

## 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»

Одним из современных трендов развития физики конденсированного состояния в настоящее время является изучение так называемых «мягких материалов» (англ. - soft matter), то есть материалов, которые легко изменяют свою форму или состояние при изменении своей энергии на небольшую величину, сопоставимую с энергией теплового движения. «Строительными блоками» мягкой материи являются искусственные и натуральные небольшие молекулы, коллоиды, полимеры и биополимеры, липиды и везикулы, поверхностно-активные вещества, жидкие кристаллы и наночастицы. Структура таких материалов, которые являются, как правило, частично упорядоченными системами, не сводится к таким хорошо известным и описанным формам, как кристалл или простая жидкость. Для подобных систем характерным является множественный характер происходящих в них процессов и структурных превращений, изучение которых представляет не только теоретический, но и практический интерес с точки зрения возможности управления этими процессами при создании конечных функциональных соединений или материалов с заданными свойствами.

Для большинства современных перспективных материалов совершенство их структуры и возможность ее изменения во времени, или в зависимости от их химического, изотопного состава, температуры и давления, имеет определяющее значение, вследствие чего дальнейшее развитие физических методов структурной диагностики, особенно – неразрушающих (что принципиально важно для биологических объектов и систем), является важным и перспективным направлением физики конденсированного состояния.

В этом отношении, развитие и применение методов рентгеновского и нейтронного малоуглового рассеяния (МУРР/МУРН), которые позволяют контролировать изменения параметров надатомной и надмолекулярной структуры, в том числе с высоким временным разрешением, получили в настоящее время мощный дополнительный импульс развития, что обусловлено созданием во многих странах по всему миру новых исследовательских центров, использующих высокоэффективные источники синхротронного излучения и рентгеновские лазеры на свободных электронах.

В связи с этим диссертация П.В. Конарева, обобщающая результаты, полученные в ходе теоретических и экспериментальных исследований методом МУРР широкого класса многокомпонентных наноразмерных систем, является, несомненно, **актуальной** и своевременной.

Диссертация состоит из введения и семи глав, изложена на 371 странице, содержит 99 рисунков и 23 таблицы, список цитируемой литературы включает 240 наименований.

**Во введении** сформулирована актуальность темы диссертации, цели и задачи диссертационной работы, научная новизна, практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** рассмотрены теоретические основы метода МУРР/МУРН, типы экспериментальных установок и принципы проведения измерений, а также имеющиеся к настоящему времени подходы к анализу и интерпретации данных.

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 представления структуры частицы плотноупакованными шариками с использованием максимально большого набора кривых рассеяния от полноразмерной частицы и ее доступных фрагментов (программа MONSA).

На практических примерах, взятых из результатов многочисленных работ, выполненных автором диссертационной работы, было продемонстрировано, что метод МУРР/МУРН позволяет не только восстанавливать трехмерные структуры низкого разрешения, используя *ab initio* моделирование, молекулярную тектонику и гибридные подходы, но и проводить количественную оценку как олигомерного состояния конформационно-стабильных белков и белковых комплексов, так и комплексов, в которых субъединицы или фрагменты соединены между собой гибкими связями.

Так, с помощью *ab initio* моделирования была определена 3D форма тандемных доменов белка филамина А (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 десульфуреза (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.

С особым интересом оппонент ознакомился с тем разделом Главы 1 диссертационной работы, в котором диссертант выполнил подробный анализ недавно предложенного нового итеративного алгоритма *ab initio* восстановления 3D электронной плотности и формы частиц по данным МУРР (программа DENSS), который, как утверждал его разработчик, позволял по одной кривой рассеяния проводить восстановление даже для систем с неоднородной электронной плотностью (например, комплексов типа “белок-нуклеиновая кислота”).

П.В. Конарев выполнил систематическое исследование эффективности работы итеративного алгоритма, реализованного в программе DENSS, при восстановлении формы частиц с неоднородной электронной плотностью, и убедительно показал, 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 им было рекомендовано использовать многофазный *ab initio* подход, реализованный в программе MONSA (составная часть программного пакета ATSAS [<https://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>], который широко используется в научном сообществе при анализе данных МУРР от биологических систем и в разработке которого П.В. Конарев принимал непосредственное участие).

В главе 2 диссертационной работы П.В. Конарева изложен разработанный им апостериорный подход к оценке оптимального углового диапазона экспериментальных данных МУРР/МУРН с использованием теоремы Котельникова-Шеннона.

Известно, что восстановление 3D-модели рассеивающего объекта по одномерной кривой его малоуглового рассеяния, в общем случае, является неоднозначной процедурой. В этой связи особую важность приобретает оценка оптимального углового диапазона регистрации экспериментальных данных малоуглового рассеяния.

