

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук Конарева Петра Валерьевича
на тему: «Развитие и применение методов анализа данных малоуглового рентгеновского
рассеяния многокомпонентными биологическими системами»
по специальности 1.3.8 – «физика конденсированного состояния»

Установление пространственной структуры и динамического поведения биомолекулярных систем, в частности, белков, нуклеиновых кислот и клеточных мембран, является важнейшим условием, необходимым для расшифровки их механизмов работы в клетке как в нормальных условиях, так и в патологических состояниях. Помимо фундаментального значения, это, в свою очередь, создает основу для рационального конструирования новых лекарственных средств, методов терапии социально значимых заболеваний и т.д. Среди известных проблем современных методов структурной биологии - рентгеноструктурного анализа (РСА), криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – следует упомянуть статичный характер получаемых данных, трудоемкость (а часто и невозможность) требуемой пробоподготовки, трудности работы с непрочными комплексами биомолекул, а в случае ЯМР – серьезными ограничениями по размерам изучаемых систем. Перспективной альтернативой является применение методов малоуглового рассеяния рентгеновского (МУРР) и нейтронного (МУРН) излучения. Эти подходы являются неинвазивными, не требуют сложной пробоподготовки, дают ценную информацию о структуре и динамике исследуемых объектов в условиях, близких к нативным и т.д. Однако существующие подходы несовершенны, поскольку, к примеру, в случае полидисперсных многокомпонентных систем они позволяют оценивать лишь их интегральные структурные характеристики, усредненные по ансамблю частиц. Кроме того, восстановление трехмерной модели молекулярного объекта по данным кривых рассеяния в общем случае является неоднозначной процедурой и т.д. Поэтому создание новых эффективных методов МУРР/МУРН, способных преодолеть указанные ограничения, является востребованным и перспективным. Это и определяет актуальность темы и научную значимость диссертации Конарева П.В., посвященной развитию методов структурного анализа многокомпонентных биомолекулярных систем по данным рентгеновского и нейтронного малоуглового рассеяния.

Диссертация построена по схеме, несколько отличающейся от классической. Она состоит из Введения, семи глав с описанием полученных автором результатов, Приложения с описанием созданных программ для анализа данных МУРР/МУРН, списка цитируемой литературы и списка публикаций соискателя по теме исследования. Диссертационная работа изложена на 371 странице, включает 99 рисунков и 23 таблицы. Список литературы содержит 240 источников. Во Введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, описаны научная новизна и практическая значимость работы, а также изложены положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов. Кроме того, представлены сведения об апробации диссертационной работы, о публикациях соискателя и о его личном вкладе в настоящее исследование. Особенностью оформления работы является отсутствие специальной главы, посвященной описанию современного состояния проблемы в предметной области. Но при этом в каждой из глав даны сведения из соответствующих тематике главы литературных источников. Подобный формат, на мой взгляд, позволяет эффективно показать положение дел по конкретному направлению исследований, хотя в ряде случаев данные литературы описаны излишне лаконично – см. замечание ниже. Из анализа имеющейся библиографии следует, что, несмотря на большой интерес к изучению структурной организации, динамического поведения и взаимодействий биомолекулярных систем методами МУРР/МУРН, а также достигнутый в последние годы значительный прогресс в решении этих задач, современная практика применения указанных подходов остро нуждается в повышении информативности анализа получаемых экспериментальных данных – их аппроксимации кривыми рассеяния, моделирования на основе калибровки на реперных объектах, создании новых высокоэффективных вычислительных алгоритмов обработки данных и реализующих их компьютерных программ. Это означает, что рассматриваемые проблемы остаются актуальными и востребованными. Отмечу, что для раскрытия темы автор привлекает обширный библиографический материал, хотя и с относительно небольшим числом публикаций последних лет (см. замечание ниже). Изложенная в главах 1-7 информация из литературных источников подводит читателя к логически обоснованным выводам относительно целей диссертационной работы и формулировке конкретных задач, которые необходимо решить.

