплексов методом тектоники, новый быстрый молекулярной алгоритм суперпозиции макромолекулярных моделей с использованием разложения на сферические гармоники и критерием корреляции в обратном пространстве, позволивший более, чем в 10 раз ускорить расчеты по сравнению с имеющимися алгоритмами, и количественный анализ сложных многокомпонентных полидисперсных систем с использованием больших наборов экспериментальных данных. Программы могут быть использованы как для анализа данных МУРР от растворов биологических многокомпонентных систем, так и для широкого ряда небиологических объектов и частично упорядоченных систем (наночастиц, полимеров, микроэмульсий и др.).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы для количественного анализа данных малоуглового рассеяния многокомпонентными смесями белковых и липидных частиц с помощью параметрических методов нелинейной минимизации. Они включают в себя оценку объемных долей компонентов, поиск функции распределения частиц по размерам межчастичного взаимодействия, восстановление профилей параметров И электронной плотности липидного бислоя и оценку параметров мультислоевой организации липидных везикул, а также их взаимодействия с белковыми макромолекулами. Разработанные программы могут быть применены для широкого круга биологических, органических и композитных систем. Метод успешно апробирован на ряде белковых и липидных смесей, содержащих до 5 компонентов. Впервые удалось выявить случайно-столкновитель-ный механизм образования комплекса адренодоксина (Adx) с митохондриальным цитохромом с (Сс); показать способность фермента люмазинсинтазы самособираться в капсулы размером от 16 до 32 нм, причем их количественный состав зависит как от наличия изменений физико-химических мутаций белка, так И условий среды; проанализировать эволюцию структурных параметров везикул DMPC/DPPC в процессе экструзии, позволяющую получать однослойные везикулы с радиусом (30±1) нм; для смесей, состоящих из вирусных липидов и матричного белка М1 на вируса гриппа А, оценить влияние гемагглютинина формирование липопротеиновых нанодоменов в липидном бислое.

2. Представлен и реализован в виде программы новый подход по прямому восстановлению трехмерной формы неизвестного промежуточного состояния в эволюционирующей трехкомпонентной системе в случае, когда начальное и конечное состояние системы известно или может быть аппроксимировано теоретическими кривыми рассеяния. Он представляет собой комбинацию *ab initio* алгоритма определения 3D формы частицы и решения системы линейных уравнений методом наименьших квадратов для нахождения объемных долей компонентов смеси (с точностью до 1-5%) в каждой временной точке динамического процесса. Разработанный подход был успешно применен для изучения процесса образования фибрилл белка инсулина и позволил определить форму промежуточного компонента в процессе их роста, который представляет собой вытянутую структуру размером 20 нм, состоящую из 5 связанных доменов по размерам близких к мономерам инсулина, что подтверждает гипотезу об олигомерном ядре, являющемся первичной удлиняющей единицей инсулиновых амилоидных фибрилл. С помощью предложенного метода можно также изучать двухкомпонентные равновесные олигомерные смеси, когда известно только начальное состояние системы. Для белка фактора роста нервов была восстановлена форма димера димеров по концентрационной серии данных трехмерная малоуглового рассеяния.

3. Для белковых смесей с перекрывающимися пиками выхода (элюирования) гель-хроматографической колонки при компонентов ИЗ ee сочетании с малоугловыми измерениями разработан автоматизированный метод восстановления индивидуальных профилей рассеяния компонентов на основе алгоритма эволюционного факторного анализа. Проведено систематическое исследование чувствительности метода в зависимости от количества компонентов (при наличии от 2 до 4 компонентов), уровня шума в данных, степени асимметрии и соотношения амплитуд пиков концентрационных профилей компонентов (в пределах от 1:5 до 5:1). Показано, что для двухкомпонентных систем с симметричными профилями концентрации метод эффективно работает даже при наличии значительного уровня шума в данных (при регистрации 10² фотонов вблизи заслонки первичного пучка). Подтверждено, что метод применим и для наборов малоугловых данных в сочетании с ионно-обменной хроматографией при умеренной степени (<12%) градиента солевого раствора. Метод успешно протестирован на ряде экспериментальных данных, в частности определено, что для смеси белка пируват-альдолазы ее олигомерными компонентами в растворе гексамеры И октамеры. Восстановленные профили рассеяния являются компонентов хорошо соотносятся с известными кристаллографическими моделями белков.

4. Разработан новый подход для апостериорного определения полезного углового диапазона в экспериментальных данных малоуглового рассеяния от разбавленной монодисперсной системы. Предложенная объективная автоматизированная процедура основывается на использовании информационной теоремы Котельникова-Шеннона и учитывает, как отношение сигнал/шум, так и шаг угловой сетки малоугловых данных. Метод был успешно применен для данных МУРР/МУРН от ряда монодисперсных растворов макромолекул, а также от стабилизированных узкодисперсных наночастиц золота со средним размером 8 нм. 5. Предложен новый быстрый алгоритм суперпозиции макромолекулярных моделей с использованием разложения на сферические гармоники и критерием корреляции в обратном пространстве, позволивший более, чем в 10 раз ускорить расчеты по сравнению с имеющимися алгоритмами. Для надежной работы алгоритма требуется использовать не менее 5 сферических гармоник и угловой диапазон данных, включающий не менее 7 шенноновских каналов.

6. Разработан набор графических приложений, позволяющих проводить интерактивную обработку и моделирование малоугловых данных от изотропных систем. Они охватывают широкий спектр задач от первичной обработки данных МУРР/МУРН до моделирования трехмерных структур макромолекулярных комплексов и количественного анализа сложных многокомпонентных полидисперсных систем.

Публикации по теме диссертации

A1. Roessle M. W., Klaering R., Ristau U., Robrahn B., Jahn D., Gehrmann T., Konarev P., Round A., Fiedler S., Hermes C., Svergun D. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg // J. Appl. Cryst. -2007. - V. 40. - P. s190-s194.