До настоящего времени не существовало надежной процедуры для оценки оптимального («полезного») углового диапазона экспериментальных данных МУРР/МУРН. Основными проблемами оценки этого диапазона на основе отношения сигнал/шум являются отсутствие объективности при выборе соответствующего порога и шага угловой сетки данных МУРР/МУРН.

В диссертационной работе П.В. Конарева был разработан и предложен новый автоматизированный алгоритм определения оптимального углового диапазона регистрации с использованием теоремы Котельникова-Шеннона для разбавленных монодисперсных систем, учитывающий как отношение сигнал/шум, так и шаг угловой сетки малоугловых данных, который позволил добиться более надежной оценки интегральных структурных параметров частиц (таких как гидратированный объем частицы и молекулярная масса) и улучшил эффективность работы алгоритмов восстановления 3D формы частицы.

Процедура реализована в виде программы SHANUM, входящей в пакет ATSAS. Программа предназначена 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.

Для проверки эффективности работы алгоритма, программа SHANUM была протестирована на теоретических наборах кривых малоуглового рассеяния, рассчитанных для частиц различных размеров и различной геометрической формы, для которых были определены значения эффективного числа шенноновских каналов  $M_S$ , совпавшие со значениями оптимального числа шенноновских каналов  $M_B$ , обеспечивающих наилучшее согласие с идеальной кривой, с точностью до одного шенноновского канала для всех случаев.

Данные тестовые расчеты показали, что предложенный алгоритм позволяет надежно определять эффективное (оптимальное) число шенноновских каналов  $M_S$  по исходному набору экспериментальных данных и, следовательно, оценивать полезный угловой диапазон данных МУРР/МУРН (согласно соотношению  $s = \pi M_S / D_{\max}$ , где  $D_{\max}$  – максимальный размер рассеивающего объекта (частицы)).

Было показано, что усеченное шенноновское приближение дает возможность оценить информативность данных, а комбинирование критериев качества этого приближения для

обратного и прямого пространств, позволяет определить полезный угловой диапазон в автоматизированном режиме.

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.

Можно, без сомнения, признать, что разработанный новый подход для апостериорного определения полезного углового диапазона в экспериментальных данных малоуглового рассеяния от разбавленной монодисперсной системы является одним из важных результатов диссертационной работы П.В. Конарева.

**Вместе с тем, по материалам главы 2 оппонент хотел бы высказать одно замечание-пожелание.**

При разработке алгоритма выбора числа шенноновских каналов по исходному набору экспериментальных данных автор использовал информационную теорему Котельникова-Шеннона и учитывал как отношение сигнал/шум, так и шаг угловой сетки малоугловых данных. Тем не менее, сам выбор шага угловой сетки может быть многовариантным: равномерный в шкале  $s$ , равномерный в шкале  $\lg(s)$ , неравномерный (адаптивный), и т.д.

Поскольку автор является несомненным авторитетом в этой области, хотелось бы в его исследовании увидеть также его отношение к этой проблеме.

**В главе 3** диссертации П.В. Конарева рассмотрен ряд подходов, позволяющих проводить количественный анализ сложных многокомпонентных и полидисперсных смесей по данным МУРР/МУРН.

Показано, что состав смеси активной и неактивной форм ферментов 3-фосфоглицераткиназы и 3-изопропилмалатдегидрогеназы зависит от типа добавляемых субстратов (лигандов), а также мутаций аминокислотных остатков вблизи активного центра фермента.

Установлено, что образование комплекса белков адренодоксина и цитохрома С в нативном состоянии осуществляется через случайно-столкновительный механизм взаимодействия данных белков, тогда как созданный генно-инженерным путем комплекс не обладает необходимой подвижностью в растворе.

В работе проведен подробный анализ структурного состава фермента люмазинсинтазы, принимающего участие в биосинтезе рибофлавина. Этот фермент способен самособираться в икосаэдрические капсулы размером 16, 28 и 32 нм, причем их относительное содержание зависит от типа растворителя, кислотности раствора, а также наличия мутаций вблизи активного центра фермента.

Представленные в материалах главы 3 результаты показали, что с использованием разработанных П.В. Конаревым методов можно определять число независимых компонентов, оценивать их объемные доли при наличии информации об атомных структурах компонентов (программа OLIGOMER), определять функции распределения частиц по размерам и параметры межчастичного взаимодействия при аппроксимации формы компонентов простыми геометрическими телами (программа MIXTURE).

**В Главе 4** диссертации П.В. Конарева рассмотрены основные подходы, разработанные автором, позволяющие проводить количественный анализ состава липидных и липид-белковых смесей по данным МУРР. С помощью разработанных им методов можно восстанавливать профили электронной плотности липидного бислоя и оценивать

мультислоевую организацию липидных везикул (программа LPMIX), исследовать взаимодействие липидных везикул с белковыми макромолекулами (программа BILMIX).