Представленные в диссертационной работе научные результаты разбиты на семь глав (1-7) – они относятся к описанию МУРР/МУРН как эффективных методов наноразмерных структурных исследований (Глава 1), оценке оптимального углового диапазона

экспериментальных данных МУРР/МУРН с использованием теоремы Котельникова-Шеннона (Глава 2), представлению способов количественной оценки по данным МУРР/МУРН состава многокомпонентных полидисперсных систем (Глава 3) и липидных/липид-белковых смесей (Глава 4), разработке метода прямого определения формы промежуточного компонента в эволюционирующих многокомпонентных системах по данным МУРР/МУРН (Глава 5), созданию метода эволюционного факторного анализа для восстановления индивидуальных профилей рассеяния компонентов белковыми смесями по данным МУРР/МУРН с использованием хроматографической колонки (Глава 6) и описанию созданного автором (или при его участии) программного обеспечения для интерактивного моделирования данных МУРР/МУРН с помощью графических приложений (Глава 7). В ходе выполнения работы автором были получены следующие основные научные результаты:

1. Продемонстрировано, что методы МУРР/МУРН позволяют восстанавливать с низким разрешением 3-мерную структуру биообъектов с неоднородной электронной плотностью. При этом автор использовал *ab initio* моделирование, молекулярную тектонику и гибридные подходы. Показана эффективность созданного метода в установлении олигомерных состояний белков и их комплексов, получения количественных оценок содержания в них различных состояний. Подход реализован в программах MONSA и DENSS, а его эффективность продемонстрирована для ряда белков – комплекса нуклеоплазмина NP с гистонами H2A-H2B / H5 Pex5p/Pex14/PTS.

2. С использованием теоремы Котельникова-Шеннона предложен оригинальный алгоритм определения оптимального углового диапазона регистрации данных МУРР для разбавленных растворов монодисперсных молекулярных систем. Метод позволяет повысить точность обработки экспериментальных данных при оценке интегральных структурных параметров изучаемых объектов – молекулярной массы и гидратированного объема частиц. В частности, он может быть применен к анализу лишь заданной части экспериментальных данных МУРР/МУРН. Важно, что метод полностью автоматизирован, что существенно повышает эффективность его работы, позволяет использование в автоматизированных системах обработки данных и моделирования кривых рассеяния.

3. Разработаны методы количественного анализа многокомпонентных молекулярных систем по данным МУРР/МУРН. В этом случае может применяться широкий спектр объектов исследования – смеси сложного состава биомолекул, микроэмульсии и растворы наночастиц. На примере ферментов - 3-фосфоглицераткиназы и 3-изопротилмалатдегидрогеназы, а также их мутантных форм – охарактеризованы

олигомерные состояния белков, реализующиеся в различных условиях эксперимента (рН, присутствие лигандов, мутации и пр.). В результате стало возможным оценивать объемные фракции компонентов в смесях, рассчитывать функции распределения частиц по размерам, характеризовать взаимодействия между частицами и т.д.

4. Создан новый подход к количественному описанию состава и структурных свойств водно-липидных смесей и их комплексов с белками по данным МУРР/МУРН. С помощью указанного подхода удалось восстановить профили распределения электронной плотности отдельных компонентов модельных липидных бислоев, в том числе с внедренными в них молекулами пептидов и белков. Показано, что предложенный метод анализа дает возможность оценивать роль различных компонентов бислоя (холестерин, сфингомиелин и др.) и взаимодействующих с ним белков и пептидов в структурной организации модельных клеточных мембран.

5. Впервые описан оригинальный подход к выявлению формы промежуточных состояний в эволюционирующих молекулярных системах сложного состава. Важно отметить, что реализованы различные сценарии применения метода – как в случае известных начального и конечного состояний, так и без последнего. Алгоритм реализован в виде программы DAMMIX, а его эффективность продемонстрирована как на синтетических, так и на реальных экспериментальных данных МУРР, в частности, на примере амилоидных фибрилл.

6. Разработан новый алгоритм эволюционного факторного анализа данных МУРР, полученных в комбинации с результатами гель-хроматографии – с одновременным использованием хроматографической колонки. В ходе проведенных многочисленных экспериментов (включая вычислительные) автором написана компьютерная программа EFAMIX, предназначенная для восстановления профилей концентрации отдельных компонентов смеси и соответствующих кривых рассеяния. Установлены границы применимости подхода в зависимости от уровня шума во входных данных – это очень важно для практических применений метода. Отмечу, что использование программы EFAMIX сделано максимально удобным за счет разработанного автором графического интерфейса.

Необходимо отметить, что все описанные выше основные результаты получены либо впервые в мире, либо обладают некоторыми преимуществами по сравнению с известными аналогами (например, в плане быстродействия, удобства графического управления и т.д.). Результаты носят фундаментальный характер – предоставляют новые данные о структуре изучаемых молекулярных систем, процессах олигомеризации в них, влиянии на функцию

и т.д. Кроме того, очень значимым и востребованным представляется и технологический аспект работы – практически все созданные методы анализа данных МУРР/МУРН реализованы в виде программ, причем в основном работающих в связке и, более того, уже во многом встроенных в популярную платформу ATSAS, широко используемую научным сообществом. Это позволяет заключить, что диссертационная работа Конарева П.В. выполнена на высоком научном и технологическом уровне, вносит значимый вклад в развитие области исследования биомолекулярных объектов с помощью МУРР/МУРН и смежных подходов.