A2. Blanchet C. E., Zozulya A. V., Kikhney A. G., Franke D., Konarev P. V., Shang W., Klaering R., Robrahn B., Hermes C., Cipriani F., Svergun D. I., Roessle M. Instrumental setup for high-throughput small- and wide-angle solution scattering at the X33 beamline of EMBL Hamburg // J. Appl. Cryst. – 2012. – V. 45, No 3. – P. 489-495. A3. Peters G. S., Zakharchenko O. A., Konarev P. V., Karmazikov Y. V., Smirnov M. A., Zabelin A. V., Mukhamedzhanov E. H., Veligzhanin A. A., Blagov A. E., Kovalchuk

M. V. The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source // Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A. -2019. -V. 945. -P. 162616.

A4. Peters G. S., Gaponov Y. A., Konarev P. V., Marchenkova M. A., Ilina K. B., Volkov V. V., Pisarevsky Y. V., Kovalchuk M. V. Upgrade of the BioMUR beamline at the Kurchatov synchrotron radiation source for serial small-angle X-ray scattering experiments in solutions // Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A. – 2022. – V. 1025. – P. 166170.

A5. Konarev P. V., Volkov V. V., Sokolova A. V., Koch M. H. J., Svergun D. I. PRIMUS - a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis // J. Appl. Cryst. – 2003. – V. 36. – P. 1277-1282.

A6. Konarev P. V., Petoukhov M. V., Volkov V. V., Svergun D. I. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis // J. Appl. Cryst.– 2006. – V. 39. – P. 277-286.

A7. Petoukhov M. V., Konarev P. V., Kikhney A. G., Svergun D. I. ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis // J. Appl. Cryst. -2007. - V. 40, No s1. - P. s223-s228.

A8. Petoukhov M. V., Franke D., Shkumatov A. V., Tria G., Kikhney A. G., Gajda M., Gorba C., Mertens H. D. T., Konarev P. V., Svergun D. I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis // J. Appl. Cryst. -2012. - V. 45, $N_{2} 2. - P. 342-350$.

A9. Franke D., Petoukhov M. V., Konarev P. V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H. D. T., Kikhney A. G., Hajizadeh N. R., Franklin J. M., Jeffries C. M., Svergun D. I. ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // J. Appl. Cryst. -2017 - V.50, No Pt 4. -P.1212-1225.

A10. Manalastas-Cantos K., Konarev P. V., Hajizadeh N. R., Kikhney A. G., Petoukhov M. V., Molodenskiy D. S., Panjkovich A., Mertens H. D. T., Gruzinov A., Borges C., Jeffries C. M., Svergun D. I., Franke D. ATSAS 3.0: expanded functionality and new

tools for small-angle scattering data analysis // J. Appl. Cryst.– 2021. – V. 54, № Pt 1. – P. 343-355.

A11. Sjekloca L., Pudas R., Sjoblom B., Konarev P., Carugo O., Rybin V., Kiema T. R., Svergun D., Ylanne J., Djinovic Carugo K. Crystal structure of human filamin C domain 23 and small angle scattering model for filamin C 23-24 dimer // J Mol Biol. – 2007. – V. 368, № 4. – P. 1011-1023.

A12. Konarev P. V., Petoukhov M. V., Svergun D. I. Rapid automated superposition of shapes and macromolecular models using spherical harmonics // J. Appl. Cryst.– 2016. – V. 49, No Pt 3. - P. 953-960.

A13. Zhang X., Konarev P. V., Petoukhov M. V., Svergun D. I., Xing L., Cheng R. H., Haase I., Fischer M., Bacher A., Ladenstein R., Meining W. Multiple assembly states of lumazine synthase: a model relating catalytic function and molecular assembly // J Mol Biol. -2006. - V.362, No 4. - P.753-770.

A14. Heikkinen O. K., Ruskamo S., Konarev P. V., Svergun D. I., Iivanainen T., Heikkinen S. M., Permi P., Koskela H., Kilpelainen I., Ylanne J. Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain pairs in the actin cross-linking protein filamin // J Biol Chem. -2009. - V. 284, No 37. - P. 25450-25458.

A15. Wong E., Vaaje-Kolstad G., Ghosh A., Hurtado-Guerrero R., Konarev P. V., Ibrahim A. F., Svergun D. I., Eijsink V. G., Chatterjee N. S., van Aalten D. M. The Vibrio cholerae colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces // PLoS Pathog. -2012. - V. 8, No 1. - P. e1002373.

A16. Zanchi D., Konarev P. V., Tribet C., Baron A., Svergun D. I., Guyot S. Rigidity, conformation, and solvation of native and oxidized tannin macromolecules in waterethanol solution // J Chem Phys. -2009. - V. 130, No 24. - P. 245103-245116.

A17. Konarev P. V., Petoukhov M. V., Svergun D. I. MASSHA - a graphic system for rigid body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data // J. Appl. Cryst. -2001. - V.34. - P.527-532.

A18. Prischi F., Konarev P. V., Iannuzzi C., Pastore C., Adinolfi S., Martin S. R., Svergun D. I., Pastore A. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly // Nat Commun. – 2010. – V. 1 – P. 95-105. A19. Sharapov M. G., Novoselov V. I., Samygina V. R., Konarev P. V., Molochkov A. V., Sekirin A. B., Balkanov A. S., Gudkov S. V. A chimeric recombinant protein with peroxidase and superoxide dismutase activities: Physico-chemical characterization and applicability to neutralize oxidative stress caused by ionizing radiation // Biochemical Engineering Journal –2020. – V. 159. – P. 107603.

A20. Paoletti F., Konarev P. V., Covaceuszach S., Schwarz E., Cattaneo A., Lamba D., Svergun D. I. Structural and functional properties of mouse proNGF // Biochem Soc Trans. -2006. - V. 34, No Pt 4. - P. 605-606.