Разработанные П.В. Конаревым подходы для количественного анализа данных малоуглового рассеяния многокомпонентными смесями белковых и липидных частиц основаны на параметрических методах нелинейной минимизации и включают в себя оценку объемных долей компонентов, поиск функции распределения частиц по размерам и параметров межчастичного взаимодействия, восстановление профилей электронной плотности липидного бислоя и оценку параметров мультислоевой организации липидных везикул, а также их взаимодействия с белковыми макромолекулами.

Эти подходы были применены для анализа полидисперсных липидных и липид-белковых систем, которые были применены для изучения эволюции липидных везикул в процессе экструзии и характера ассоциации матриксного белка M1 в липидном бислое для синтетических и нативных липосом, полученных из липидных частиц вируса гриппа А.

Были определены функции распределения липидных везикул димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) и дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC) по размерам, а также профили электронной плотности липидного бислоя везикул в процессе экструзии, которые зависят от размера пор мембранных фильтров экструдера, а также количества проходов через экструдер.

Было установлено, что гемаггютинин, белок входящий в оболочку вируса гриппа А, стимулирует олигомеризацию белка M1 на поверхности липидного бислоя нативных липосом.

Разработанные подходы могут быть применены для анализа различных типов систем на основе липидов, в том числе для характеристики взаимодействий между молекулами лекарственных средств и системами их доставки, что чрезвычайно актуально в медицине и фармацевтике при разработке новых вакцин и лекарственных препаратов.

**В пятой главе** диссертации П.В. Конарева изложено оригинальное решение задачи прямого определения формы промежуточного компонента в эволюционирующей системе, состоящей из двух или трех компонентов.

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.

В этом случае форма промежуточного состояния представляется в виде набора плотноупакованных шариков малого (по сравнению с размером частицы) радиуса, каждому из которых приписывается принадлежность частице или растворителю, а интенсивность рассеяния в каждой временной точке динамического процесса представляется в виде линейной комбинации промежуточного (неизвестного) и одного (или двух) известных компонентов (характеризующих начальное и/или конечное состояние системы). Для минимизации используется метод имитации отжига, позволяющий успешно преодолевать локальные минимумы целевой (минимизируемой) функции.

Эффективность работы метода подтверждена на ряде теоретических и экспериментальных наборов данных, с помощью него были успешно восстановлены сложные пространственные формы промежуточных состояний частиц, даже в тех случаях, когда их объемная доля не превышала 50% в любой момент времени.

Так, например, установлено, что в процессе образования фибрилл белка инсулина, образуется промежуточный компонент 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 трехмерная форма димера димеров (гетеротетрамера) по концентрационной серии данных малоуглового рассеяния.

Разработанный подход является общим и пригоден для интерпретации широкого спектра экспериментов МУРР/МУРН с временным разрешением от эволюционирующих систем.

**Глава 6 диссертации** посвящена разработке метода факторного анализа для восстановления индивидуальных профилей рассеяния трудноразделяемых белковых смесей в малоугловых экспериментах с одновременным (in-line) использованием гель-хроматографической колонки.

Поскольку проведение успешного анализа данных МУРР требует удаления тем или иным способом агрегированных макромолекул из раствора с целью исключения их влияния на кривую рассеяния, для решения этой задачи часто проводят измерения МУРР в сочетании с использованием гель-хроматографии (SEC-SAXS, Size-Exclusion Chromatography-Small-Angle X-ray Scattering). В такой комбинированной 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. Таким способом можно разделять отдельные компоненты в образце и регистрировать данные МУРР от изолированных фракций, что чрезвычайно важно для последующей интерпретации данных, анализа и структурного моделирования.

Однако в случае частично перекрывающихся пиков выхода (элюирования) смесей компонентов, задача разложения этих данных на отдельные фракции нетривиальна и потенциально неоднозначна.

П.В. Конаревым был разработан оригинальный алгоритм (реализован в виде программы EFAMIX, входит в пакет ATSAS), для восстановления перекрывающихся профилей рассеяния и концентрации отдельных компонентов по набору данных SEC-SAXS с использованием подхода эволюционного факторного анализа EFA (Evolutionary Factor Analysis), сингулярного разложения и метода вращения матрицы.

Метод был успешно протестирован на ряде теоретических наборов данных с различным числом компонентов смеси, с различным отношением сигнал/шум, с различной степенью перекрытия и асимметрии концентрационных профилей выхода компонентов из колонки, меняющихся в широком диапазоне. Установлена чувствительность метода от всех этих факторов.

По набору экспериментальных данных МУРР определено, что в растворе белок альдолаза образует смесь октамеров и гексамеров.