Важно, что автор обсуждает проблему применимости и ограничений предложенных новых методов анализа экспериментальных данных и моделирования на их основе. Кроме того, даны примеры практического использования разработанных технологий – пробоподготовки, сбора экспериментальных данных, их компьютерного анализа и дальнейшего моделирования с применением соответствующих вычислительных средств. Отмечу, что практически все из перечисленных результатов опубликованы автором в профильных реферируемых международных изданиях Web of Science / Scopus. Основные результаты по теме диссертации изложены в 117 печатных работах. Соискатель имеет статьи в высокорейтинговых журналах, включая Nature Communications, Nature Methods, Nucleic Acids Research, Cell, Structure и др. Считаю, что цель и задачи, сформулированные в работе, достигнуты в ходе её выполнения. Выводы и заключения, представленные автором, логически обоснованы и убедительно показывают новизну и применимость разработанного метода. Важнейший показатель высокого научного уровня диссертационной работы – список публикаций автора по данной теме. Таким образом, все основные результаты работы прошли тщательное рецензирование и, я уверен, обсуждение с редакторами и анонимными рецензентами. Выносимые на защиту результаты неоднократно докладывались на российских и международных научных форумах. Поэтому у меня нет сомнений в значимости и корректности опубликованных результатов. Резюмируя, можно утверждать, что на базе методик МУРР/МУРН автором создан и апробирован на практике новый комплексный подход к анализу структурной организации сложных биологических надмолекулярных систем.

По материалам диссертации считаю необходимым сформулировать ряд вопросов и замечаний.

1. При аппроксимации и моделировании экспериментальных данных МУРР кривыми рассеяния автор использует алгоритм имитации отжига (SA - Simulated Annealing). Однако при решении задачи оптимизации для подобных систем этот метод (как и все остальные) не гарантирует нахождения глобального экстремума. Поэтому возникает вопрос о единственности найденного решения, а также о его устойчивости к ошибкам входных данных. На мой взгляд, было бы полезно обсудить этот вопрос, поскольку дальнейшие выводы строятся уже на основании построенных таким образом кривых.

2. Экспериментальные данные, полученные для разных диапазонов значений вектора рассеяния (s), сильно отличаются отношением сигнал/шум – при больших величинах s , как правило, наблюдается сильный разброс экспериментальных точек. При этом аппроксимацию данных осуществляют на всем диапазоне s . Насколько это оправданно, учитывая разное качество экспериментальной информации? Не имеет ли смысл проводить моделирование кривых рассеяния с учетом разброса интенсивностей МУРР на каждом из участков?

3. Для проверки корректности подхода на основе анализа данных МУРР автор часто использует синтетические (сгенерированные на компьютере) интенсивности, рассчитанные для жестких модельных объектов заданной формы (сферы, эллипсоиды вращения и т.д.). Однако, поскольку указанные результаты в дальнейшем применяются для интерпретации данных МУРР, полученных для биомолекул и их комплексов, имеющих гораздо более сложную форму, представляется необходимым осуществлять подобную процедуру и на моделях таких объектов, структура и динамическое поведение которых хорошо описаны в экспериментах с высоким разрешением. При этом важно проводить детальный анализ результатов МУРР с данными других экспериментальных и вычислительных методов. Считаю, что этот вопрос было бы целесообразно обсудить подробнее в диссертационной работе.

4. Как динамика белка в среде влияет на свойства кривых малоуглового рассеяния? Дело в том, что в ходе восстановления формы кривых МУРР вычислительными методами автор в основном использует модели структур белков и других биообъектов, взятые из Protein Data Bank (PDB), т.е. их статичные конформации, причем в кристаллическом состоянии. В водном растворе эти системы могут демонстрировать значительно отличающиеся структурные характеристики, обусловленные их динамическим поведением. В частности, могут происходить высокоамплитудные доменные движения и пр. Насколько возможно при обработке данных МУРР учесть эти эффекты?

5. В Главе 4 автор описывает результаты исследования с помощью МУРР структурной организации ряда липидных бислоев. Одним из важных параметров таких систем является профиль электронной плотности различных компонентов вдоль нормали к плоскости бислоя – соответствующие графики приведены для всех изучаемых объектов. Вместе с тем, для некоторых из таких систем указанные данные хорошо известны из литературы, поэтому, считаю, было бы целесообразно напрямую сравнить профили плотности (и, возможно, другие структурные характеристики мембран) с известными, причем полученными в одинаковых условиях (температура, давление, степень гидратации и т.д.). Однако автор лишь констатирует, что результаты МУРР «согласуются с ожидаемым поведением систем» (в частности, на примере бислоя DPPC, стр. 194).