A21. Paoletti F., Covaceuszach S., Konarev P. V., Gonfloni S., Malerba F., Schwarz E., Svergun D. I., Cattaneo A., Lamba D. Intrinsic structural disorder of mouse proNGF // Proteins. -2009. - V.75, No 4. - P.990-1009.

A22. Covaceuszach S., Cassetta A., Konarev P. V., Gonfloni S., Rudolph R., Svergun D. I., Lamba D., Cattaneo A. Dissecting NGF interactions with TrkA and p75 receptors by structural and functional studies of an anti-NGF neutralizing antibody // J Mol Biol. – 2008. - V.381, No 4. - P.881-896.

A23. Paoletti F., Malerba F., Konarev P. V., Visintin M., Scardigli R., Fasulo L., Lamba D., Svergun D. I., Cattaneo A. Direct intracellular selection and biochemical characterization of a recombinant anti-proNGF single chain antibody fragment // Arch Biochem Biophys. -2012. - V.522, $N_{\rm P} 1. - P.26-36$.

A24. Covaceuszach S., Konarev P. V., Cassetta A., Paoletti F., Svergun D. I., Lamba D., Cattaneo A. The conundrum of the high-affinity NGF binding site formation unveiled? // Biophys J. -2015. -V. 108, No 3. -P. 687-697.

A25. Yan R., Yalinca H., Paoletti F., Gobbo F., Marchetti L., Kuzmanic A., Lamba D., Gervasio F. L., Konarev P. V., Cattaneo A., Pastore A. The Structure of the Pro-domain of Mouse proNGF in Contact with the NGF Domain // Structure. -2019. - V. 27, No 1. - P. 78-89.

A26. Covaceuszach S., Peche L. Y., Konarev P. V., Lamba D. A combined evolutionary and structural approach to disclose the primary structural determinants essential for proneurotrophins biological functions // Comput Struct Biotechnol J. -2021. - V. 19. - P. 2891-2904.

A27. Covaceuszach S., Peche L. Y., Konarev P. V., Grdadolnik J., Cattaneo A., Lamba D. Untangling the Conformational Plasticity of V66M Human proBDNF Polymorphism as a Modifier of Psychiatric Disorder Susceptibility // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23, No 12. – P. 6596.

A28. Paoletti F., Covaceuszach S., Cassetta A., Calabrese A. N., Novak U., Konarev P., Grdadolnik J., Lamba D., Golic Grdadolnik S. Distinct conformational changes occur within the intrinsically unstructured pro-domain of pro-Nerve Growth Factor in the presence of ATP and Mg(2) // Protein Sci. -2023. - V. 32, No 2. -P. e4563.

A29. Sicorello A., Rozycki B., Konarev P. V., Svergun D. I., Pastore A. Capturing the Conformational Ensemble of the Mixed Folded Polyglutamine Protein Ataxin-3 // Structure. -2021. - V. 29, No 1. - P. 70-81.

A30. Falces J., Arregi I., Konarev P. V., Urbaneja M. A., Svergun D. I., Taneva S. G., Banuelos S. Recognition of nucleoplasmin by its nuclear transport receptor importin alpha/beta: insights into a complete import complex // Biochemistry. $-2010. - V. 49, N_{\odot} 45. - P. 9756-9769.$

A31. Shiozawa K., Konarev P. V., Neufeld C., Wilmanns M., Svergun D. I. Solution structure of human Pex5.Pex14.PTS1 protein complexes obtained by small angle X-ray scattering // J Biol Chem. – 2009. – V. 284, № 37. – P. 25334-25342.

A32. Konarev P. V., Svergun D. I. Limitations of the iterative electron density reconstruction algorithm from solution scattering data // Nat Methods. -2021. - V. 18, No 3. -P. 244-245.

A33. Konarev P. V., Svergun D. I. A posteriori determination of the useful data range for small-angle scattering experiments on dilute monodisperse systems // IUCrJ. -2015. -V. 2, No Pt 3. -P. 352-360.

A34. Taneva S. G., Banuelos S., Falces J., Arregi I., Muga A., Konarev P. V., Svergun D. I., Velazquez-Campoy A., Urbaneja M. A. A mechanism for histone chaperoning activity of nucleoplasmin: thermodynamic and structural models // J Mol Biol. – 2009. – V. 393, № 2. – P. 448-463.

A35. Konarev P. V., Kachalova G. S., Ryazanova A. Y., Kubareva E. A., Karyagina A. S., Bartunik H. D., Svergun D. I. Flexibility of the linker between the domains of DNA methyltransferase SsoII revealed by small-angle X-ray scattering: implications for transcription regulation in SsoII restriction-modification system // PLoS One. – 2014. – V. 9, N_{0} 4. – P. e93453.

A36. Svergun D. I., Konarev P. V., Volkov V. V., Koch M. H. J., Sager W. F. C., Smeets J., Blokhuis E. M. A small angle X-ray scattering study of the droplet-cylinder transition in AOT microemulsions // J. Chem. Phys. – 2000. – V. 113. – P. 1651-1665.

A37. Kryukova A. E., Konarev, P. V., Volkov, V. V. Evaluation of solution stability for two-component polydisperse systems by small-angle scattering // J Phys Conf Ser. -2017. - V.941. - P.012069.

А38. Крюкова А. Е., Конарев, П. В., Волков, В. В. Исследование устойчивости решений при анализе полидисперсных систем методом малоуглового рассеяния // Кристаллография. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 32-37.

А39. Крюкова А. Е., Козлова, А. С., Конарев, П. В., Волков, В. В., Асадчиков, В. Е. Оценка устойчивости решений при восстановлении функции распределения частиц в растворе кремнезоля по размерам по данным малоуглового рассеяния // Кристаллография. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 524-529.