Показана принципиальная возможность применения метода и для данных МУРР, полученных с использованием ионно-обменной хроматографии на примере разделения Fc и Fab доменов белка иммуноглобулина IgG1.

Восстановленные профили рассеяния компонентов хорошо соотносятся с известными кристаллографическими моделями белков.

**В седьмой главе** диссертации П.В. Конарева приведен обзор разработанного автором программного обеспечения для интерактивного моделирования малоугловых данных с помощью графических приложений. В него входят как программные пакеты, проводящие первичную обработку данных МУРР/МУРН и оценку интегральных структурных параметров, так и программы, позволяющие проводить молекулярное моделирование и уточнение структуры макромолекулярных комплексов путем сдвига и вращения его частей друг относительно друга. Они позволяют работать с большими объемами данных, и предоставляют пользователям необходимую гибкость при выборе варьируемых параметров, что позволяет в ряде случаев улучшить результаты по сравнению с программами, работающими в автоматическом режиме. Отдельного упоминания требует новый разработанный автором алгоритм SUPALM быстрого сопоставления макромолекулярных моделей, как низкого, так и высокого разрешения. Этот алгоритм использует критерий корреляции в обратном пространстве, вычисляемый с помощью разложения амплитуд рассеяния совмещаемых объектов на сферические гармоники. Благодаря этому подходу, удалось более чем в 10 раз ускорить время расчетов, требуемое для суперпозиции моделей, по сравнению с имеющимися алгоритмами.

Последний раздел **Выводы** диссертационной работы содержит совокупность полученных основных результатов работы.

Оценивая диссертационную работу П.В. Конарева в целом, следует отметить, что она производит очень хорошее впечатление и содержит существенную научную новизну.

Сделанные выше замечания-пожелания носят дискуссионный характер и не отражаются на общей высокой оценке работы.

Диссертация и автореферат правильно структурированы, написаны понятным научным языком и отлично проиллюстрированы, что позволяет читателю разобраться в деталях выполненного эксперимента и теоретического анализа.

Выводы полностью соответствуют содержанию работы и полученным результатам.

Работа содержит минимальное количество несущественных опечаток.

В диссертации П.В. Конарева выполнено решение важной научной задачи комплексного развития и применения методов анализа данных малоуглового рентгеновского рассеяния многокомпонентными биологическими системами, что вносит существенный вклад в развитие области знания «Физика конденсированного состояния».

Содержание и название диссертации соответствуют паспорту специальности 1.3.8 «Физика конденсированного состояния» (отрасль науки – физико-математические), в частности:

п. 1. Теоретическое и экспериментальное изучение физической природы и свойств неорганических и органических соединений как в кристаллическом (моно- и поликристаллы), так и в аморфном состоянии, в том числе композитов и гетероструктур, в зависимости от их химического, изотопного состава, температуры и давления;



п. 2. Теоретическое и экспериментальное исследование физических свойств упорядоченных и неупорядоченных неорганических и органических систем, включая классические и квантовые жидкости, стекла различной природы, дисперсные и квантовые системы, системы пониженной размерности;

п. 5. Разработка математических моделей построения фазовых диаграмм состояния и прогнозирование изменения физических свойств конденсированных веществ в зависимости от внешних условий их нахождения.

Диссертация Петра Валерьевича Конарева «Развитие и применение методов анализа данных малоуглового рентгеновского рассеяния многокомпонентными биологическими системами», по актуальности избранной темы, объему исследований, установленным закономерностям, по достоверности полученных результатов и их новизне полностью соответствует требованиям ВАК РФ и Постановления Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в действующей редакции), а ее автор - **Конарев Петр Валерьевич**, заслуживает присвоения ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 1.3.8. - «Физика конденсированного состояния».

Официальный оппонент:

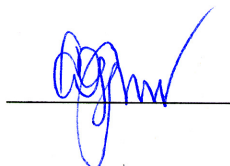
Доктор химических наук  
по специальности 01.04.19 – Физика полимеров  
член-корреспондент РАН,  
главный научный сотрудник,  
заведующий отделом полимерных конструкционных материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук (ИСПМ РАН).

Адрес места работы: 117393, Российская Федерация, Москва, ул. Профсоюзная, 70

Контактные данные:

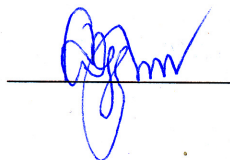
Тел.: +7 (495) 332-58-46

Email: ozerin@ispm.ru



Озерин Александр Никифорович

«16» август 2024 г.



Согласен на обработку персональных данных

Озерин Александр Никифорович

«16» август 2024 г.

Подпись Озерина Александра Никифоровича удостоверяю  
Начальник отдела кадров ИСПМ РАН



  
Н.В. Савина