6. Диссертационная работа организована не вполне привычным образом – в ней отсутствует раздел, посвященный изложению современного состояния проблемы. Вместо этого в каждой из глав даны сведения из соответствующих тематике главы литературных источников. Подобный формат, на мой взгляд, позволяет эффективно показать положение дел по конкретному направлению исследований. Однако в Главах 2-6 в основном представлены результаты автора, а данные литературы описаны излишне лаконично. Особенно это касается сопоставления результатов автора с имеющимися в мире аналогами, обсуждения расхождений в интерпретации данных МУРР, объема и качества полученной информации при изучении, например, сходных систем, анализа сделанных приближений и т.д. Обсуждение этих проблем позволило бы лучше понять, какую «нишу» занимают разработанные автором подходы в предметной области в целом, а также научную новизну представленных результатов.

7. В ряде случаев на основании полученных данных о структуре низкого разрешения олигомерных комплексов биомолекул автор делает общее заключение о согласии результатов с известными механизмами функционирования этих объектов, но не поясняет, в чем именно оно проявляется. См., например, стр. 175. Поскольку метод МУРР не дает атомистическую картину, данный вопрос желательно четче прояснить. Это позволило бы определить, какой вклад в понимание структуры, динамики и функции конкретного белка вносят данные МУРР, в чем их преимущество и недостатки по сравнению с другими методами структурной биологии.

8. Одним из основополагающих результатов работы является создание, апробация и внедрение в мировую практику научных исследований комплекса уникального высокоэффективного программного обеспечения для обработки/моделирования данных МУРР/МУРН. Вместе с тем, в ряде случаев (например,

Разделы 6.1.2, 7.1 и др.) описание работы конкретных программ дано чересчур подробно (по крайней мере, для докторской диссертации) и напоминает руководство пользователя.

9. В списке использованной литературы довольно мало работ последних лет. Так, из 240 источников менее 10 относятся к 2019-2024 годам. Поскольку методы МУРР/МУРН бурно развиваются в мире, было бы полезно лучше понять, насколько предложенные автором решения и полученные результаты конкурируют с лучшими мировыми аналогами, особенно самыми современными.

10. В работе встречаются не вполне удачные / некорректные термины и выражения, например, «взаимодействие нейтронов с ядерным потенциалом» (стр. 18), «малоугловой эксперимент» (стр. 23), «кривая остатков» (стр. 31), «первичная аминокислотная последовательность» (стр. 45), «могут быть пристыкованы к малоугловым моделям» (стр. 46), «мутация V66M в гене» (стр. 67), «при сингулярном разложении набора данных» (стр. 106), «тетрагональный лизоцим» (стр. 155), «вирусные самосборки» (стр. 156) и т.д. Фрагмент текста биологического содержания на стр. 48, по-видимому, создан при помощи «искусственного интеллекта», т.е. компьютерного перевода.

Высказанные замечания носят рекомендательный характер и служат для того, чтобы подчеркнуть сложность поставленной задачи, которая была успешно решена автором. Работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит новые интересные научные данные. Полученные автором результаты, несомненно, будут полезны не только исследователям, занимающимся применением метода малоуглового рентгеновского рассеяния применительно к биологическим молекулярным системам, но и специалистам в других областях – молекулярной биологии, биоинженерии, биофизике. Подобные лаборатории и группы существуют в ВУЗах и научно-исследовательских организациях – на ряде естественнонаучных факультетов МГУ им. М.В. Ломоносова, СПбГУ и др., в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и др. Выносимые на защиту результаты опубликованы в виде 117 статей в профильных реферируемых международных журналах Web of Science / Scopus.

Заключение. Диссертационная работа Конарева П.В. «Развитие и применение методов анализа данных малоуглового рентгеновского рассеяния многокомпонентными биологическими системами» соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к

докторским диссертациям, и критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.3.8 – «физика конденсированного состояния», а ее автор Конарев Петр Валерьевич заслуживает присвоения искомой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.8 – «физика конденсированного состояния».

Официальный оппонент:

доктор физико-математических наук, профессор,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией моделирования биомолекулярных систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

ЕФРЕМОВ Роман Гербертович

9 апреля 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 7(903)7431656, e-mail: r-efremov@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.02 – «биофизика»

Адрес места работы:

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН),
Лаборатория моделирования биомолекулярных систем
Тел.: 7(495)3305874; e-mail: efremov@nmr.ru

Подпись проф. Р.Г. Ефремова удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН
д.ф.-м.н.

12.04.2024 г.



В.А. Олейников