A40. Kryukova A. E., Konarev, P. V., Volkov, V. V., Asadchikov, V. E. Restoring silicasol structural parameters using gradient and simulation annealing optimization schemes from small-angle X-ray scattering data // Journal of Molecular Liquids. – 2019. – V. 283. – P. 221-224.

А41. Крюкова А. Е., Конарев, П. В., Волков, В. В., Асадчиков, В. Е. Комбинирование методов минимизации в целях повышения эффективности восстановления распределений частиц по размерам для раствора кремнезоля по данным малоуглового рассеяния // Ядерная физика и инжиниринг. – 2019. – Т. 10, № 4. – С. 393-398.

А42. Крюкова А. Е., Конарев, П.В., Волков, В.В. Поиск эффективного алгоритма для восстановления решений при анализе данных малоуглового рассеяния от раствора кремнезоля // Кристаллография. – 2021. – Т. 66, № 5. – С. 730-737.

А43. Волков В. В., Конарев, П. В., Крюкова, А. Е. Комбинированная схема восстановления функции распределения частиц по размерам с использованием данных малоуглового рассеяния // Письма в ЖЭТФ. – 2020. – Т. 112, № 9. – С. 632-636.

A44. Volkov V. V., Kryukova A.E., Konarev P. V. Approaches for improving the quality of particle size distribution reconstructions from small-angle scattering data // J Phys Conf Ser. -2020. - V. 1686. - P. 012059.

A45. Varga A., Flachner B., Konarev P., Graczer E., Szabo J., Svergun D., Zavodszky P., Vas M. Substrate-induced double sided H-bond network as a means of domain closure in 3-phosphoglycerate kinase // FEBS Lett. – 2006. – V. 580, № 11. – P. 2698-2706.

A46. Szabo J., Varga A., Flachner B., Konarev P. V., Svergun D. I., Zavodszky P., Vas M. Communication between the nucleotide site and the main molecular hinge of 3-phosphoglycerate kinase // Biochemistry. -2008. - V. 47, No 26. -P. 6735-6744.

A47. Szabo J., Varga A., Flachner B., Konarev P. V., Svergun D. I., Zavodszky P., Vas M. Role of side-chains in the operation of the main molecular hinge of 3-phosphoglycerate kinase // Febs Letters. -2008. - V. 582, No 9. - P. 1335-1340.

A48. Varga A., Szabo J., Flachner B., Roy B., Konarev P., Svergun D., Zavodszky P., Perigaud C., Barman T., Lionne C., Vas M. Interaction of human 3-phosphoglycerate kinase with L-ADP, the mirror image of D-ADP // Biochem Biophys Res Commun. -2008. - V.366, No 4. - P.994-1000.

A49. Graczer E., Konarev P. V., Szimler T., Bacso A., Bodonyi A., Svergun D. I., Zavodszky P., Vas M. Essential role of the metal-ion in the IPM-assisted domain closure of 3-isopropylmalate dehydrogenase // FEBS Lett. – 2011. – V. 585, № 20. – P. 3297-3302.

A50. Graczer E., Pallo A., Olah J., Szimler T., Konarev P. V., Svergun D. I., Merli A., Zavodszky P., Weiss M. S., Vas M. Glutamate 270 plays an essential role in K(+)-activation and domain closure of Thermus thermophilus isopropylmalate dehydrogenase // FEBS Lett. -2015. -V. 589, No 2. -P. 240-245.

A51. Graczer E., Szimler T., Garamszegi A., Konarev P. V., Labas A., Olah J., Pallo A., Svergun D. I., Merli A., Zavodszky P., Weiss M. S., Vas M. Dual Role of the Active Site Residues of Thermus thermophilus 3-Isopropylmalate Dehydrogenase: Chemical Catalysis and Domain Closure // Biochemistry. – 2016. – V. 55, № 3. – P. 560-574.

A52. Goettig P., Brandstetter H., Groll M., Gohring W., Konarev P. V., Svergun D. I., Huber R., Kim J. S. X-ray snapshots of peptide processing in mutants of tricorn-interacting factor F1 from Thermoplasma acidophilum // J Biol Chem. – 2005. – V. 280, N_{2} 39. – P. 33387-33396.

A53. Qazi O., Bolgiano B., Crane D., Svergun D. I., Konarev P. V., Yao Z. P., Robinson C. V., Brown K. A., Fairweather N. The HC fragment of tetanus toxin forms stable, concentration-dependent dimers via an intermolecular disulphide bond // J Mol Biol. -2007. - V.365, No 1. - P.123-134.

A54. Xu X., Reinle W., Hannemann F., Konarev P. V., Svergun D. I., Bernhardt R., Ubbink M. Dynamics in a pure encounter complex of two proteins studied by solution scattering and paramagnetic NMR spectroscopy // J Am Chem Soc. $-2008. - V. 130, N_{\odot} 20. - P. 6395-6403.$

A55. de Chiara C., Rees M., Menon R. P., Pauwels K., Lawrence C., Konarev P. V., Svergun D. I., Martin S. R., Chen Y. W., Pastore A. Self-assembly and conformational heterogeneity of the AXH domain of ataxin-1: an unusual example of a chameleon fold // Biophys J. -2013. -V. 104, No 6. -P. 1304-1313.

A56. Boikova A. S., Dyakova Y. A., Ilina K. B., Konarev P. V., Kryukova A. E., Kuklin A. I., Marchenkova M. A., Nabatov B. V., Blagov A. E., Pisarevsky Y. V., Kovalchuk M. V. Octamer formation in lysozyme solutions at the initial crystallization stage detected by small-angle neutron scattering // Acta Cryst. D Struct. Biol. – 2017. – V. 73, № Pt 7. – P. 591-599.

