

ОТЗЫВ

официального оппонента по диссертации Конарева Петра Валерьевича «Развитие и применение методов анализа данных малоуглового рентгеновского рассеяния многокомпонентными биологическими системами», представленной к защите на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.8 – «Физика конденсированного состояния»

В настоящее время в исследованиях надатомной структуры биологических, органических и неорганических материалов активно применяется метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Сегодня развитие этого метода, как метода, использующего в том числе и синхротронное излучение (СИ), получило дополнительный импульс, связанный с развитием инструментальной базы и вводом в строй большого количества синхротронных малоугловых станций в мире, в том числе и на создаваемых в России источниках синхротронного излучения четвертого поколения СКИФ и СИЛА. Несмотря на то, что прогресс в развитии программного обеспечения сделал метод МУРР в некоторой степени стандартным и, несомненно, мощным инструментом в исследовании трехмерной формы макромолекулярных структур, прямой анализ формы частиц для многокомпонентных смесей по данным МУРР все еще затруднен и представляет собой нетривиальную задачу. А именно к сложным многокомпонентным системам проявляется огромный фундаментальный и практический интерес в современной физике конденсированного состояния.

Диссертация П.В. Конарева посвящена развитию новых подходов к получению структурной информации о различных типах частиц в многокомпонентных системах с использованием экспериментов по малоугловому рентгеновскому рассеянию. Такие подходы в ряде случаев позволяют существенно продвинуться в анализе формы частиц для многокомпонентных смесей по данным МУРР, включая кинетические изменения. Особо следует отметить тот факт, что в последнем случае речь идет о восстановлении формы неизвестного компонента в эволюционирующей системе, который напрямую выделить в эксперименте не представляется возможным.

Актуальность диссертационной работы П.В. Конарева, не вызывает сомнений, поскольку предложенные в ней новые методики, включая анализ полезного углового диапазона экспериментальных данных МУРР/МУРН, определение трехмерной формы неизвестного промежуточного состояния в динамических и самоорганизующихся системах, быстрый алгоритм суперпозиции макромолекулярных моделей с использованием разложения на сферические гармоники, применяются, без преувеличения, на переднем крае науки. При этом используются самые последние наработки в строгом математическом анализе экспериментальных данных, позволяя существенно повышать надежность и устойчивость получаемых результатов.

Диссертационная работа состоит из введения, семи глав, основных выводов, списка литературы и приложения. Общий объем работы 371 страница (включая Приложение на 4 страницах). Диссертационная работа содержит 99 рисунков и 23 таблицы. Список цитируемой литературы включает 240 наименований.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи, описаны научная новизна, теоретическая и практическая

значимость полученных результатов, приведены основные положения, выносимые на защиту, а также представлены сведения о личном вкладе автора, апробации и структуре диссертационной работы.

В первой главе представлен обзор литературных данных, включающий в себя и краткую хронологию развития методов МУРР/МУРН, физические основы данных методов, а также имеющиеся к настоящему времени основные алгоритмы, используемые для интерпретации данных. Также, описана методика эксперимента МУРР, обозначены возможности метода, проблемы неоднозначности решений и имеющиеся ограничения в применении соответствующих подходов. Следует отметить, большое количество примеров практического использования упомянутых алгоритмов, во многих из которых автор принимал активное участие, весьма полно демонстрирующих эффективность их работы.

Вторая глава посвящена обоснованию и применению нового подхода оценки углового диапазона экспериментальных данных МУРР/МУРН, содержащего полезную информацию. Предложенная процедура основывается на использовании теоремы Котельникова-Шеннона (также известной как “теорема отсчетов”) и позволяет объективно учитывать, 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. Автоматизированный выбор эффективного числа шенноновских каналов (определяющего полезный угловой диапазон данных МУРР/МУРН) позволяет использовать данный алгоритм в автоматизированных системах обработки данных, а также при моделировании и депонировании кривых рассеяния в имеющиеся базы данных.

В третьей главе представлены подходы, предназначенные для анализа сложных полидисперсных (по размеру и форме частиц) систем различной природы. С их помощью можно определять олигомерный состав белковых смесей, аппроксимировать форму компонентов простыми геометрическими телами (однослойными и двуслойными сферами, цилиндрами, эллипсоидами и др.) и находить их объемные доли и распределения по размерам, а также учитывать эффекты межчастичных взаимодействий. Алгоритмы реализованы автором в виде набора программ с использованием параметрического моделирования и нелинейных методов минимизации. Автором был рассмотрен широкий спектр многокомпонентных систем, находящихся в динамическом равновесии (в частности, смесь активной и неактивной форм фермента, олигомерные смеси, образующиеся при частичной диссоциации мультимеров или путем случайно-столкновительного механизма при образовании комплекса, самоорганизующиеся системы вирусоподобных частиц, растворы микроэмульсий вида вода/поверхностно-активное вещество/органический растворитель). Показано, что фермент люмазинсинтаза подобно некоторым вирусным белкам может самособираться в капсулы различного размера и количества субъединиц (с диаметром от 16 до 32 нм) вследствие мутаций или изменений химических и физических условий среды. Установлено, что такая изменчивость форм капсул четко коррелирует с ферментативной (каталитической) функцией белка.