А57. Дьякова Ю. А., Ильина К.Б., Конарев, П.В., Крюкова, А.Е., Марченкова, М.А., Благов, А.Е., Волков, В.В., Писаревский, Ю.В., Ковальчук, М.В. Исследование условий образования единиц роста белкового кристалла в растворах лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей // Кристаллография. – 2017. – Т. 62, № 3. – С. 364-369.

А58. Бойкова А. С., Дьякова, Ю.А., Ильина, К.Б., Конарев, П.В., Крюкова, А.Е., Марченкова, М.А., Благов, А.Е., Писаревский, Ю.В., Ковальчук, М.В. Исследование влияния замены растворителя – H2O на D2O – на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии методом малоуглового рентгеновского рассеяния // Кристаллография. – 2017. – Т. 62, № 6. – С. 876-881.

А59. Попов А. М., Бойкова А. С., Волков В. В., Дьякова Ю. А., Ильина К. Б., Конарев П. В., Марченкова М. А., Петерс Г. С., Писаревский Ю. В., Ковальчук М. В. Микрофлюидная ячейка для изучения структуры предкристаллизационной стадии растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей // Кристаллография. – 2018. – Т. 63, № 5. – С. 697-702.

А60. Бойкова А. С., Дьякова, Ю.А., Ильина, К.Б., Конарев, П.В., Крюкова, А.Е., Марченкова, М.А., Писаревский, Ю.В., Ковальчук, М.В. Исследование предкристаллизационной стадии раствора (влияния температуры и типа осадителя) протеиназы К методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения // Кристаллография. – 2018. – Т. 63, № 6. – С. 857-862.

А61. Дьякова Ю. А., Бойкова А. С., Ильина К. Б., Конарев П. В., Марченкова М. А., Писаревский Ю. В., Тимофеев В. И., Ковальчук М. В. Исследование влияния катиона осадителя на образование олигомеров в кристаллизационных растворах белка лизоцима // Кристаллография. – 2019. – Т. 64, № 1. – С. 15-19.

A62. Kovalchuk M. V., Boikova A. S., Dyakova Y. A., Ilina K. B., Konarev P. V., Marchenkova M. A., Pisarevskiy Y. V., Prosekov P. A., Rogachev A. V., Seregin A. Y. Structural Characteristics of Lysozyme Langmuir Layers Grown on a Liquid Surface from an Oligomeric Mixture Formed during the Early Stages of Lysozyme Crystallization // Thin Solid Films. – 2019. – V. 677. – P. 13-21.

A63. Kovalchuk M. V., Boikova A. S., Dyakova Y. A., Ilina K. B., Konarev P. V., Kryukova A. E., Marchenkova M. A., Pisarevsky Y. V., Timofeev V. I. Precrystallization phase formation of thermolysin hexamers in solution close to crystallization conditions // J Biomol Struct Dyn. – 2019. – V. 37, No 12. – P. 3058-3064. A64. Marchenkova M. A., Konarev P. V., Rakitina T. V., Timofeev V. I., Boikova A. S., Dyakova Y. A., Ilina K. B., Korzhenevskiy D. A., Yu Nikolaeva A., Pisarevsky Y. V., Kovalchuk M. V. Dodecamers derived from the crystal structure were found in the precrystallization solution of the transaminase from the thermophilic bacterium Thermobaculum terrenum by small-angle X-ray scattering // J Biomol Struct Dyn. – 2020. – V. 38, No 10. – P. 2939-2944.

А65. Марченкова М. А., Конарев П. В., Бойкова А. С., Ильина К. Б., Писаревский Ю. В., Ковальчук М. В. Влияние хлоридов одно- и двухвалентных металлов на олигомерный состав кристаллизационных растворов лизоцима и дальнейший рост кристаллов // Кристаллография. – 2021. – Т. 66, № 5. – С. 723-729.

A66. Marchenkova M. A., Konarev P. V., Kordoskaya Y. V., Ilina K. B., Pisarevsky Y. V., Soldatov A. V., Timofeev V. I., Kovalchuk M. V. The role of cations and anions in the formation of crystallization oligomers in protein solutions as revealed by combination of small-angle x-ray scattering and molecular dynamics // Crystals. – 2022. – V. 12. – P. 751.

A67. Kordonskaya Y. V., Timofeev V. I., Marchenkova M. A., Konarev P. V. Identification of the precursor cluster in the crystallization solution of proteinase k protein by molecular dynamics methods // Crystals. -2022. -V. 12. -P. 484.

A68. Sukhanov A. E., Ilina K. B., Konarev P. V., Peters G. S., Pisarevsky Y. V., Smirnova E. S., Alekseeva O. A., Kovalchuk M. V. Temperature Behavior of Precursor Clusters at the Pre-Crystallization Phase of K(H2PO4) Studied by SAXS // Crystals. – 2023. – V. 13. – P. 26.

A69. Konarev P. V., Petoukhov M. V., Dadinova L. A., Fedorova N. V., Volynsky P. E., Svergun D. I., Batishchev O. V., Shtykova E. V. BILMIX: a new approach to restore the size polydispersity and electron density profiles of lipid bilayers from liposomes using small-angle X-ray scattering data // J. Appl. Cryst.– 2020. – V. 53. – P. 236-243.

A70. Konarev P. V., Gruzinov A. Y., Mertens H. D. T., Svergun D. I. Restoring structural parameters of lipid mixtures from small-angle X-ray scattering data // J. Appl. Cryst.-2021.-V. 54, № Pt 1.-P. 169-179.

A71. Kordyukova L. V., Konarev P. V., Fedorova N. V., Shtykova E. V., Ksenofontov A. L., Loshkarev N. A., Dadinova L. A., Timofeeva T. A., Abramchuk S. S., Moiseenko A. V., Baratova L. A., Svergun D. I., Batishchev O. V. The cytoplasmic tail of influenza A virus hemagglutinin and membrane lipid composition change the mode of M1 protein association with the lipid bilayer // Membranes (Basel). -2021. - V. 11. - P. 772.