Четвертая глава содержит описание алгоритмов для анализа липидных и липид-белковых смесей. Системы фосфолипидных везикул часто используются в медицине и

фармацевтике в качестве носителей для доставки лекарственных средств или мишеней. Отличительной особенностью данных молекул является их амфифильный характер, причем гидрофильный и гидрофобные участки молекул имеют различную электронную плотность. Поэтому образуемые ими в растворе агрегаты - липосомы, имеют неоднородную электронную плотность, что затрудняет использование стандартных *ab initio* методов определения формы частиц. Тем не менее предложенные подходы, позволяют извлекать ценную информацию о структурной организации таких частиц, а именно, восстанавливать профиль электронной плотности липидного бислоя, функцию распределения везикул по размерам и оценивать их мультислоевую организацию. Это было убедительно продемонстрировано автором при анализе изменений состава липидных везикул в процессе экструзии по данным МУРР, а также изучении липид-белковых взаимодействий в смеси вирусных липидов и оболочечного белка М1 вируса гриппа А с различным молярным отношением липида к белку.

В пятой главе приведен новый подход, позволяющий восстанавливать трехмерную форму промежуточного состояния в эволюционирующей или находящейся в динамическом равновесии трехкомпонентной/двухкомпонентной системе. Отличительной особенностью данного метода, является учет физических свойств объекта при прямом *ab initio* моделировании, тогда как имеющиеся альтернативные алгоритмы (например, метод альтернирующих наименьших квадратов) ищут лишь некоторую абстрактную кривую и не учитывают этих свойств. Предложенный метод эффективно работает в случае, когда начальное и конечное состояния системы известны или могут быть аппроксимированы с хорошей точностью, а в процессе перехода присутствует промежуточная структура. Надежная работа алгоритма продемонстрирована как на ряде теоретических наборов данных (со сложной формой неизвестного компонента), так и на реальных наборах экспериментальных данных МУРР (полученных, в том числе, в процессе образования фибрилл белка инсулина). Указаны ограничения метода и даны рекомендации по его эффективному применению для временных наборов данных МУРР при изучении протекания химических реакций и биологических процессов.

Шестая глава рассматривает методы разделения вкладов компонентов в наборах данных МУРР от белковых смесей, полученных при использовании гелехроматографической колонки. Автором предложен новый автоматизированный подход восстановления индивидуальных профилей рассеяния компонентов с помощью эволюционного факторного анализа. Показано, что для двухкомпонентных систем с симметричными профилями выхода (концентрации) компонентов метод эффективно работает даже при наличии значительного уровня шума в данных. В то же время, установлено, что метод также чувствителен к таким параметрам, как количество компонентов смеси, степень асимметрии концентрационного профиля компонента и отношение амплитуд пиков профилей. С помощью предложенного алгоритма определен олигомерный состав белка альдолазы и смеси белков овальбумина и бета-амилазы. Важно отметить, что метод применим и в случае использования ионно-обменной хроматографии с умеренным градиентом соли буферного раствора.

В седьмой главе описаны разработанные автором графические программы, позволяющие проводить интерактивную обработку и моделирование данных МУРР/МУРН от изотропных систем. С помощью них можно проводить обработку "сырых" данных МУРР/МУРН, оценку структурных параметров и функции парных

расстояний, моделирование четвертичной структуры методом молекулярной тектоники многодоменных белков и макромолекулярных комплексов, сопоставление трехмерных моделей с использованием разработанного автором быстрого алгоритма, использующего разложение на сферические гармоники и критерий корреляции в обратном пространстве, анализ состава многокомпонентных полидисперсных систем для больших наборов экспериментальных данных.

В конце каждой главы сформулированы краткие результаты, что улучшает восприятие материала работы, а основные результаты и выводы приведены в заключении работы.

Научная новизна работы заключается в следующем: впервые удалось выявить случайно-столкновительный механизм образования комплекса аденодоксина с митохондриальным цитохромом; показать способность фермента люмазинсинтазы самособирается в капсулы размером от 16 до 32 нм, количественный состав которых зависит как от изменений физико-химических условий среды и наличия мутаций; проанализировать эволюцию структурных параметров везикул димиристоилфосфатидилхолина в процессе экструзии; выявить влияние гемагглютинина на формирование липопротеиновых нанодоменов в липидном бислое при взаимодействии вирусных липидов и матричного белка М1 вируса гриппа А; установить, что для белка пируват альдозазы ее олигомерными компонентами в растворе являются гексамеры и октамеры; определить форму частицы промежуточного компонента в процессе образования фибрилл белка инсулина.