A72. Konarev P. V., Svergun D. I. Direct shape determination of intermediates in evolving macromolecular solutions from small-angle scattering data // IUCrJ. -2018. - V.5, No Pt 4. - P.402-409.

А73. Konarev P. V., Graewert M. A., Jeffries C. M., Fukuda M., Cheremnykh T. A., Volkov V. V., Svergun D. I. EFAMIX, a tool to decompose inline chromatography SAXS data from partially overlapping components // Protein Sci. – 2022. – V. 31. – P. 269-282. А74. Конарев П. В., Волков, В.В. Восстановление профилей интенсивности малоуглового рассеяния от двух конформационных состояний 3-изопропилмалатдегидрогеназы с помощью эволюционного факторного анализа // Кристаллография. – 2023. – Т. 68, № 6. – С. 948-952.

A75. Konarev P. V., Volkov V. V. Development of algorithms for analysis of smallangle x-ray scattering data from polydisperse and partially ordered systems // Physics of Atomic Nuclei. -2022. -V. 85. -P. 104-109.

A76. Konarev P. V., Volkov V. V., Svergun D. I. Interactive graphical system for smallangle scattering analysis of polydisperse systems // Journal of Physics: Conference Series. - 2016. – V. 747. – P. 012036.

A77. Filippov S. K., Franklin J. M., Konarev P. V., Chytil P., Etrych T., Bogomolova A., Dyakonova M., Papadakis C. M., Radulescu A., Ulbrich K., Stepanek P., Svergun D. I. Hydrolytically degradable polymer micelles for drug delivery: a SAXS/SANS kinetic study // Biomacromolecules. -2013. - V. 14, No 11. - P. 4061-4070.

A78. Svergun D. I., Shtykova E. V., Kozin M. B., Volkov V. V., Konarev P. V., Dembo A. T., Shtykova E. V. J., Bronshtein L. M., Chernyshov D. M., Platonova O. A., Yakunin A. N., Valetsky P. M., R. H. A. Small-angle X-ray scattering study of the structure of self-organized polymer matrices and formation of embedded metal nanoparticles // Cryst. Rep. -2001. - V. 46. - P. 586-595.

A79. Bronstein L. M., Karlinsey R. L., Yi Z., Carini J., Werner-Zwanziger U., Konarev P. V., Svergun D. I., Sanchez A., Khan S. Composite solid polymer electrolytes based on pluronics: Does ordering matter? // Chemistry of Materials. – 2007. – V. 19, № 25. – P. 6258-6265.

A80. Pinotsis N., Chatziefthimiou S. D., Berkemeier F., Beuron F., Mavridis I. M., Konarev P. V., Svergun D. I., Morris E., Rief M., Wilmanns M. Superhelical architecture of the myosin filament-linking protein myomesin with unusual elastic properties // PLoS Biol. -2012. - V. 10, No 2. - P. e1001261.

A81. King-Scott J., Konarev P. V., Panjikar S., Jordanova R., Svergun D. I., Tucker P. A. Structural characterization of the multidomain regulatory protein Rv1364c from Mycobacterium tuberculosis // Structure. -2011. - V. 19, No 1. - P. 56-69.

A82. Bonanomi M., Mazzucchelli S., D'Urzo A., Nardini M., Konarev P. V., Invernizzi G., Svergun D. I., Vanoni M., Regonesi M. E., Tortora P. Interactions of ataxin-3 with its molecular partners in the protein machinery that sorts protein aggregates to the aggresome // Int J Biochem Cell Biol. -2014. -V. 51. -P. 58-64.

A83. Dadinova L. A., Shtykova E. V., Konarev P. V., Rodina E. V., Snalina N. E., Vorobyeva N. N., Kurilova S. A., Nazarova T. I., Jeffries C. M., Svergun D. I. X-Ray Solution Scattering Study of Four Escherichia coli Enzymes Involved in Stationary-Phase Metabolism // PLoS One. -2016. - V. 11, $N_{2} 5. - P.$ e0156105.

A84. Cordeiro M., Otrelo-Cardoso A. R., Svergun D. I., Konarev P. V., Lima J. C., Santos-Silva T., Baptista P. V. Optical and Structural Characterization of a Chronic Myeloid Leukemia DNA Biosensor // ACS Chem Biol. – 2018. – V. 13, № 5. – P. 1235-1242.

A85. Boyko K. M., Baymukhametov T. N., Chesnokov Y. M., Hons M., Lushchekina S. V., Konarev P. V., Lipkin A. V., Vasiliev A. L., Masson P., Popov V. O., Kovalchuk M. V. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD // Biochimie. – 2019. – V. 156. – P. 196-205.

A86. Czech A., Konarev P. V., Goebel I., Svergun D. I., Wills P. R., Ignatova Z. Octarepeat domain of the mammalian prion protein mRNA forms stable A-helical hairpin structure rather than G-quadruplexes // Sci Rep. -2019. -V. 9, N 1. -P. 2465-2475.

A87. Bernardini A., Lorenzo M., Chaves-Sanjuan A., Swuec P., Pigni M., Saad D., Konarev P. V., Graewert M. A., Valentini E., Svergun D. I., Nardini M., Mantovani R., Gnesutta N. The USR domain of USF1 mediates NF-Y interactions and cooperative DNA binding // Int J Biol Macromol. -2021. - V. 193, No Pt A. - P. 401-413.

A88. Chukhontseva K. N., Berdyshev I. M., Safina D. R., Karaseva M. A., Bozin T. N., Salnikov V. V., Konarev P. V., Volkov V. V., Grishin A. V., Kozlovskiy V. I., Kostrov S. V., Demidyuk I. V. The protealysin operon encodes emfourin, a prototype of a novel family of protein metalloprotease inhibitors // Int J Biol Macromol. – 2021. – V. 169. – P. 583-596.

A89. Sokolova O. S., Pichkur E. B., Maslova E. S., Kurochkina L. P., Semenyuk P. I., Konarev P. V., Samygina V. R., Stanishneva-Konovalova T. B. Local Flexibility of a New Single-Ring Chaperonin Encoded by Bacteriophage AR9 Bacillus subtilis // Biomedicines. -2022. -V. 10, N 10. -P. 2347.

A90. Nowak E., Potrzebowski W., Konarev P. V., Rausch J. W., Bona M. K., Svergun D. I., Bujnicki J. M., Le Grice S. F., Nowotny M. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid // Nucleic Acids Res. -2013. - V.41, No 6. -P.3874-3887.

A91. Mosbaek C. R., Konarev P. V., Svergun D. I., Rischel C., Vestergaard B. High concentration formulation studies of an IgG2 antibody using small angle X-ray scattering // Pharm Res. -2012. -V. 29, No 8. -P. 2225-2235.

A92. Adrover M., Martorell G., Martin S. R., Urosev D., Konarev P. V., Svergun D. I., Daura X., Temussi P., Pastore A. The role of hydration in protein stability: comparison of the cold and heat unfolded states of Yfh1 // J Mol Biol. -2012. - V.417, No 5. - P.413-424.

A93. Manolaridis I., Mumtsidu E., Konarev P., Makhov A. M., Fullerton S. W., Sinz A., Kalkhof S., McGeehan J. E., Cary P. D., Griffith J. D., Svergun D., Kneale G. G., Tucker P. A. Structural and biophysical characterization of the proteins interacting with the herpes simplex virus 1 origin of replication // J Biol Chem. – 2009. – V. 284, No 24. – P. 16343-16353.

A94. Werner A., Konarev P. V., Svergun D. I., Hahn U. Characterization of a fluorophore binding RNA aptamer by fluorescence correlation spectroscopy and small angle X-ray scattering // Anal Biochem. -2009. - V.389, No 1. - P.52-62.

A95. Weghofer M., Dall'Antonia Y., Grote M., Stocklinger A., Kneidinger M., Balic N., Krauth M. T., Fernandez-Caldas E., Thomas W. R., van Hage M., Vieths S., Spitzauer S., Horak F., Svergun D. I., Konarev P. V., Valent P., Thalhamer J., Keller W., Valenta R., Vrtala S. Characterization of Der p 21, a new important allergen derived from the gut of house dust mites // Allergy. -2008. - V. 63, $N_{2} 6. - P. 758-767$.

A96. Redecke L., von Bergen M., Clos J., Konarev P. V., Svergun D. I., Fittschen U. E., Broekaert J. A., Bruns O., Georgieva D., Mandelkow E., Genov N., Betzel C. Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro // J Struct Biol. $-2007. - V. 157, N_{2} 2. - P. 308-320.$

A97. Raczynska J., Olchowy J., Konarev P. V., Svergun D. I., Milewski S., Rypniewski W. The crystal and solution studies of glucosamine-6-phosphate synthase from Candida albicans // J Mol Biol. -2007. - V. 372, No 3. - P. 672-688.

A98. Nardini M., Svergun D., Konarev P. V., Spano S., Fasano M., Bracco C., Pesce A., Donadini A., Cericola C., Secundo F., Luini A., Corda D., Bolognesi M. The C-terminal domain of the transcriptional corepressor CtBP is intrinsically unstructured // Protein Sci. -2006. - V. 15, No 5. - P. 1042-1050.

A99. Riek U., Scholz R., Konarev P., Rufer A., Suter M., Nazabal A., Ringler P., Chami M., Muller S. A., Neumann D., Forstner M., Hennig M., Zenobi R., Engel A., Svergun D., Schlattner U., Wallimann T. Structural properties of AMP-activated protein kinase: dimerization, molecular shape, and changes upon ligand binding // J Biol Chem. – 2008. – V. 283, No 26. – P. 18331-18343.

A100.Simpson P. J., Monie T. P., Szendroi A., Davydova N., Tyzack J. K., Conte M. R., Read C. M., Cary P. D., Svergun D. I., Konarev P. V., Curry S., Matthews S. Structure and RNA interactions of the N-terminal RRM domains of PTB // Structure. -2004. - V. 12, No 9. - P. 1631-1643.

A101. Beich-Frandsen M., Vecerek B., Konarev P. V., Sjoblom B., Kloiber K., Hammerle H., Rajkowitsch L., Miles A. J., Kontaxis G., Wallace B. A., Svergun D. I., Konrat R., Blasi U., Djinovic-Carugo K. Structural insights into the dynamics and function of the C-terminus of the E. coli RNA chaperone Hfq // Nucleic Acids Res. – 2011. - V. 39, No 11. - P. 4900-4915.

A102. de Almeida Ribeiro E., Jr., Beich-Frandsen M., Konarev P. V., Shang W., Vecerek B., Kontaxis G., Hammerle H., Peterlik H., Svergun D. I., Blasi U., Djinovic-Carugo K.

Structural flexibility of RNA as molecular basis for Hfq chaperone function // Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40, № 16. – P. 8072-8084.

A103. Ribeiro Ede A., Jr., Pinotsis N., Ghisleni A., Salmazo A., Konarev P. V., Kostan J., Sjoblom B., Schreiner C., Polyansky A. A., Gkougkoulia E. A., Holt M. R., Aachmann F. L., Zagrovic B., Bordignon E., Pirker K. F., Svergun D. I., Gautel M., Djinovic-Carugo K. The structure and regulation of human muscle alpha-actinin // Cell. – 2014. – V. 159, N_{2} 6. – P. 1447-60.