Достоверность и надежность представленных в работе результатов подтверждается использованием современного экспериментального оборудования и программного обеспечения (в том числе разработанного автором), сравнением с результатами других научных групп, а также наличием большого количества публикаций (117 статей) в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, и докладах на различных национальных и международных конференциях (92 тезиса докладов).

Настоящая диссертационная работа является законченным исследованием, представляющим значительный научный и практический интерес. Она обладает внутренним единством, логично построена, содержит новые научные результаты и положения, ее структура и содержание соответствует заявленным целям исследования.

Важным моментом диссертационной работы является применение комплексного подхода при исследовании каждого объекта, который заключается, во-первых, в предварительной адаптации или разработке наиболее адекватных методик анализа данных МУРР, во-вторых, в использовании имеющейся информации об исследуемых объектах, полученной комплементарными структурными методами (РСА, ЯМР, Крио-ЭМ и др.). Все комплексные исследования выполнены на высоком профессиональном уровне, что позволило получить наиболее полную информацию о каждом представленном объекте и обеспечить достоверность полученных результатов. Автореферат в достаточной мере отражает основное содержание диссертации.

По работе имеются следующие вопросы и замечания:

1. Насколько устойчивыми будут оставаться восстановления профилей рассеяния индивидуальных компонентов белковой смеси при использовании метода эволюционного факторного анализа при изменении шага угловой оси экспериментальных данных?

2. Будет ли влиять на эффективность работы быстрого алгоритма суперпозиции макромолекулярных моделей с использованием разложения на сферические гармоники наличие гибких концевых участков структуры?

3. Адсорбция белка M1 в липидный бислой липосомы (Глава 4). Не совсем понятно, почему белково-ассоциированный пик в полученных профилях ПДР возникает только слева на границе везикулы. Также в чем причина нелинейного поведения интенсивности данного пика? На Рис.4.26, 4.27 он сначала растет с ростом относительной доли белка в растворе, а потом уменьшается.

4. Технические замечания.

- Формула (1.4) не совсем корректна. Для полидисперсных систем структурный фактор (здесь $T(s)$) не выделяется. Интегрирование должно производиться по парциальным структурным факторам. По крайней мере, в первом (так называемом локально-монодисперсном) приближении функция $T(s)$ (которая зависит от размера частиц) должна быть под знаком интеграла. Если формула (1.4) использовалась напрямую, необходимо привести критерии возможности и точности ее использования.

- В тексте используется понятие «исключенный объем». Например, в формуле (1.21) интенсивность рассеяния раскладывается на компоненты, относящиеся к объему частицы, недоступному растворителю (исключенный объем), и к гидратной оболочке. А в формуле (2.10) исключенный объем определяется через прямое использование кривой рассеяния без учета гидратной оболочки. Ниже формула (2.10) используется в оценке исключенного объема для белкового комплекса импортин α/β и белка M.SSoII (Рис.2.6а, б). Почему в этом случае не учитывалась гидратная оболочка? Существует ли критерий необходимости учета гидратной оболочки?

- Формулы (1.12). Корректно было бы указать границы применимости данных приближений Гинье для сильноанизотропных форм.

- Стр. 124. «Функции распределения по объему частиц $Dk(R)$ удобно представлять нормированным распределением Шульца». Не совсем понятно, что означает «удобно»? А если распределение нормальное? Почему нужна строгая привязка к распределению Шульца и нельзя использовать произвольный вид функции распределения $Dk(R)$?

Указанные замечания не оказывают существенного влияния на качество и на общую высокую оценку диссертационной работы. В целом диссертация представляет собой законченную исследовательскую работу с большим количеством экспериментального материала и всесторонним анализом полученных данных. Новые, полученные диссертантом, результаты, имеют большое значение для дальнейшего

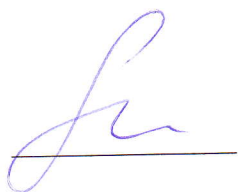
развития метода малоуглового развития и его широкого применения в структурных исследованиях и диагностике широкого класса наносистем.

Таким образом, рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ и Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Конарев Петр Валерьевич, заслуживает присвоения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.8. - «Физика конденсированного состояния».

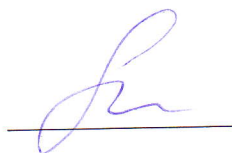
Официальный оппонент:

Доктор физико-математических наук
по специальности 01.04.07 - Физика конденсированного состояния,
начальник сектора нейтронной оптики,
Лаборатория нейтронной физики им. И.М. Франка,
Международная межправительственная организация
Объединенный институт ядерных исследований (ЛНФ ОИЯИ),

Адрес места работы: 141980, Московская обл., г. Дубна, ул. Жолио-Кюри, 6
Контактные данные:
Тел.: 8(496)216-26-74
Email: avd@nf.jinr.ru



Авдеев Михаил Васильевич
« 19 » 04 2024 г.



Согласен на обработку персональных данных
Авдеев Михаил Васильевич
« 19 » 04 2024 г.

Подпись Авдеева Михаила Васильевича удостоверяю
Ученый секретарь ЛНФ ОИЯИ