A104. Song J. G., Kostan J., Drepper F., Knapp B., de Almeida Ribeiro E., Jr., Konarev P. V., Grishkovskaya I., Wiche G., Gregor M., Svergun D. I., Warscheid B., Djinovic-Carugo K. Structural insights into Ca2+-calmodulin regulation of Plectin 1a-integrin beta4 interaction in hemidesmosomes // Structure. – 2015. – V. 23, № 3. – P. 558-570.

A105. Adinolfi S., Puglisi R., Crack J. C., Iannuzzi C., Dal Piaz F., Konarev P. V., Svergun D. I., Martin S., Le Brun N. E., Pastore A. The Molecular Bases of the Dual Regulation of Bacterial Iron Sulfur Cluster Biogenesis by CyaY and IscX // Front Mol Biosci. -2017. - V. 4. - P. 97-109.

A106. Filippov S. K., Chytil P., Konarev P. V., Dyakonova M., Papadakis C., Zhigunov A., Plestil J., Stepanek P., Etrych T., Ulbrich K., Svergun D. I. Macromolecular HPMA-based nanoparticles with cholesterol for solid-tumor targeting: detailed study of the inner structure of a highly efficient drug delivery system // Biomacromolecules. -2012. - V. 13, No 8. - P. 2594-2604.

A107. Bogomolova A., Filippov S. K., Starovoytova L., Angelov B., Konarev P., Sedlacek O., Hruby M., Stepanek P. Study of complex thermosensitive amphiphilic polyoxazolines and their interaction with ionic surfactants. Are hydrophobic, thermosensitive, and hydrophilic moieties equally important? // J Phys Chem B. – 2014. – V. 118, No 18. – P. 4940-4950.

A108. Sergeeva O., Vlasov P. S., Domnina N. S., Bogomolova A., Konarev P. V., Svergun D. I., Walterova Z., Horsky J., Stepanek P., Filippov S. K. Novel thermosensitive telechelic PEGs with antioxidant activity: synthesis, molecular properties and conformational behavior. // RSC Advances. -2014. - V. 4. - P. 41763-41771.

A109. Filippov S. K., Verbraeken B., Konarev P. V., Svergun D. I., Angelov B., Vishnevetskaya N. S., Papadakis C. M., Rogers S., Radulescu A., Courtin T., Martins J. C., Starovoytova L., Hruby M., Stepanek P., Kravchenko V. S., Potemkin, II, Hoogenboom R. Block and Gradient Copoly(2-oxazoline) Micelles: Strikingly Different on the Inside // J Phys Chem Lett. -2017. - V. 8, No 16. -P. 3800-3804.

A110.Shtykova E. V., Shtykova E. V., Jr., Volkov V. V., Konarev P. V., Dembo A. T., Makhaeva E. E., Ronova I. A., Khokhlov A. R., Reynaers H., Svergun D. I. Small-angle X-ray scattering reveals hollow nanostructures in native kappa- and iota-carrageenan /surfactant complexes // J. Appl. Cryst.– 2003. – V. 36. – P. 669-673.

A111. Bronstein L. M., Dixit S., Tomaszewski J., Stein B., Svergun D. I., Konarev P. V., Shtykova E., Werner-Zwanziger U., Dragnea B. Hybrid Polymer Particles with a

Protective Shell: Synthesis, Structure, and Templating // Chem. Mater. – 2006. – V. 18. – P. 2418-2430.

A112. Malyutin A. G., Cheng H., Sanchez-Felix O. R., Carlson K., Stein B. D., Konarev P. V., Svergun D. I., Dragnea B., Bronstein L. M. Coat Protein-Dependent Behavior of Poly(ethylene glycol) Tails in Iron Oxide Core Virus-like Nanoparticles // ACS Appl Mater Interfaces. -2015. - V. 7, No 22. - P. 12089-12098.

А113. Мулаков С. П., Конарев П. В., Тимаева О. И., Кузьмичева Г. М. Применение рентгеновских методов для определения размеров наночастиц в системе наноразмерный анатаз–поли-п-винилкапролактам // Кристаллография. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 644-653.

A114. Timaeva O., Pashkin I., Mulakov S., Kuzmicheva G., Konarev P., Terekhova R., Sadovskaya N., Czakkel O., Prevost S. Synthesis and physico-chemical properties of poly(N-vinyl pyrrolidone)-based hydrogels with titania nanoparticles // J Mater Sci. - 2020. - V. 55, No 7. - P. 3005-3021.

А115. Крюкова А. Е., Шпичка, А.И., Конарев, П.В., Волков, В.В., Тимашев, П.С., Асадчиков, В.Е. Восстановление формы бычьего фибриногена в растворе по данным малоуглового рассеяния // Кристаллография. – 2018. – Т. 63, № 6. – С. 863-865.

A116. Shpichka A. I., Konarev P. V., Efremov Y. M., Kryukova A. E., Aksenova N. A., Kotova S. L., Frolova A. A., Kosheleva N. V., Zhigalina O. M., Yusupov V. I., Khmelenin D. N., Koroleva A., Volkov V. V., Asadchikov V. E., Timashev P. S. Digging deeper: structural background of PEGylated fibrin gels in cell migration and lumenogenesis // RSC Adv. -2020. - V. 10, $N_{2} 8. - P. 4190-4200$.

A117. Konarev P. V., Grigorev, V. A., Bikmulina, P. Yu., Presnyakova, V. S., Kryukova, A. E., Volkov, V. V., Shpichka, A. I., Asadchikov, V. E., Timashev, P. S. The Structural Features of Native Fibrin and Its Conjugates with Polyethylene Glycol and Vascular Endothelial Growth Factor according to Small-Angle X-Ray Scattering // Review Journal of Chemistry. -2020. - V. 10, No 3-4. - P. 158-163.